

PŘIHLÁŠKA VYNÁLEZU

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

(19)
ČESKÁ
REPUBLIKA



ÚŘAD
PRŮMYSLového
VLASTNICTVÍ

(22) Přihlášeno: **19.08.2008**
(32) Datum podání prioritní přihlášky: **21.08.2007 23.04.2008**
(31) Číslo prioritní přihlášky: **60/957,129 61/047,187**
(33) Země priority: **US US**
(40) Datum zveřejnění přihlášky vynálezu: **13.10.2010**
(Věstník č. 41/2010)
(86) PCT číslo: **PCT/US2008/009864**
(87) PCT číslo zveřejnění: **WO 2009/025793**

(21) Číslo dokumentu:

2010-180

(13) Druh dokumentu: **A3**

(51) Int. Cl.:

G01N 33/53 (2006.01)

G01N 33/02 (2006.01)

G01N 33/15 (2006.01)

(71) Přihlašovatel:
SENOMYX, INC, San Diego, California 92121, CA, US

(72) Původce:
Li Xiaodong, San Diego, CA 92130, CA, US
Patron Andrew, San Marcos, CA 92078, CA, US
Tachdjian Catherine, San Diego, CA 92122, CA, US
Xu Hong, San Diego, CA 92130, CA, US
Li Qing, San Diego, CA 92128, CA, US
Pronin Alexey, San Diego, CA 92126, CA, US
Servant Guy, San Diego, CA 92127, CA, US
Zhang Lan, San Diego, CA 92130, CA, US
Brady Thomas, San Diego, CA 92126, CA, US
Darmohusodo Vincent, San Diego, CA 92130, CA, US
Arellano Melissa, San Diego, CA 92130, CA, US
Selchau Victor, San Diego, CA 92129, CA, US
Ching Brett Weylan, San Diego, CA 92129, CA, US
Karnewsky Donald S., Escondido, CA 92029, CA, US
Brust Paul, San Diego, CA 92130, CA, US
Ling Jing, Carlsbad, CA 92011, CA, US
Zhao Wen, San Diego, CA 92122, CA, US
Priest Chad, Encinitas, CA 92024, CA, US

(74) Zástupce:
PATENTSERVIS Praha a.s., Jivenská 1273/1, Praha 4,
14021

blokátoru hořké chuti v kompozicích pro požití lidmi nebo
zvířaty.

(54) Název přihlášky vynálezu:

**Identifikace lidských T2R receptorů, které
reagují na hořké sloučeniny, které vyvolávají
hořkou chuť v kompozicích, a jejich použití v
testech pro identifikaci sloučenin, které
inhibují (blokuji) hořkou chuť v kompozicích
a jejich použití**

(57) Anotace:

Vynález se týká zjištění, že specifické lidské receptory ve skupině chuťových receptorů T2R reagují na konkrétní hořké sloučeniny přítomné např. v kávě. Vynález se také týká nalezení konkrétních sloučenin a kompozic obsahujících funkci blokování hořké chuti a jejich použití jako blokátorů hořké chuti nebo modulatorů příchuti, např. v kávě a v potravinách, nápojích a léčivech s příchutí kávy. Vynález se také týká nalezení sloučeniny, která antagonizuje mnoho různých lidských T2R a jejího použití v testech a jako

23.09.10

2010-180

1

IDENTIFIKACE LIDSKÝCH T2R RECEPTORŮ, KTERÉ REAGUJÍ NA HOŘKÉ SLOUČENINY, KTERÉ VYVOLÁVAJÍ HOŘKOU CHUŤ V KOMPOZICÍCH, A JEJICH POUŽITÍ V TESTECH PRO IDENTIFIKACI SLOUČENIN, KTERÉ INHIBUJÍ (BLOKUJÍ) HOŘKOU CHUŤ V KOMPOZICÍCH A JEJICH POUŽITÍ

PŘÍBUZNÉ PŘÍHLÁŠKY

[0001] Tato přihláška nárokuje prioritu z US prozatímní přihlášky č. 60/957,129 podané 21.srpna 2007 a US prozatímní přihlášky č. 61/047,187 podané 23.dubna 2008 a vztahuje se k US přihlášce č. 11/766,974, která je pokračovací přihláškou US přihlášky č. 11/555,617 podané 1.listopadu 2006, která je pokračovací přihláškou US přihlášky č. 10/191,058 podané 10.července 2002 a také pokračovací přihláškou US přihlášky č. 10/742,209 podané 1.prosince 2003, která je vyloučenou přihláškou z US přihlášky č. 09/825,882 podané 5.dubna 2001 a nyní US patentu č. 7,105,650, přičemž všechny tyto přihlášky jsou zde celé začleněny tímto odkazem.

OBLAST TECHNIKY

[0002] Tato přihláška se týká identifikace lidských chuťových receptorů typu 2 (hT2R) a jejich použití v testech pro identifikaci ligandů, které aktivují specifické T2R. Tyto ligandy jsou užitečné pro modulaci chuťového vjemu, zejména hořké chuti. V našich předchozích přihláškách vynálezů jsme popsali funkční expresi lidských receptorů hořké chuti, včetně hT2R8 a hT2R14. V této přihlášce vynálezu uvádíme, že hT2R8 a hT2R14 jsou aktivovány frakcí kávy se zesílenou hořkostí, dále uvádíme identifikaci antagonistů hT2R8 a hT2R14 za použití vysokopropustného screeningového testu a že kombinace antagonistů může snížit hořkou chuť kávy a kávových frakcí. Tento vynález poskytuje způsob modifikace a zlepšení chuti kávových nápojů.

[0003] Zejména se vynález týká použití hT2R8 a/nebo hT2R14 ve screeningových testech a chuťových testech pro identifikaci sloučenin, které inhibují (blokují) hořkou chuť kávy a dalších potravin a nápojů.

[0004] Vynález se rovněž týká nalezení ligandu, který má široké antagonistické vlastnosti vůči hořkosti, tj. významně blokuje nebo inhibuje aktivaci mnoha (13) různých receptorů hořkosti různými skupinami hořkých ligandů a blokuje nebo inhibuje aktivaci šesti dalších receptorů hořké chuti, jakož i hořkost vyvolanou některými hořkými sloučeninami, pro něž doposud nebyl(y) objasněn(y) receptor(y) hořkosti, s nímž(nimiž) interagují.

[0005] Konkrétněji se vynález týká nalezení ligandu, který je zde označován jako sloučenina C, který má široké antagonistické vlastnosti vůči hořkosti, tj. významně blokuje

nebo inhibuje aktivaci receptorů hořké chuti hT2R3, 7, 10, 14, 16, 44, 51, 55, 61, 63, 64, 65 a 71 různými skupinami ligandů a blokuje nebo inhibuje aktivaci šesti dalších receptorů hořké chuti, tj. hT2R5, 9, 13, 54, 67 a 75, jakož i hořkost vyvolanou některými hořkými sloučeninami, pro něž doposud nebyl(y) objasněn(y) receptor(y) hořkosti, s nímž(nímiž) interagují.

[0006] Dále se vynález také týká zjištění, že tato antagonistická sloučenina snižuje hořkou chuť salicinu, antagonisty hT2R16, a fenylothiomočoviny, antagonisty hT2R51.

[0007] Vynález konkrétněji také poskytuje zjištění, že tato stejná antagonistická sloučenina blokuje hořkou chuť vyvolanou hořkými sloučeninami, které aktivují mnohonásobné receptory hořké chuti, včetně omeprazolu, který aktivuje hT2R10, 14 a 75; Rebaudiosidu A, přírodního sladidla, které aktivuje alespoň 7 receptorů hořké chuti; a že tato stejná antagonistická sloučenina dále také inhibuje hořkou chuť vyvolanou hořkými sloučeninami, kde receptor(y) hořkosti, s nímž(nímiž) interaguje, je(jsou) neznámý(é), včetně dextromethorfanu a difenhydraminu.

[0008] Na základě toho se vynález týká použití této sloučeniny v potravinách, nápojích, léčivech a dalších poživatin za účelem zmírnění jejich hořké chuti, včetně hořké chuti vyvolané neidentifikovanými hořkými ligandy nebo sloučeninami, přičemž hořkost zahrnuje aktivaci mnohonásobných receptorů hořkosti, nebo pro hořké sloučeniny, u nichž není stanovena specifita jejich receptoru.

[0009] Na základě toho se vynález také týká použití tohoto antagonisty za účelem objasnění zachovaného motivu přítomného v různých lidských T2R, který se zapojuje do vázání ligandu a aktivace T2R, a návrhu chimérických a zmutovaných receptorů navázaných na G protein (GPCR), které jsou sestaveny tak, aby tento motiv obsahovaly.

[0010] Dále se vynález týká kterékoli sloučeniny identifikované za použití těchto screeningových testů a jejího použití v potravinách, nápojích a léčivech, včetně kávy a potravin a nápojů a léčiv s příchutí kávy.

POPIS SOUVISEJÍCÍHO STAVU TECHNIKY

[0011] Jedním ze základních chuťových vjemů, které lidé umí rozpoznat, je hořkost. Fyziologie hořké chuti nebyla donedávna zcela pochopena. Nedávné studie začaly objasňovat biologii chuti (Lindemann, Nature (2001)). Nyní je známo, že mnoho hořkých sloučenin produkuje hořkou chuť interakcí s receptory na buněčném povrchu. Tyto receptory patří do skupiny sedmi transmembránových doménových receptorů, které interagují s vnitrobuněčnými G proteiny. U lidí a hlodavců byla identifikována nová skupina GPCR, označovaná jako T2R (Adler a kol., Cell 100(6):693-702 (2000); Chandrashekar a kol., Cell

100(6): 703-711 (2000); Matsunami H, Montmayeur J P, Buck L B. *Nature* 404(6778): 601-4 (2000)). Pár řádků dokumentace před tímto vynálezem naznačilo, že T2R zprostředkovávají odpovědi na hořké sloučeniny. Za prvé, geny T2R jsou specificky exprimovány v podskupině buněk chuťových receptorů jazyka a epitelu patra. Za druhé, gen pro jeden z lidských T2R (hT2R1) je umístěn v chromozomálním loku, který je spojen s citlivostí k hořké sloučenině 6-n-propyl--2-thiouracilu u lidí (Adler a kol., (Id.) (2000)). Za třetí, jeden z myších T2R (mT2R5) je umístěn v chromozomálním loku, který je spojen s citlivostí k hořké sloučenině cykloheximidu u myši. Bylo rovněž známo, že mT2R5 mohou aktivovat gustducin, G protein specificky exprimovaný v chuťových buňkách a spojený s transdukcí hořkých stimulů (Wong a kol., *Nature* 381:796-800 (1996)). Aktivace gustducinu receptorem mT2R5 se odehrává pouze v odpověď na cykloheximid (Chandrashekar a kol., (Id.) (2000)). Proto bylo navrženo, že skupina mT2R zprostředkovává hořkou chuťovou odezvu u myši, zatímco skupina hT2R zprostředkovává hořkou chuťovou odezvu u lidí. Byl navržen pouze jeden lidský T2R, jakožto receptor, který má identifikovaný hořký ligand – bylo prokázáno, že hT2R4 je aktivován denatoniem (Chandrashekar a kol., (Id.) 2000). Avšak koncentrace denatonie použité ve studii (1,5 mM) byly neobvykle vysoké, tj. byly 10^5 -krát vyšší než je udávaná prahová hodnota hořkosti denatonie pro lidi (Sadili, *Naturwissenschaften* 71:428-429 (1984)). Proto nebyl k žádnému hT2R přesvědčivě přiřazen žádný konkrétní hořký ligand. Bylo také naznačeno, že každý hT2R je schopen vázat mnohonásobné hořké ligandy. Tato hypotéza je založena na skutečnosti, že skupina hT2R sestává pouze z 25 identifikovaných členů, zatímco lidé umí rozpoznat stovky různých sloučenin jakožto hořkých. O sekvencích hT2R bylo již dříve referováno a jsou popsány ve zveřejněných PCT přihláškách Zuckera a kol. (WO 01/18050 A2, (2001)) a Adlera a kol. (WO 01/77676 A1 (2001)), které jsou zde celé začleněny tímto odkazem.

[0012] Jedna z obtíží studia funkce T2R je, že tyto receptory se neexprimují snadno v kultivovaných savčích buněčných liniích. Pro zlepšení exprese T2R se k sekvencím T2R připojila N-koncová sekvence z dobře exprimovaného GPCR, rhodopsinu (Chandrashekar a kol., (Id.) 2000). Tato N-koncová značka rovněž umožnila snadné monitorování exprese proteinu díky dostupné protilátce. Navíc se pro zlepšení exprese T2R použila značka SSTR3 (Buře a kol., *Nat. Genet.* 32:397-400 (2002)), jiná N-koncová značka. Zatímco začlenění rhodopsinové značky zlepšilo expresi některých T2R v savčích buněčných liniích, mnoho z nich stále nebylo exprimováno dostatečně pro funkční studie. V jiné koncepci byl mT2R5 úspěšně exprimován ve hmyzích Sf9 buňkách a použit pro funkční studie za použití biochemického GTPyS vazebním testu (Chandrashekar a kol., (Id.) 2000).

[0013] Ve dřívější přihlášce vynálezu přihlašovatelů, US přihlášce č. 09/825,882, nyní patentu US č. 7,105,650, přihlašovatelé identifikovali a poskytli sekvence nukleových kyselin a polypeptidové sekvence pro mnoho tehdy nových lidských chuťových receptorů, včetně hT2R51, hT2R54, hT2R55, hT2R61, hT2R63, hT2R64, hT2R65, hT2R67, hT2R71 a hT2R75. Navíc v US přihláškách č. 11/182,942 a 10/628,464, které jsou zde celé začleněny tímto odkazem, poskytli přihlašovatelé polypeptidovou a DNA sekvenci pro další identifikovaný nový lidský chuťový receptor nazvaný hT2R76.

[0014] Také v US přihlášce č. 10/191,058, která je zde celá začleněna tímto odkazem, objevili přihlašovatelé ligandy, které specificky aktivují tři různé lidské T2R. Navíc přihlašovatelé nedávno podali US přihlášku vynálezu č. 11/455,693, která je zde celá začleněna tímto odkazem, která dále identifikovala hořké ligandy, které se specificky vážou na další lidské T2R, a poskytli příslušné testy.

[0015] Pokud jde o praktické využití vynálezu, je známo, že jak chuťové receptory T2R, tak T1R, se exprimují v gastrointestinálním systému. Například Wu a kol., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 99(4):2392-7(2002) uvádějí, že T2R jsou exprimovány v enterendokrinních buňkách (STC1 buňky), jakožto i gustducinové a transducinové podjednotky, a že tyto buňky pravděpodobně odpovídají na hořké ligandy v gastrointestinálním traktu. Také bylo zaznamenáno Chen a kol., *AM J. Physiol. Cell Physiol.* 291(4):C723-39 (2006), že podněty hořké chuti vyvolávají signalizaci Ca^{++} a uvolňování cholecystokininu (CCK) v enterendokrinních buňkách STC-1. Také Rozengurt, *A J Physiol Gastrointes Liver Physiol* 291(2):G171-7 (2006) uvádí, že chuťové receptory ve střevě pravděpodobně hrají roli v molekulární detekci řízení trávicích funkcí a hormonálních a/nebo neuronových cestách a že mohou hrát roli v detekci škodlivých léčiv a přeživacích odpovědích. Dále Stemini *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol.* 292(2):G457-61 (2007) uvádí, že chuťové receptory ve střevě se mohou účastnit gastrointestinálních funkcí, např. molekulární detekce, absorpce živin, ochrana před škodlivými látkami, a dále naznačují, že porozumění těmto mechanismům může být důležité pro chorobné stavy, např. poruchy stravování a záněty. Dále bylo nedávno naznačeno v Mace a kol., *J. Physiol.* 2007 (Epub), že T2R a T1R aktivují fosfolipázu C beta 2, PLC beta 2, a že ve střevě je pravděpodobně molekulární intestinální kontrolní systém podobný systému, který je v buňkách jazyku, a že gastrointestinální buňky, např. kartáčové buňky nebo osamocené chemosenzorické buňky exprimující chuťové receptory, mohou způsobit zvýšení GLUT2 a mohou hrát roli v detekci živin a ve výživě při léčbě obezity a diabetu. Také Cui a kol., *Curr Pharm Des.* 12(35):4591-600 (2006) naznačují, že T1R exprimované ve střevě mohou být použity v testech pro sloučeniny při léčbě obezity a diabetu, jakož i jako umělá sladidla.

[0016] Avšak nehledě na to, co bylo zaznamenáno, a nehledě na poznání, že členové T2R regulují hořkou chuť, a na jejich možnou roli v gastrointestinálních funkcích, stále zde existuje potřeba identifikace specifických ligandů, které aktivují lidské receptory T2R hořké chuti. Větší porozumění vazebným vlastnostem různých T2R, zejména lidského T2R, by bylo velmi prospěšné, protože to ohromně usnadní jejich použití při výběru sloučenin, které mají požadované vlastnosti modulace chuti, tj. které blokují nebo inhibují chuť specifických hořkých sloučenin. Také to zajistí identifikaci sloučenin pro léčbu a modulaci gastrointestinálních funkcí a příbuzných onemocnění, např. obezity, diabetes, absorpce potravy, vnímání potravy, poruch jedení, a pro regulaci příbuzných hormonů a peptidů, např. GLUT2, cholecystokininu atd.

PODSTATA VYNÁLEZU

[0017] Vynález se týká zjištění, že hT2R8 a hT2R14 jsou aktivovány frakcí kávy obohacenou hořkou chutí.

[0018] Vynález se rovněž týká jejich použití pro identifikaci antagonistů hT2R8 a hT2R14, které inhibují nebo blokují hořkou chuť kávy nebo potravin, nápojů a léčiv s příchutí kávy.

[0019] Dále se vynález týká specifických antagonistických sloučenin (blokátorů hořkosti), které inhibují hořkou chuť kávy a dalších potravin, nápojů a léčiv s příchutí kávy.

[0020] Tento vynález se také týká nalezení ligandu, který má široké antagonistické vlastnosti vůči hořkosti, tj. významně blokuje nebo inhibuje aktivaci mnoha (13) různých receptorů hořkosti různými skupinami hořkých ligandů a blokuje nebo inhibuje aktivaci šesti dalších receptorů hořké chuti a inhibuje hořkost vyvolanou některými hořkými sloučeninami, jejichž receptory hořkosti, s nimiž interagují, zatím nebyly objasněny.

[0021] Konkrétněji se tento vynález týká objevení ligandu, který je zde nazýván sloučenina C a který má široké antagonistické vlastnosti vůči hořkosti, tj. významně blokuje nebo inhibuje aktivaci receptorů hořké chuti hT2R3, 7, 10, 14, 16, 44, 51, 55, 61, 63, 64, 65 a 71 různými skupinami hořkých ligandů a blokuje nebo inhibuje aktivaci šesti dalších receptorů hořké chuti, tj. hT2R5, 9, 13, 54, 67 a 75, jakož i hořkost vyvolanou některými hořkými sloučeninami, jejichž receptor(y) hořkosti, s nímž(nimiž) interagují, zatím nebyl(y) objasněn(y).

[0022] Konkrétněji vynález rovněž poskytuje zjištění, že tato antagonistická sloučenina snižuje hořkou chuť salicinu, antagonisty hT2R16, a fenylothiomočoviny, hT2R51.

[0023] Dále se tento vynález týká zjištění, že tato antagonistická sloučenina blokuje hořkou chuť vyvolanou hořkými sloučeninami, které aktivují násobné receptory hořké chuti,

včetně omeprazolu, sloučeniny, která aktivuje hT2R10, 14 a 75; rebaudiosidu A, přirozeného sladidla, které aktivuje alespoň 7 receptorů hořké chuti; a že tato stejná antagonistická sloučenina dále také inhibuje hořkou chuť vyvolanou hořkými sloučeninami, jejichž receptor(y) hořkosti, s nímž(nimiž) interagují, není(nejsou) znám(y), včetně dextromethorfanu a difenhydraminu.

[0024] Na základě toho se vynález týká použití této sloučeniny a příbuzných sloučenin, podle vynálezu, v potravinách, nápojích, léčivech a dalších poživatinách za účelem zeslabení jejich hořké chuti, včetně hořké chuti vyvolané neidentifikovanými hořkými ligandy nebo sloučeninami, přičemž hořkost zahrnuje aktivaci násobných receptorů hořkosti nebo hořkých sloučenin, kde specifita jejich receptoru není stanovena.

[0025] Vynález se také týká potravin, nápojů a léčiv, které obsahují množství alespoň jedné z identifikovaných antagonistických sloučenin hořkosti dostatečné k inhibici nebo blokaci jejich hořké chuti.

[0026] Vynález byl vynalezen za použití buněčných testů, které měřily aktivitu T2R za použití buněk, které exprimují konkrétní T2R v přítomnosti a v nepřítomnosti specifických hořkých ligandů. Zejména, jak je detailněji popsáno níže, se v buněčných testech použily buněčné linie HEK exprimující výše uvedené specifické T2R na svém povrchu a které dále exprimovaly chimérický G protein, který se funkčně váže k těmto T2R, přičemž testy detekovaly změny ve vnitrobuněčné koncentraci vápníku. Zjistilo se, že jsou tyto T2R aktivovány specifickými hořkými sloučeninami, zatímco jiné hT2R nebyly za podobných podmínek aktivovány.

[0027] Proto vynález zahrnuje použití těchto lidských receptorů chuti v testech, s výhodou ve vysokopropustných testech (HT), za účelem identifikace jiných sloučenin, které modulují, s výhodou blokují, aktivaci těchto receptorů těmito nebo jinými hořkými sloučeninami přítomnými v kávě a podobných potravinách nebo nápojích.

[0028] Vynález se také týká použití těchto receptorů pro identifikaci sloučenin, zejména sloučenin přítomných v kávě a potravinách, nápojích a léčivech s příchutí kávy, které vyvolávají hořkou chuť.

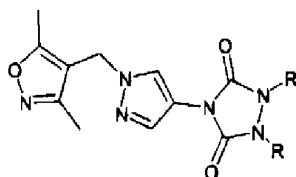
[0029] Vynález se rovněž týká použití antagonistické sloučeniny, která disponuje širokým rozmezím antagonistických vlastností, pro in vitro testy a in vivo chuťové testy za účelem identifikace hořké sloučeniny (hořkých sloučenin) nebo hořkých frakcí, jimž tato sloučenina inhibuje hořkou chuť jimi vyvolanou a/nebo inhibuje aktivaci jednoho nebo více receptorů hořké chuti hořkou sloučeninou nebo frakcí, která tuto hořkou sloučeninu obsahuje.

[0030] Dále se vynález konkrétně týká použití tohoto antagonisty s širokou působností v potravinách, nápojích, léčivech a dalších jedlých produktech pro požívání lidmi nebo zvířaty, kde je hořká chuť vhodně zeslabena.

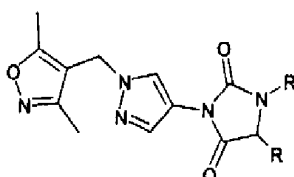
[0031] Vynález také zahrnuje testy, které obsahují přídatný krok, který hodnotí účinek identifikovaných modulujících sloučenin v lidských a dalších chuťových testech, a zejména hodnotí účinek identifikovaných sloučenin na hořkou chuť, zejména hořkou chuť vyvolanou kávou a frakcemi odvozenými z kávy obsahujícími jednu nebo více sloučenin, které vyvolávají vjem hořké chuti.

[0032] Dále vynález zahrnuje výrobu kávy a potravin, nápojů a léčiv s příchutí kávy, které byly ošetřeny za účelem odstranění sloučenin, které specificky aktivují tyto receptory hořké chuti, např. potravin a nápojů, které byly zpracovány za účelem odstranění nebo snížení množství v nich obsažených hořkých sloučenin.

[0033] V některých aspektech se vynález také týká strukturních tříd sloučenin, které představují níže uvedené dva scaffoldy. Scaffold 1 znázorňuje představitele urazolového scaffoldu a scaffold 2 znázorňuje představitele hydantoinového scaffoldu.



Scaffold 1



Scaffold 2

[0034] Dalším specifickým předmětem vynálezu je použití sloučenin znázorněných výše a analogů scaffoldu 1 a scaffoldu 2 jako blokátorů hořkosti za účelem snížení hořkosti v potravinářských/farmaceutických aplikacích, které jsou zprostředkovány receptory T2R8, zejména v kávě a potravinách, nápojích a léčivech s příchutí kávy.

[0035] Dalším předmětem vynálezu je potvrdit, že identifikované sloučeniny modulují, s výhodou inhibují nebo blokují, hořkou chuť, např. kterou vyvolává káva a potraviny, nápoje a léčiva s příchutí kávy, v lidských nebo zvířecích chuťových testech, s výhodou v lidských chuťových testech. Příklad 1 znázorňuje příklad smyslových údajů pro jednu z těchto sloučenin. Údaje jasně prokazují významný pokles hořkosti pro specifického antagonistu T2R8 a výrazné zvýšení účinnosti oproti známému blokátoru hořkosti T2R8.

[0036] Dalším předmětem vynálezu je využití sloučenin zde uváděných jako aditiva nebo modulatory příchuti v kompozicích za účelem inhibice nebo blokace hořké chuti vyvolané sloučeninami, které specificky aktivují tyto chuťové receptory. Výhodným předmětem

vynálezu je použití sloučeniny, která inhibuje aktivaci receptorů T2R8 za účelem blokace hořké chuti sloučenin přítomných v kávě a potravinách, nápojích a léčivech s příchutí kávy.

[0037] Sloučeniny identifikované podle vynálezu se mohou přidat do potravin, nápojů, kosmetiky nebo léčebných kompozic pro modulování, s výhodou blokování hořké chuti spuštěné aktivací hT2R8 hořkými sloučeninami přítomnými v kávě a příbuzných potravinách, nápojích a léčivech nebo strukturně podobnými sloučeninami nebo jinými hořkými sloučeninami, např. sloučeninami, které se nalézají v potravinách a nápojích nebo léčivech nebo v kosmetice a které vyvolávají vjem hořké chuti.

PŘEDMĚTY VYNÁLEZU

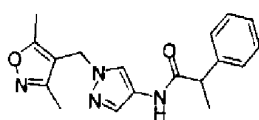
[0038] Předmětem vynálezu je poskytnout testy, které využívají hT2R8 a/nebo hT2R14 a jejich chiméry a varianty, které identifikují sloučeniny a kompozice obsahující tyto sloučeniny, které vyvolávají nebo blokují hořkou chuť spojenou s kávou a potravinami, nápoji a léčivy s příchutí kávy.

[0039] Specifickým předmětem vynálezu je poskytnout testy, které identifikují sloučeniny, které aktivují nebo které blokují nebo modulují aktivaci a/nebo vázání hT2R8 na sloučeniny nebo kompozice, které je obsahují, zodpovědné za hořkou chuť kávy.

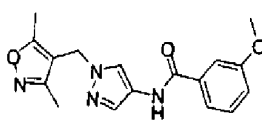
[0040] Rovněž je specifickým předmětem vynálezu poskytnout testy, které identifikují sloučeniny, které aktivují nebo které blokují nebo modulují aktivaci a/nebo vázání hT2R14 na sloučeniny nebo kompozice, které je obsahují, zodpovědné za hořkou chuť kávy.

[0041] Dalším specifickým předmětem vynálezu je poskytnout specifické sloučeniny identifikované za použití testů podle vynálezu a kompozice, které je obsahují, zejména kávu a potraviny, nápoje a léčiva s příchutí kávy.

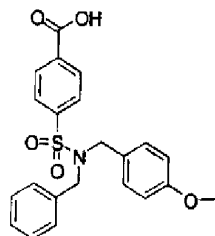
[0042] Specifickým předmětem vynálezu je poskytnout sloučeniny znázorněné níže, které jsou antagonisty T2R8 a T2R14 a o nichž bylo prokázáno, že blokují hořkost kávy.



Sloučenina A
 $IC_{50} = 0,3 \text{ uM (hT2R08)}$



Sloučenina B
 $IC_{50} = 0,4 \text{ uM (hT2R08)}$



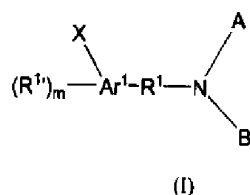
Sloučenina C
 $IC_{50} = 0,2 \text{ uM (hT2R014)}$

[0043] Dalším předmětem vynálezu je použití sloučenin znázorněných výše a analogů sloučeniny A, sloučeniny B a sloučeniny C jako blokátorů hořkosti za účelem snížení hořkosti v potravinářských/farmaceutických aplikacích, která je zprostředkována receptory T2R8 a/nebo T2R14, zejména v kávě a v potravinách, nápojích a léčivech s příchutí kávy.

[0044] Dalším specifickým předmětem vynálezu je použití sloučeniny C a jejích analogů jakožto blokátorů hořkosti s širokou působností za účelem snížení hořkosti v potravinářských/farmaceutických aplikacích, která je zprostředkována kterýmkoli z lidských T2R3, 7, 10, 14, 16, 44, 51, 55, 61, 63, 64, 65 nebo 71 a/nebo lidským T2R5, 9, 13, 54, 67 nebo 75, v potravinách, nápojích a léčivech obsahujících četné hořké sloučeniny, hořké sloučeniny, které interagují s mnohonásobnými receptory hořké chuti nebo kompozice obsahující neznámé hořké sloučeniny nebo hořké sloučeniny, jejichž specifita receptoru není známa.

[0045] Dalším specifickým předmětem vynálezu je poskytnutí sloučenin, které mohou být znázorněny následujícími vzorci.

[0046] V prvním aspektu je poskytnuta sloučenina dle strukturního vzorce (I):



nebo její sůl, hydrát, solvát nebo N-oxid, kde:

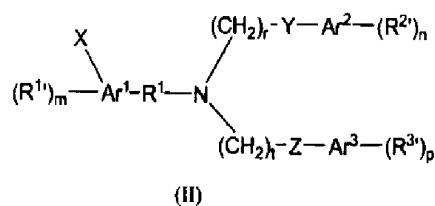
Ar¹ je pěti- nebo šestičlenný arylový, heteroarylový nebo cykloalkylový kruh;

m je 0, 1, 2 nebo 3;

R¹ je SO₂; C=O; C=S; nebo C=NOR⁴;

X je vybráno ze skupiny sestávající z vodíku, halogenu, alkylu, substituovaného alkylu, arylu, substituovaného arylu, arylalkylu, substituovaného arylalkylu, acylu, substituovaného acylu, heteroalkylu, substituovaného heteroalkylu, heteroarylu, substituovaného heteroarylu, heteroarylalkylu, substituovaného heteroarylalkylu, CN, NO₂, OR⁶, S(O)_hR⁶, NR⁶R⁷, CONR⁶R⁷, CO₂R⁶, NR⁶CO₂R⁷, NR⁶CONR⁷R⁸, NR⁶CSNR⁷R⁸, NR⁶C(=NH)NR⁷R⁸, SO₂NR⁵R⁶, NR⁵SO₂R⁶, NR⁵SO₂NR⁶R⁷, B(OR⁵)(OR⁶), P(O)(OR⁵)(OR⁶) a P(O)(R⁵)(OR⁶);

každý R¹ je nezávisle zvolen ze skupiny sestávající z vodíku, halogenu, alkylu, substituovaného alkylu, arylu, substituovaného arylu, arylalkylu, substituovaného arylalkylu,



nebo jejich sůl, hydrát, solvát nebo N-oxid, kde:

Ar^1 , Ar^2 a Ar^3 jsou nezávisle pěti- nebo šestičlenný arylový, heteroarylový nebo cykloalkylový kruh;

m je 0, 1, 2 nebo 3;

n a p jsou nezávisle 0, 1, 2, 3 nebo 4;

r a t jsou nezávisle 0, 1 nebo 2;

Y a Z jsou nezávisle vybrány ze skupiny sestávající z CR^6R^7 , $\text{C}=\text{O}$, $\text{C}=\text{S}$, $\text{C}=\text{NOR}^6$, O , NR^6 a $\text{S}(\text{O})_b$;

R^1 je vybrán ze skupiny sestávající z SO_2 , $\text{C}=\text{O}$, $\text{C}=\text{S}$ a $\text{C}=\text{NOR}^4$;

X je vybrán ze skupiny sestávající z vodíku, alkylu, substituovaného alkylu, arylu, substituovaného arylu, arylalkylu, substituovaného arylalkylu, acylu, substituovaného acylu, heteroalkylu, substituovaného heteroalkylu, heteroarylu, substituovaného heteroarylu, heteroarylalkylu, substituovaného heteroarylalkylu, CN , NO_2 , $-\text{OR}^6$, $\text{S}(\text{O})_b\text{R}^6$, NR^6R^7 , CONR^6R^7 , CO_2R^6 , $\text{NR}^6\text{CO}_2\text{R}^7$, $\text{NR}^6\text{CONR}^7\text{R}^8$, $\text{NR}^6\text{CSNR}^7\text{R}^8$, $\text{NR}^6\text{C}(=\text{NH})\text{NR}^7\text{R}^8$, $\text{SO}_2\text{NR}^5\text{R}^6$, $\text{NR}^5\text{SO}_2\text{R}^6$, $\text{NR}^5\text{SO}_2\text{NR}^6\text{R}^7$, $\text{B}(\text{OR}^5)(\text{OR}^6)$, $\text{P}(\text{O})(\text{OR}^5)(\text{OR}^6)$ a $\text{P}(\text{O})(\text{R}^5)(\text{OR}^6)$;

X je s výhodou vybrán ze skupiny sestávající z vodíku, heteroalkylu, heteroarylu, substituovaného heteroarylu, heteroarylalkylu, substituovaného heteroarylalkylu, CN , $\text{S}(\text{O})_b\text{R}^6$, CONR^6R^7 , $-\text{CO}_2\text{R}^6$, $\text{SO}_2\text{NR}^5\text{R}^6$, $\text{NR}^5\text{SO}_2\text{R}^6$, $\text{NR}^5\text{SO}_2\text{NR}^6\text{R}^7$, $\text{B}(\text{OR}^5)(\text{OR}^6)$, $\text{P}(\text{O})(\text{OR}^5)(\text{OR}^6)$ a $\text{P}(\text{O})(\text{R}^5)(\text{OR}^6)$;

každý R^1 je nezávisle zvolen ze skupiny sestávající z vodíku, halogenu, alkylu, substituovaného alkylu, arylu, substituovaného arylu, arylalkylu, substituovaného arylalkylu, acylu, substituovaného acylu, heteroalkylu, substituovaného heteroalkylu, heteroarylu, substituovaného heteroarylu, heteroarylalkylu, substituovaného heteroarylalkylu, CN , NO_2 , OR^6 , $\text{S}(\text{O})_b\text{R}^6$, NR^6R^7 , CONR^6R^7 , CO_2R^6 , $\text{NR}^6\text{CO}_2\text{R}^7$, $\text{NR}^6\text{CONR}^7\text{R}^8$, $\text{NR}^6\text{CSNR}^7\text{R}^8$, $\text{NR}^6\text{C}(=\text{NH})\text{NR}^7\text{R}^8$, $\text{SO}_2\text{NR}^5\text{R}^6$, $\text{NR}^5\text{SO}_2\text{R}^6$, $\text{NR}^5\text{SO}_2\text{NR}^6\text{R}^7$, $\text{B}(\text{OR}^5)(\text{OR}^6)$, $\text{P}(\text{O})(\text{OR}^5)(\text{OR}^6)$ a $\text{P}(\text{O})(\text{R}^5)(\text{OR}^6)$;

každý R^2 je nezávisle zvolen ze skupiny sestávající z vodíku, halogenu, alkylu, substituovaného alkylu, arylu, substituovaného arylu, arylalkylu, substituovaného arylalkylu, acylu, substituovaného acylu, heteroalkylu, substituovaného heteroalkylu, heteroarylu,

m je 0, 1, 2 nebo 3;

n a p jsou nezávisle 0, 1, 2, 3 nebo 4;

každý $R^{1'}$ je nezávisle vybrán ze skupiny sestávající z vodíku, halogenu, alkylu, substituovaného alkylu, arylu, substituovaného arylu, arylalkylu, substituovaného arylalkylu, acylu, substituovaného acylu, heteroalkylu, substituovaného heteroalkylu, heteroarylu, substituovaného heteroarylu, heteroarylalkylu, substituovaného heteroarylalkylu, CN, NO₂, OR⁶, S(O)_nR⁶, NR⁶R⁷, CONR⁶R⁷, CO₂R⁶, NR⁶CO₂R⁷, NR⁶CONR⁷R⁸, NR⁶CSNR⁷R⁸, NR⁶C(=NH)NR⁷R⁸, SO₂NR⁵R⁶, NR⁵SO₂R⁶, NR⁵SO₂NR⁶R⁷, B(OR⁵)(OR⁶), P(O)(OR⁵)(OR⁶) a P(O)(R⁵)(OR⁶);

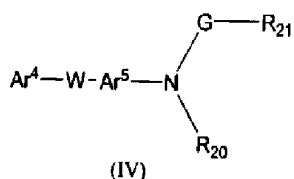
každý $R^{2'}$ je nezávisle zvolen ze skupiny sestávající z vodíku, halogenu, alkylu, substituovaného alkylu, arylu, substituovaného arylu, arylalkylu, substituovaného arylalkylu, acylu, substituovaného acylu, heteroalkylu, substituovaného heteroalkylu, heteroarylu, substituovaného heteroarylu, heteroarylalkylu, substituovaného heteroarylalkylu, CN, NO₂, OR⁶, S(O)_nR⁶, NR⁶R⁷, CONR⁶R⁷, CO₂R⁶, NR⁶CO₂R⁷, NR⁶CONR⁷R⁸, NR⁶CSNR⁷R⁸, NR⁶C(=NH)NR⁷R⁸, SO₂NR⁵R⁶, NR⁵SO₂R⁶, NR⁵SO₂NR⁶R⁷, B(OR⁵)(OR⁶), P(O)(OR⁵)(OR⁶) a P(O)(R⁵)(OR⁶);

každý $R^{3'}$ je nezávisle zvolen ze skupiny sestávající z vodíku, halogenu, alkylu, substituovaného alkylu, arylu, substituovaného arylu, arylalkylu, substituovaného arylalkylu, acylu, substituovaného acylu, heteroalkylu, substituovaného heteroalkylu, heteroarylu, substituovaného heteroarylu, heteroarylalkylu, substituovaného heteroarylalkylu, CN, NO₂, OR⁶, S(O)_nR⁶, NR⁶R⁷, CONR⁶R⁷, CO₂R⁶, NR⁶CO₂R⁷, NR⁶CONR⁷R⁸, NR⁶CSNR⁷R⁸, NR⁶C(=NH)NR⁷R⁸, SO₂NR⁵R⁶, NR⁵SO₂R⁶, NR⁵SO₂NR⁶R⁷, B(OR⁵)(OR⁶), P(O)(OR⁵)(OR⁶) a P(O)(R⁵)(OR⁶);

R^5 , R^8 jsou nezávisle vodík, alkyl, substituovaný alkyl, aryl, substituovaný aryl, arylalkyl, substituovaný arylalkyl, heteroalkyl, substituovaný heteroalkyl, heteroaryl, substituovaný heteroaryl, heteroarylalkyl nebo substituovaný heteroarylalkyl nebo alternativně R^5 a R^6 , R^6 a R^7 , R^7 a R^8 , spolu s atomy, na něž jsou vázány, tvoří cykloheteroalkylový nebo substituovaný cykloheteroalkylový kruh;

b je 0, 1 nebo 2.

[0050] V ještě dalším aspektu vynález poskytuje sloučeninu dle níže uvedeného vzorce:



nebo její sůl, hydrát, solvát nebo N-oxid, kde:

Ar^4 a Ar^5 jsou nezávisle pěti- nebo šestičlenný arylový nebo heteroarylový kruh;

W je vybrán ze skupiny sestávající z CR^6R^7 , $\text{C}=\text{O}$, $\text{C}=\text{S}$, $\text{C}=\text{NOR}^6$; O, NR^6 , S, SO , SO_2 a $(\text{CH}_2)_n$;

n je 0, 1, 2 nebo 3;

G je vybrán ze skupiny sestávající z CR^6R^7 , $\text{C}=\text{O}$, $\text{C}=\text{S}$, $\text{C}=\text{NOR}^6$ a $\text{S}(\text{O})_b$;

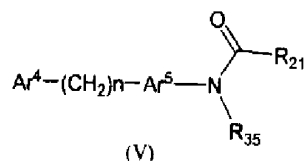
R_{20} je vybrán ze skupiny sestávající z vodíku, arylalkenylu, heteroarylalkenylu, arylalkylu, heteroarylalkylu, arylu, heteroarylu, alkylu, alkoxy-alkylu, alkenylu, cykloalkylu, cykloalkenylu a substituovaných derivátů;

R_{21} je vybrán ze skupiny sestávající z arylalkenylu, heteroarylalkenylu, arylalkylu, heteroarylalkylu, arylu, heteroarylu, alkylu, alkoxy-alkylu, alkenylu, cykloalkylu, cykloalkenylu a substituovaných derivátů;

R^6 a R^7 jsou nezávisle vybrány ze skupiny sestávající z vodíku, alkylu, substituovaného alkylu, arylu, substituovaného arylu, arylalkylu, substituovaného arylalkylu, heteroalkylu, substituovaného heteroalkylu, heteroarylu, substituovaného heteroarylu, heteroarylalkylu nebo substituovaného heteroarylalkylu nebo alternativně R^6 a R^7 , R^7 a R^8 , spolu s atomy, na něž jsou navázány, tvoří cykloheteroalkylový nebo substituovaný cykloheteroalkylový kruh; a

b je 0, 1 nebo 2.

[0054] V dalším podobném aspektu je poskytnuta sloučenina dle strukturního vzorce (V):



nebo její sůl, hydrát, solvát nebo N-oxid, kde:

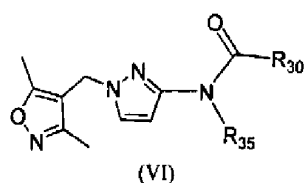
Ar^4 a Ar^5 jsou nezávisle pěti- nebo šestičlenný arylový nebo heteroarylový kruh;

n je 0, 1, 2 nebo 3;

R^{21} je vybrán ze skupiny sestávající z arylalkenylu, heteroarylalkenylu, arylalkylu, hereoarylalkylu, arylu, heteroarylu, alkylu, alkoxy-alkylu, alkenylu, cykloalkylu, cykloalkenylu a substituovaných derivátů;

R^{35} je vybrán ze skupiny sestávající z vodíku, alkylu a substituovaného alkylu.

[0055] V ještě dalších provedeních vynálezu je poskytnuta sloučenina dle strukturního vzorce (VI):

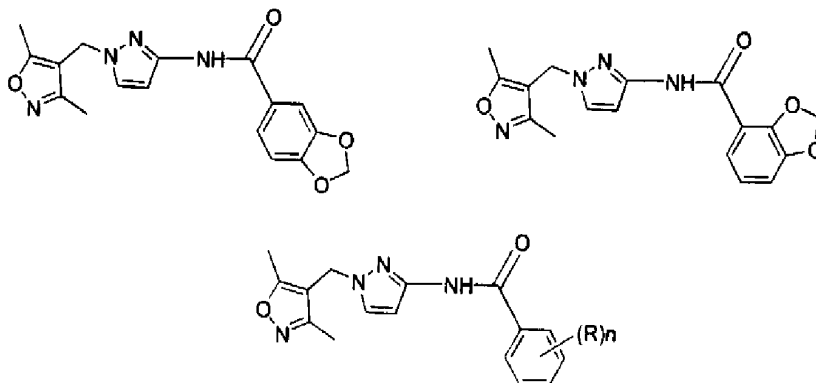


nebo její sůl, hydrát, solvát nebo N-oxid, kde:

R^{30} je vybrán ze skupiny sestávající z arylalkenylu, heteroarylalkenylu, arylalkylu, hereoarylalkylu, arylu, heteroarylu, alkylu, alkoxy-alkylu, alkenylu, cykloalkylu, cykloalkenylu a substituovaných derivátů;

R^{35} je vybrán ze skupiny sestávající z vodíku, alkylu a substituovaného alkylu.

[0056] V ještě dalších provedeních vynález poskytuje sloučeniny mající následující struktury:



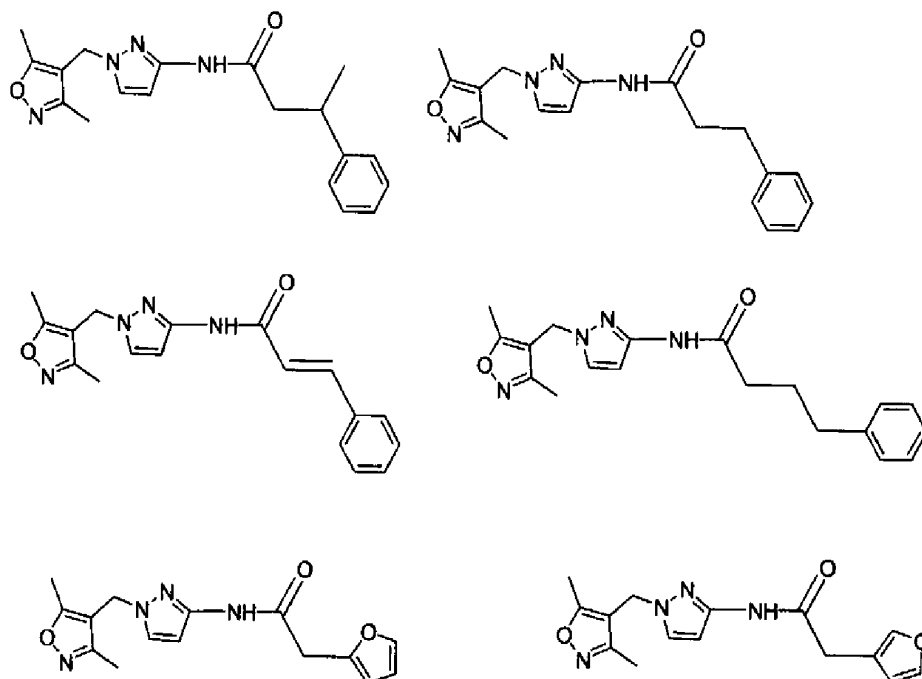
nebo jejich sůl, hydrát, solvát nebo N-oxid,

kde každý R je nezávisle Cl, MeO, CN, EtO, OH, Me, $-SO_2Me$, F nebo H a

n je 0, 1, 2, 3 nebo 4

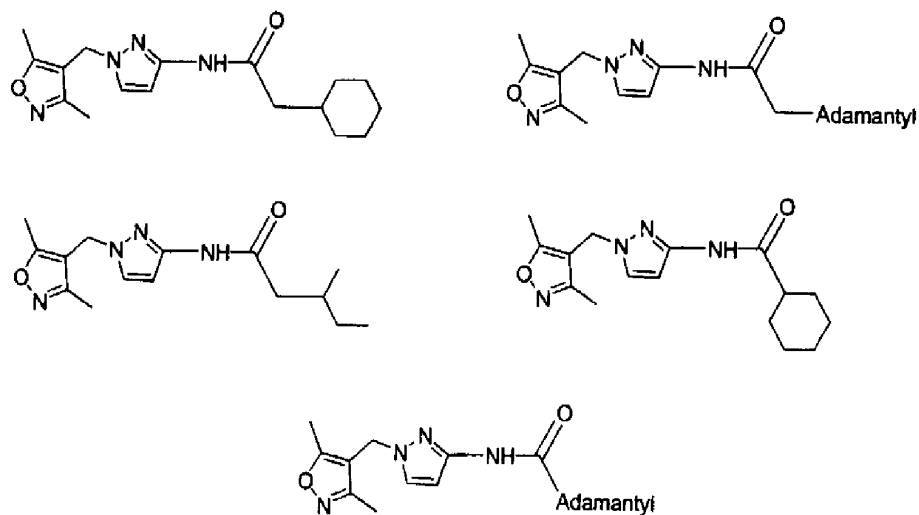
[0057] V ještě dalších provedeních vynález poskytuje sloučeniny mající strukturu uvedenou níže:

18



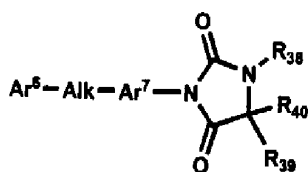
nebo jejich sůl, hydrát, solvát nebo N-oxid.

[0061] V ještě dalších provedeních vynález poskytuje sloučeniny mající níže uvedenou strukturu:



nebo její sůl, hydrát, solvát nebo N-oxid.

[0062] V ještě dalších provedeních vynález poskytuje sloučeniny mající níže uvedenou strukturu:



nebo jeho sůl, hydrát, solvát, N-oxid nebo proléčivo,

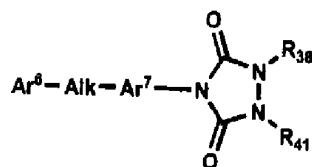
kde Ar^6 a Ar^7 jsou stejná nebo odlišná, nezávisle na sobě, pěti- nebo šestičlenná arylová skupina nebo pěti- nebo šestičlenná heteroarylová skupina;

Alk je alkylová skupina, případně přerušená heteroatomem;

R_{38} je H, substituovaný nebo nesubstituovaný alkyl, substituovaný nebo nesubstituovaný cykloalkylalkyl, substituovaný nebo nesubstituovaný heterocykloalkylalkyl, substituovaný nebo nesubstituovaný aryl, substituovaný nebo nesubstituovaný arylamidoalkyl, substituovaný nebo nesubstituovaný heteroarylamidoalkyl, substituovaný nebo nesubstituovaný arylalkyl, substituovaný nebo nesubstituovaný arylalkoxy, substituovaný nebo nesubstituovaný heteroaryl, substituovaný nebo nesubstituovaný heteroarylalkyl nebo haloalkyl; a

R_{39} a R_{40} jsou stejné nebo odlišné, nezávisle na sobě, H, substituovaný nebo nesubstituovaný alkyl, substituovaný nebo nesubstituovaný cykloalkylalkyl, substituovaný nebo nesubstituovaný heterocykloalkylalkyl, substituovaný nebo nesubstituovaný aryl, substituovaný nebo nesubstituovaný arylamidoalkyl, substituovaný nebo nesubstituovaný arylalkylamidoalkyl, substituovaný nebo nesubstituovaný heteroarylamidoalkyl, substituovaný nebo nesubstituovaný heteroarylalkylamidoalkyl, substituovaný nebo nesubstituovaný arylalkyl, substituovaný nebo nesubstituovaný arylalkoxy, substituovaný nebo nesubstituovaný heteroaryl, substituovaný nebo nesubstituovaný heteroarylalkyl, haloalkyl, nebo R_{39} a R_{40} , spolu s uhlíkovým atomem, k němuž jsou připojeny, tvoří skupinu $\text{C}=\text{O}$ nebo substituovanou nebo nesubstituovanou alkenylovou skupinu.

[0066] V dalším aspektu sloučeniny podle vynálezu obsahují pěti-členný heterocyklus, kterým je urazol. V jednom provedení je urazolem urazol dle vzorce:



nebo jeho sůl, hydrát, solvát, N-oxid nebo proléčivo,

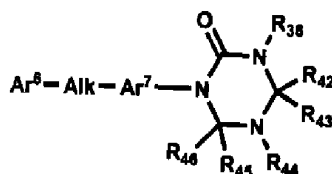
kde Ar^6 a Ar^7 jsou stejná nebo odlišná, nezávisle na sobě, pěti- nebo šestičlenná arylová skupina nebo pěti- nebo šestičlenná heteroarylová skupina;

Alk je alkylová skupina, případně přerušená heteroatomem;

R_{38} je H, substituovaný nebo nesubstituovaný alkyl, substituovaný nebo nesubstituovaný cykloalkylalkyl, substituovaný nebo nesubstituovaný heterocykloalkylalkyl, substituovaný nebo nesubstituovaný aryl, substituovaný nebo nesubstituovaný arylamidoalkyl, substituovaný nebo nesubstituovaný heteroarylamidoalkyl, substituovaný nebo nesubstituovaný arylalkyl, substituovaný nebo nesubstituovaný arylalkoxy, substituovaný nebo nesubstituovaný heteroaryl, substituovaný nebo nesubstituovaný heteroarylalkyl, nebo haloalkyl; a

R_{41} je H, substituovaný nebo nesubstituovaný alkyl, substituovaný nebo nesubstituovaný cykloalkylalkyl, substituovaný nebo nesubstituovaný heterocykloalkylalkyl, substituovaný nebo nesubstituovaný aryl, substituovaný nebo nesubstituovaný arylamidoalkyl, substituovaný nebo nesubstituovaný arylalkylamidoalkyl, substituovaný nebo nesubstituovaný heteroarylamidoalkyl, substituovaný nebo nesubstituovaný heteroarylalkylamidoalkyl, substituovaný nebo nesubstituovaný arylalkyl, substituovaný nebo nesubstituovaný arylalkoxy, substituovaný nebo nesubstituovaný heteroaryl, substituovaný nebo nesubstituovaný heteroarylalkyl, nebo haloalkyl.

[0067] V dalším aspektu sloučeniny podle vynálezu obsahují šestičlenný heterocyklus. V jednom provedení má šestičlenný heterocyklus vzorec:



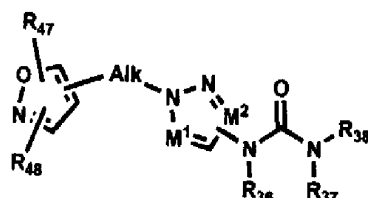
nebo jeho sól, hydrát, solvát, N-oxid nebo proléčivo,

kde R_{38} je H, substituovaný nebo nesubstituovaný alkyl, substituovaný nebo nesubstituovaný cykloalkylalkyl, substituovaný nebo nesubstituovaný heterocykloalkylalkyl, substituovaný nebo nesubstituovaný aryl, substituovaný nebo nesubstituovaný arylamidoalkyl, substituovaný nebo nesubstituovaný heteroarylamidoalkyl, substituovaný nebo nesubstituovaný arylalkyl, substituovaný nebo nesubstituovaný arylalkoxy, substituovaný nebo nesubstituovaný heteroaryl, substituovaný nebo nesubstituovaný heteroarylalkyl, nebo haloalkyl; a

R_{42} , R_{43} , R_{44} , R_{45} , a R_{46} jsou stejné nebo odlišné, nezávisle na sobě, H, substituovaný nebo nesubstituovaný alkyl, substituovaný nebo nesubstituovaný cykloalkylalkyl, substituovaný nebo nesubstituovaný arylalkyl, substituovaný nebo nesubstituovaný

arylalkoxy, substituovaný nebo nesubstituovaný heteroaryl, substituovaný nebo nesubstituovaný heteroarylalkyl, nebo R_{42} a R_{43} , nebo R_{45} a R_{46} , spolu s uhlíkovým atomem, k němuž jsou připojeny, tvoří skupinu $C=O$.

[0068] V dalším aspektu se vynález týká sloučeniny dle vzorce:



nebo její soli, hydrátu, solvátu, N-oxidu nebo proléčiva,

kde Alk je alkylová skupina, případně přerušená heteroatomem;

M^1 je N nebo CR_{49} , kde R_{49} je H nebo substituovaný nebo nesubstituovaný alkyl;

M^2 je N nebo CR_{50} , kde R_{50} je H nebo substituovaný nebo nesubstituovaný alkyl;

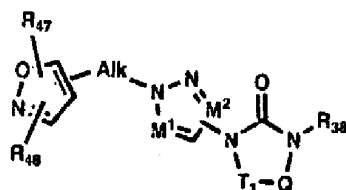
R_{36} a R_{37} jsou stejné nebo odlišné, nezávisle na sobě, H, alkyl, nebo, R_{36} a R_{37} , spolu s atomy, k nimž jsou připojeny, tvoří případně substituovaný pěti- nebo šestičlenný heterocyklus; a

R_{38} je H, substituovaný nebo nesubstituovaný alkyl, substituovaný nebo nesubstituovaný cykloalkylalkyl, substituovaný nebo nesubstituovaný heterocykloalkylalkyl, substituovaný nebo nesubstituovaný aryl, substituovaný nebo nesubstituovaný arylamidoalkyl, substituovaný nebo nesubstituovaný heteroarylamidoalkyl, substituovaný nebo nesubstituovaný arylalkyl, substituovaný nebo nesubstituovaný arylalkoxy, substituovaný nebo nesubstituovaný heteroaryl, substituovaný nebo nesubstituovaný heteroarylalkyl, nebo haloalkyl;

R_{47} je H, substituovaný nebo nesubstituovaný alkyl, substituovaný nebo nesubstituovaný alkoxy, substituovaný nebo nesubstituovaný aryl, substituovaný nebo nesubstituovaný arylalkyl, nebo halo; a

R_{48} je H, substituovaný nebo nesubstituovaný alkyl, substituovaný nebo nesubstituovaný alkoxy, substituovaný nebo nesubstituovaný aryl, substituovaný nebo nesubstituovaný arylalkyl, nebo halo.

[0069] V ještě dalším aspektu se vynález týká sloučeniny dle vzorce:



nebo její soli, hydrátu, solvátu, N-oxidu nebo proléčiva,

kde Alk je alkylová skupina, případně přerušená heteroatomem;

T₁ je C=O a Q je CR₅₁R₅₂ nebo NR₅₁, kde R₅₁ a R₅₂ jsou stejné nebo odlišné, nezávisle na sobě, H, substituovaný nebo nesubstituovaný alkyl, substituovaný nebo nesubstituovaný cykloalkylalkyl, substituovaný nebo nesubstituovaný heterocykloalkylalkyl, substituovaný nebo nesubstituovaný aryl, substituovaný nebo nesubstituovaný arylamidoalkyl, substituovaný nebo nesubstituovaný arylalkylamidoalkyl, substituovaný nebo nesubstituovaný heteroarylamidoalkyl, substituovaný nebo nesubstituovaný heteroarylalkylamidoalkyl, substituovaný nebo nesubstituovaný arylalkyl, substituovaný nebo nesubstituovaný arylalkoxy, substituovaný nebo nesubstituovaný heteroaryl, substituovaný nebo nesubstituovaný heteroarylalkyl, haloalkyl, nebo R₅₁ a R₅₂, spolu s uhlíkovým atomem, k němuž jsou připojeny, tvoří skupinu C=O nebo substituovanou nebo nesubstituovanou alkenylovou skupinu;

M¹ je N nebo CR₄₉, kde R₄₉ je H nebo substituovaný nebo nesubstituovaný alkyl;

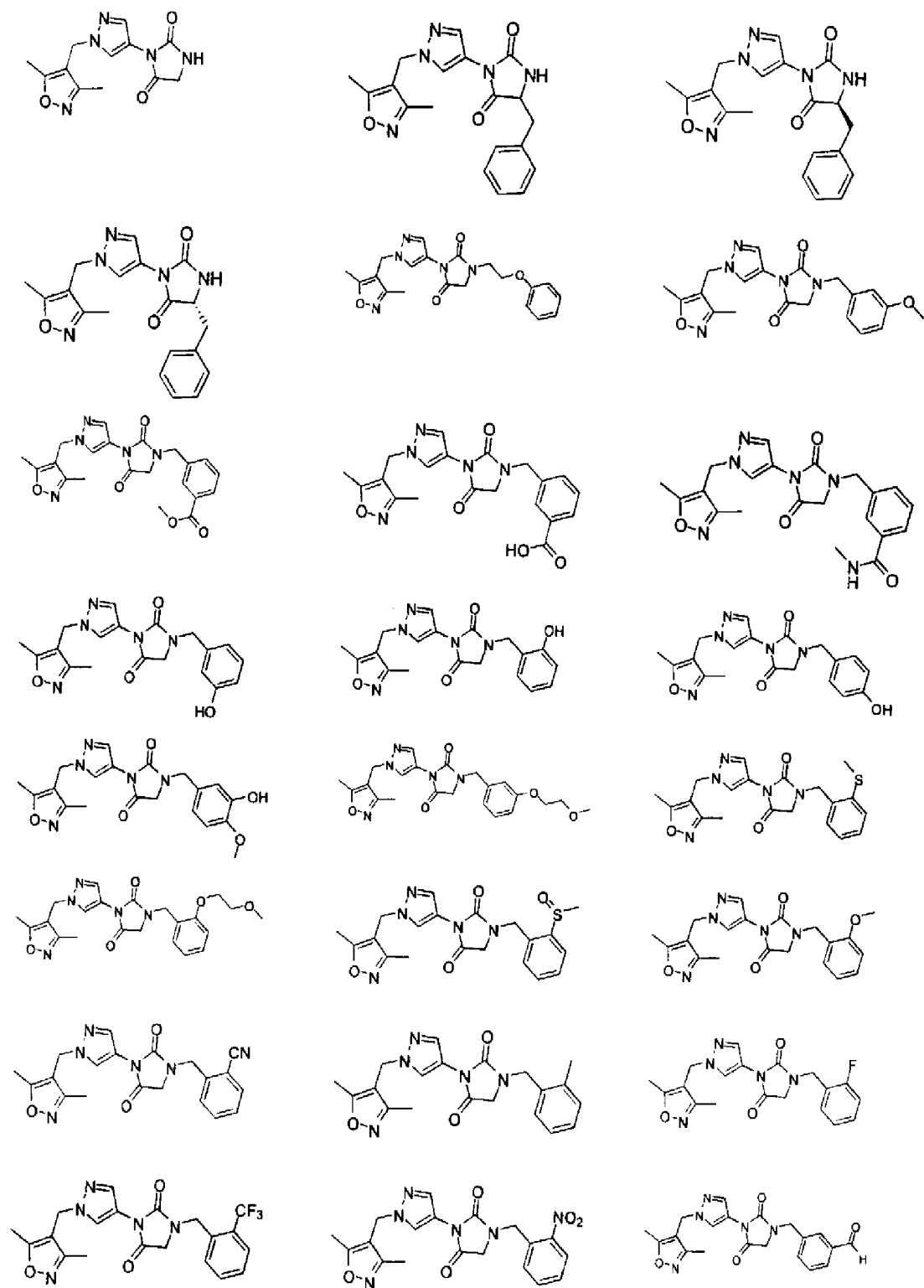
M² je N nebo CR₅₀, kde R₅₀ je H nebo substituovaný nebo nesubstituovaný alkyl;

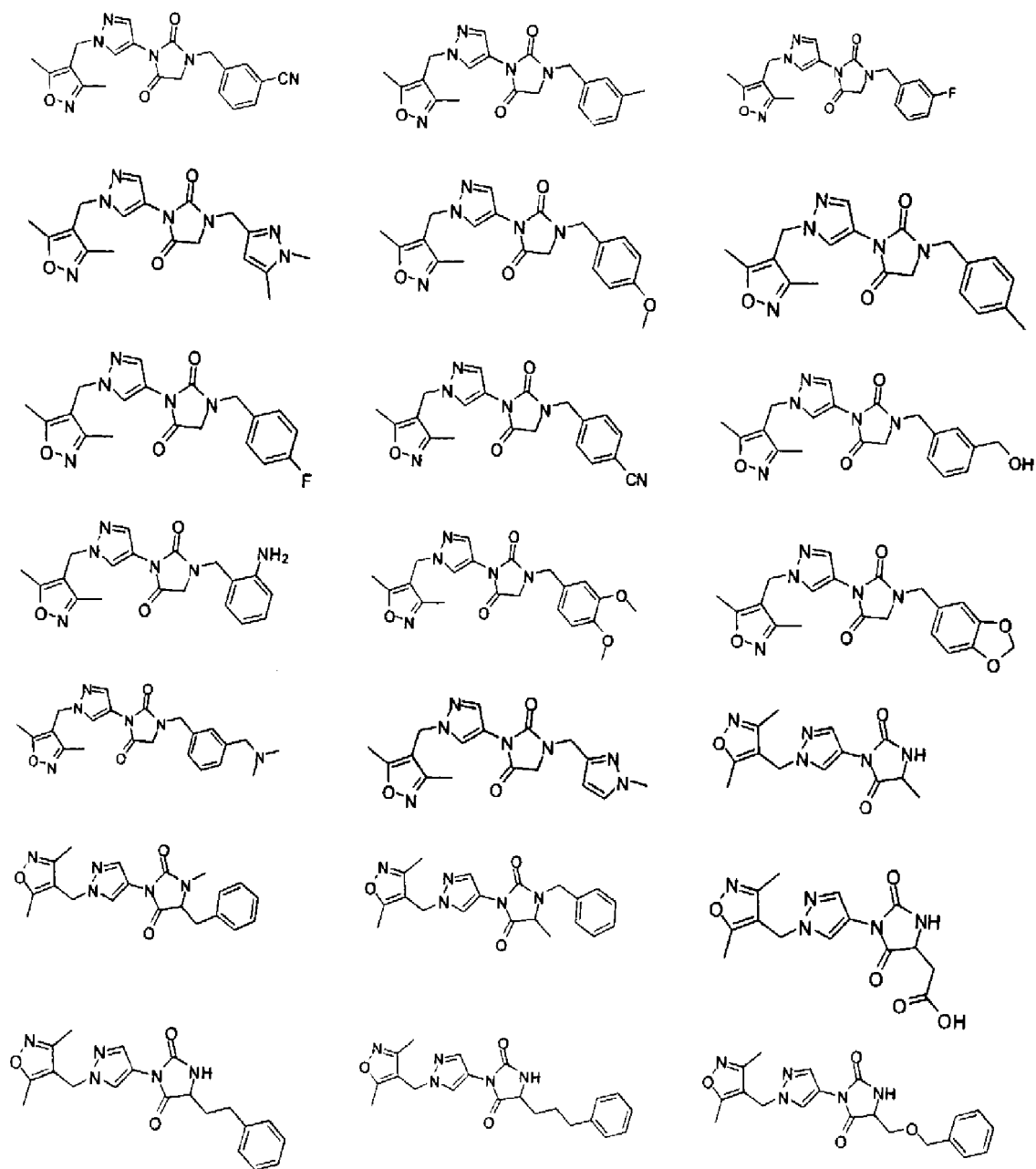
R₃₈ je H, substituovaný nebo nesubstituovaný alkyl, substituovaný nebo nesubstituovaný cykloalkylalkyl, substituovaný nebo nesubstituovaný heterocykloalkylalkyl, substituovaný nebo nesubstituovaný aryl, substituovaný nebo nesubstituovaný arylamidoalkyl, substituovaný nebo nesubstituovaný heteroarylamidoalkyl, substituovaný nebo nesubstituovaný arylalkyl, substituovaný nebo nesubstituovaný arylalkoxy, substituovaný nebo nesubstituovaný heteroaryl, substituovaný nebo nesubstituovaný heteroarylalkyl, nebo haloalkyl;

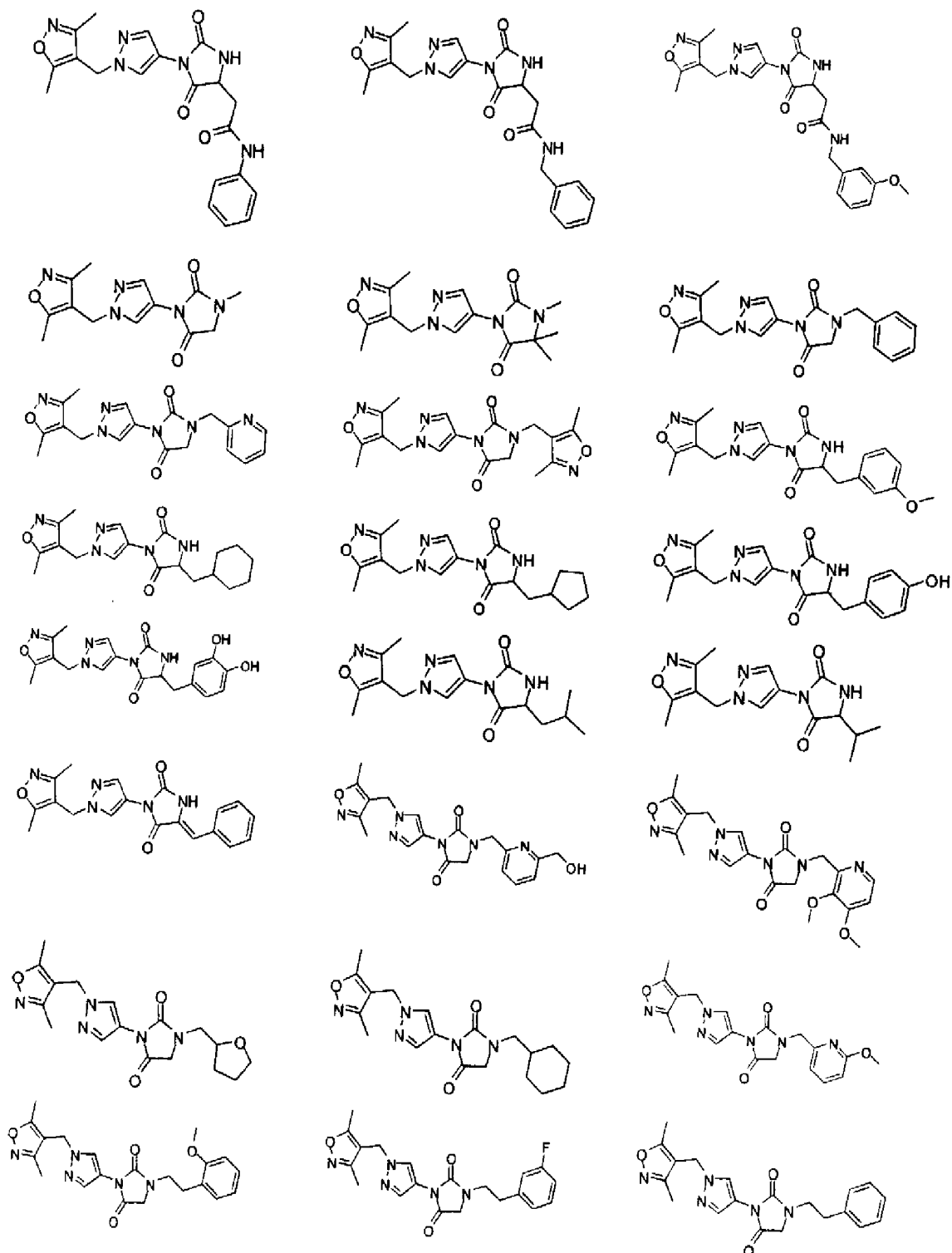
R₄₇ je H, substituovaný nebo nesubstituovaný alkyl, substituovaný nebo nesubstituovaný alkoxy, substituovaný nebo nesubstituovaný aryl, substituovaný nebo nesubstituovaný arylalkyl, nebo halo; a

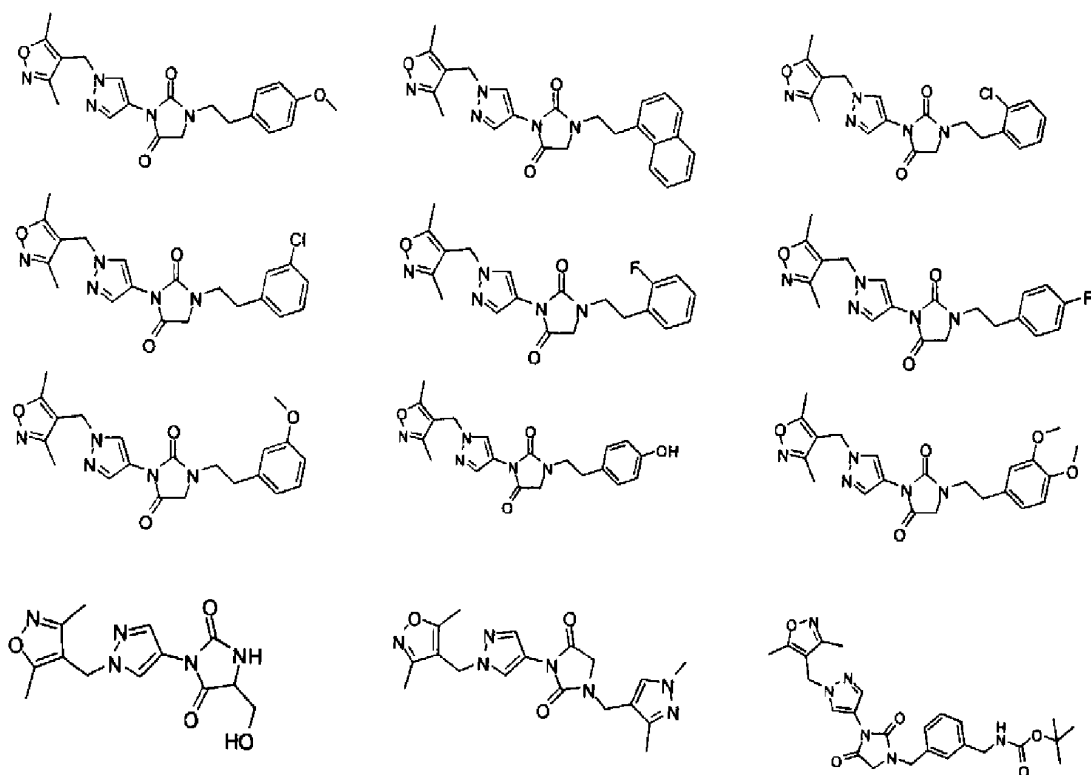
R₄₈ je H, substituovaný nebo nesubstituovaný alkyl, substituovaný nebo nesubstituovaný alkoxy, substituovaný nebo nesubstituovaný aryl, substituovaný nebo nesubstituovaný arylalkyl, nebo halo.

[0070] V ještě dalším provedení se vynález týká sloučeniny dle vzorce:



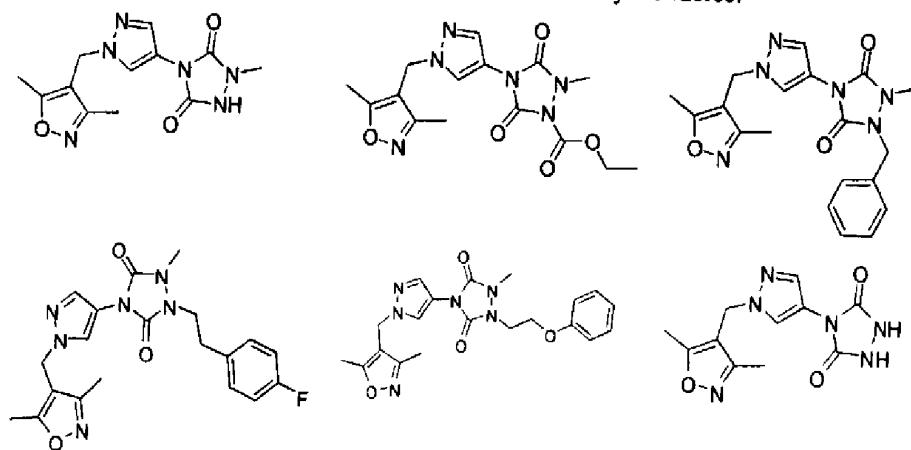


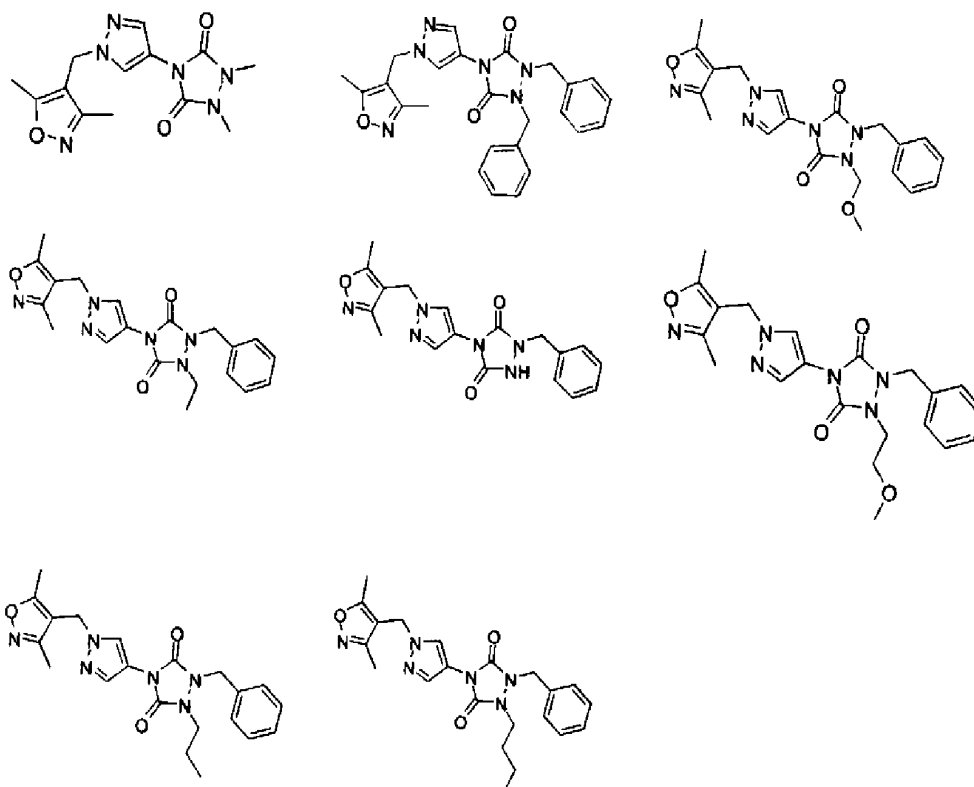




nebo její soli, hydrátu, solvátu, N-oxidu nebo proléčiva.

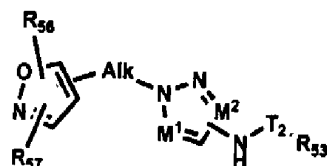
[0071] V ještě dalším aspektu se vynález týká sloučeniny dle vzorce:





nebo její soli, hydrátu, solvátu, N-oxidu nebo proléčiva.

[0072] V ještě dalším aspektu se vynález týká způsobu přípravy sloučeniny dle vzorce:



nebo její soli, hydrátu, solvátu, N-oxidu nebo proléčiva,

kde Alk je alkylová skupina, případně přerušená heteroatomem;

T₂ je C=S, C=O nebo S(O)₂;

R₅₃ je substituovaný nebo nesubstituovaný alkyl, substituovaný nebo nesubstituovaný cykloalkyl, substituovaný nebo nesubstituovaný heteroaryl, substituovaný nebo nesubstituovaný aryl nebo substituovaný nebo nesubstituovaný arylalkyl;

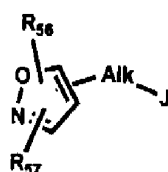
M¹ je N nebo CR₅₄, kde R₅₄ je H nebo substituovaný nebo nesubstituovaný alkyl;

M² je N nebo CR₅₅, kde R₅₅ je H nebo substituovaný nebo nesubstituovaný alkyl;

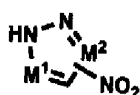
R₅₆ je H, substituovaný nebo nesubstituovaný alkyl, substituovaný nebo nesubstituovaný alkoxy, substituovaný nebo nesubstituovaný aryl, substituovaný nebo nesubstituovaný arylalkyl, nebo halo; a

R_{57} je H, substituovaný nebo nesubstituovaný alkyl, substituovaný nebo nesubstituovaný alkoxy, substituovaný nebo nesubstituovaný aryl, substituovaný nebo nesubstituovaný arylalkyl, nebo halo;

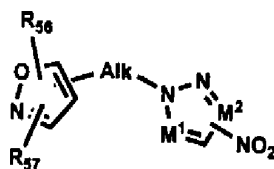
přičemž způsob zahrnuje reakci sloučeniny dle vzorce:



kde R_{56} , R_{57} , a Alk jsou definovány výše a J je odstupující skupina;
se sloučeninou dle vzorce:



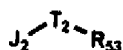
kde M^1 a M^2 jsou definovány výše, za vzniku sloučeniny dle vzorce



obsahující skupinu NO_2 ;

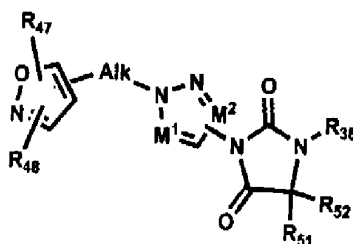
redukci NO_2 skupiny za vzniku sloučeniny obsahující skupinu NH_2 ; a

reakci sloučeniny obsahující NH_2 skupinu se sloučeninou dle vzorce



kde J_2 je odstupující skupina a T_2 a R_{53} jsou definovány výše.

[0073] V ještě dalším aspektu se vynález týká způsobu přípravy sloučeniny dle vzorce:



nebo její soli, hydrátu, solvátu, N-oxidu nebo proléčiva,

kde Alk je alkylová skupina, případně přerušená heteroatomem;

R_{51} a R_{52} jsou stejné nebo odlišné, nezávisle na sobě, H, substituovaný nebo nesubstituovaný alkyl, substituovaný nebo nesubstituovaný cykloalkylalkyl, substituovaný nebo nesubstituovaný heterocykloalkylalkyl, substituovaný nebo nesubstituovaný aryl, substituovaný nebo nesubstituovaný arylamidoalkyl, substituovaný nebo nesubstituovaný arylalkylamidoalkyl, substituovaný nebo nesubstituovaný heteroarylamidoalkyl, substituovaný nebo nesubstituovaný heteroarylalkylamidoalkyl, substituovaný nebo nesubstituovaný arylalkyl, substituovaný nebo nesubstituovaný arylalkoxy, substituovaný nebo nesubstituovaný heteroaryl, substituovaný nebo nesubstituovaný heteroarylalkyl, haloalkyl, nebo R_{51} a R_{52} , spolu s uhlíkovým atomem, k němuž jsou připojeny, tvoří substituovanou nebo nesubstituovanou alkenylovou skupinu;

M^1 je N nebo CR_{49} , kde R_{49} je H nebo substituovaný nebo nesubstituovaný alkyl;

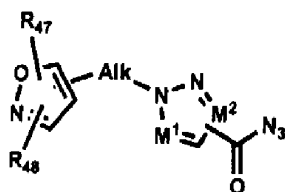
M^2 je N nebo CR_{50} , kde R_{50} je H nebo substituovaný nebo nesubstituovaný alkyl;

R_{38} je H, substituovaný nebo nesubstituovaný alkyl, substituovaný nebo nesubstituovaný cykloalkylalkyl, substituovaný nebo nesubstituovaný heterocykloalkylalkyl, substituovaný nebo nesubstituovaný aryl, substituovaný nebo nesubstituovaný arylamidoalkyl, substituovaný nebo nesubstituovaný heteroarylamidoalkyl, substituovaný nebo nesubstituovaný arylalkyl, substituovaný nebo nesubstituovaný arylalkoxy, substituovaný nebo nesubstituovaný heteroaryl, substituovaný nebo nesubstituovaný heteroarylalkyl, nebo haloalkyl;

R_{47} je H, substituovaný nebo nesubstituovaný alkyl, substituovaný nebo nesubstituovaný alkoxy, substituovaný nebo nesubstituovaný aryl, substituovaný nebo nesubstituovaný arylalkyl, nebo halo; a

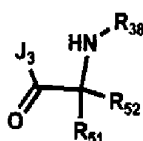
R_{48} je H, substituovaný nebo nesubstituovaný alkyl, substituovaný nebo nesubstituovaný alkoxy, substituovaný nebo nesubstituovaný aryl, substituovaný nebo nesubstituovaný arylalkyl, nebo halo;

příčemž způsob zahrnuje zahřátí sloučeniny dle vzorce:



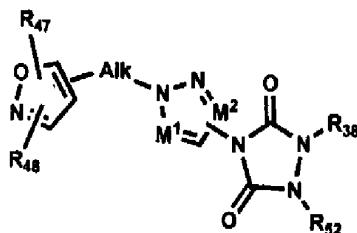
kde R_{47} , R_{48} , Alk, M^1 , a M^2 jsou definovány výše;

pro konverzi $-CON_3$ skupiny na $-N=C=O$ skupinu, a pak reakci se sloučeninou dle vzorce:



kde J_3 je odstupující skupina a R_{38} , R_{51} , a R_{52} jsou definovány výše.

[0074] V ještě dalším aspektu se vynález týká způsobu přípravy sloučeniny dle vzorce:



nebo její soli, hydrátu, solvátu, N-oxidu nebo proléčiva,

kde Alk je alkylová skupina, případně přerušená heteroatomem;

R_{52} je H, substituovaný nebo nesubstituovaný alkyl, substituovaný nebo nesubstituovaný cykloalkylalkyl, substituovaný nebo nesubstituovaný heterocykloalkylalkyl, substituovaný nebo nesubstituovaný aryl, substituovaný nebo nesubstituovaný arylamidoalkyl, substituovaný nebo nesubstituovaný arylalkylamidoalkyl, substituovaný nebo nesubstituovaný heteroarylamidoalkyl, substituovaný nebo nesubstituovaný heteroarylalkylamidoalkyl, substituovaný nebo nesubstituovaný arylalkyl, substituovaný nebo nesubstituovaný arylalkoxy, substituovaný nebo nesubstituovaný heteroaryl, substituovaný nebo nesubstituovaný heteroarylalkyl, haloalkyl;

M^1 je N nebo CR_{49} , kde R_{49} je H nebo substituovaný nebo nesubstituovaný alkyl;

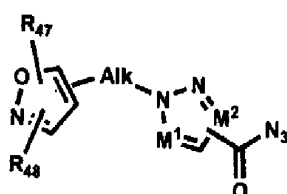
M^2 je N nebo CR_{50} , kde R_{50} je H nebo substituovaný nebo nesubstituovaný alkyl;

R_{38} je H, substituovaný nebo nesubstituovaný alkyl, substituovaný nebo nesubstituovaný cykloalkylalkyl, substituovaný nebo nesubstituovaný heterocykloalkylalkyl, substituovaný nebo nesubstituovaný aryl, substituovaný nebo nesubstituovaný arylamidoalkyl, substituovaný nebo nesubstituovaný heteroarylamidoalkyl, substituovaný nebo nesubstituovaný arylalkyl, substituovaný nebo nesubstituovaný arylalkoxy, substituovaný nebo nesubstituovaný heteroaryl, substituovaný nebo nesubstituovaný heteroarylalkyl, nebo haloalkyl;

R_{47} je H, substituovaný nebo nesubstituovaný alkyl, substituovaný nebo nesubstituovaný alkoxy, substituovaný nebo nesubstituovaný aryl, substituovaný nebo nesubstituovaný arylalkyl, nebo halo; a

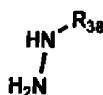
R_{48} je H, substituovaný nebo nesubstituovaný alkyl, substituovaný nebo nesubstituovaný alkoxy, substituovaný nebo nesubstituovaný aryl, substituovaný nebo nesubstituovaný arylalkyl, nebo halo;

přičemž způsob zahrnuje zahřátí sloučeniny dle vzorce:



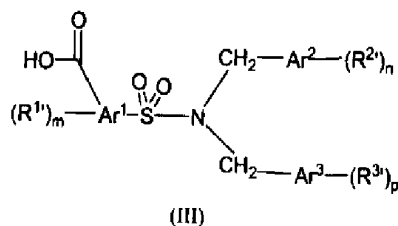
kde R_{47} , R_{48} , Alk, M^1 , a M^2 jsou definovány výše;

pro konverzi $-\text{CON}_3$ skupiny na $-\text{N}=\text{C}=\text{O}$ skupinu, a pak reakci s hydrazinem dle vzorce:



kde R_{38} je definován výše.

[0075] V ještě dalším aspektu se vynález týká způsobu přípravy sloučeniny dle vzorce:



nebo její soli, hydrátu, solvátu nebo N-oxidu, kde:

Ar^1 , Ar^2 a Ar^3 jsou nezávisle pěti- nebo šestičlenný arylový, heteroarylový nebo cykloalkylový kruh, a Ar^2 a Ar^3 mohou být případně vypuštěny;

m je 0, 1, 2 nebo 3;

n a p jsou nezávisle 0, 1, 2, 3 nebo 4;

každý $R^{1'}$ je nezávisle vybrán ze skupiny sestávající z vodíku, halogenu, alkylu, substituovaného alkylu, arylu, substituovaného arylu, arylalkylu, substituovaného arylalkylu, acylu, substituovaného acylu, heteroalkylu, substituovaného heteroalkylu, heteroarylu, substituovaného heteroarylu, heteroarylalkylu, substituovaného heteroarylalkylu, CN, NO_2 , OR^6 , $\text{S(O)}_6\text{R}^6$, NR^6R^7 , CONR^6R^7 , CO_2R^6 , $\text{NR}^6\text{CO}_2\text{R}^7$, $\text{NR}^6\text{CONR}^7\text{R}^8$, $\text{NR}^6\text{CSNR}^7\text{R}^8$, $\text{NR}^6\text{C(=NH)NR}^7\text{R}^8$, $\text{SO}_2\text{NR}^5\text{R}^6$, $\text{NR}^5\text{SO}_2\text{R}^6$, $\text{NR}^5\text{SO}_2\text{NR}^6\text{R}^7$, $\text{B(OR}^5)(\text{OR}^6)$, $\text{P(O)(OR}^5)(\text{OR}^6)$, a $\text{P(O)(R}^5)(\text{OR}^6)$;

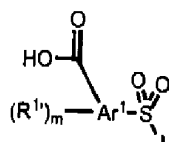
každý R^{21} je nezávisle vybrán ze skupiny sestávající z vodíku, halogenu, alkylu, substituovaného alkylu, arylu, substituovaného arylu, arylalkylu, substituovaného arylalkylu, acylu, substituovaného acylu, heteroalkylu, substituovaného heteroalkylu, heteroarylu, substituovaného heteroarylu, heteroarylalkylu, substituovaného heteroarylalkylu, CN, NO₂, OR⁶, S(O)₆R⁶, NR⁶R⁷, CONR⁶R⁷, CO₂R⁶, NR⁶CO₂R⁷, NR⁶CONR⁷R⁸, NR⁶CSNR⁷R⁸, NR⁶C(=NH)NR⁷R⁸, SO₂NR⁵R⁶, NR⁵SO₂R⁶, NR⁵SO₂NR⁶R⁷, B(OR⁵)(OR⁶), P(O)(OR⁵)(OR⁶), a P(O)(R⁵)(OR⁶);

každý R^{31} je nezávisle vybrán ze skupiny sestávající z vodíku, halogenu, alkylu, substituovaného alkylu, arylu, substituovaného arylu, arylalkylu, substituovaného arylalkylu, acylu, substituovaného acylu, heteroalkylu, substituovaného heteroalkylu, heteroarylu, substituovaného heteroarylu, heteroarylalkylu, substituovaného heteroarylalkylu, CN, NO₂, OR⁶, S(O)₆R⁶, NR⁶R⁷, CONR⁶R⁷, CO₂R⁶, NR⁶CO₂R⁷, NR⁶CONR⁷R⁸, NR⁶CSNR⁷R⁸, NR⁶C(=NH)NR⁷R⁸, SO₂NR⁵R⁶, NR⁵SO₂R⁶, NR⁵SO₂NR⁶R⁷, B(OR⁵)(OR⁶), P(O)(OR⁵)(OR⁶), a P(O)(R⁵)(OR⁶);

R^5 - R^8 jsou nezávisle vodík, alkyl, substituovaný alkyl, aryl, substituovaný aryl, arylalkyl, substituovaný arylalkyl, heteroalkyl, substituovaný heteroalkyl, heteroaryl, substituovaný heteroaryl, heteroarylalkyl nebo substituovaný heteroarylalkyl nebo alternativně, R^6 a R^7 , R^7 a R^8 , spolu s atomy, na něž jsou navázány, tvoří cykloheteroalkylový nebo substituovaný cykloheteroalkylový kruh;

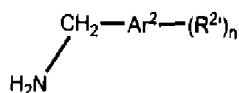
b je 0, 1, nebo 2;

příčemž způsob zahrnuje reakci sloučeniny dle vzorce:



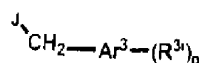
kde J je odstupující skupina;

se sloučeninou dle vzorce:



za vzniku produktu; a

reakci produktu se sloučeninou dle vzorce:



kde J je odstupující skupina.

[0076] Dalším předmětem vynálezu je využití sloučenin identifikovaných ve zde popsaných testech jako aditiv nebo modulátorů chuti v kompozicích za účelem inhibice nebo blokace hořké chuti vyvolané sloučeninami, které specificky aktivují tyto chuťové receptory. Výhodným předmětem vynálezu je použití sloučeniny, která inhibuje aktivaci alespoň jednoho z výše uvedených lidských T2R receptorů za účelem blokování hořké chuti sloučenin přítomných v kávě a v potravinách, nápojích a léčivech s příchutí kávy.

[0077] Dalším předmětem vynálezu je využití sloučenin podle vynálezu jakožto blokátorů hořkosti s širokou působností za účelem inhibice nebo blokace hořké chuti vyvolané sloučeninami, které specificky aktivují chuťové receptory hT2R8, ligandy, které aktivují násobné receptory hořké chuti, hořkými sloučeninami, které mají neznámou specifitu k receptorům, nebo kompozicemi obsahujícími neznámé nebo četné hořké sloučeniny. V jednom provedení se sloučeniny podle vynálezu využijí k inhibici aktivace alespoň jednoho z výše uvedených lidských receptorů T2R, čímž blokují hořkou chuť sloučenin přítomných v kávě nebo v potravinách, nápojích a léčivech s příchutí kávy. Dalším předmětem vynálezu je potvrdit, že identifikované sloučeniny modulují, s výhodou inhibují nebo blokují, hořkou chuť, např. vyvolanou kávou a potravinami, nápoji a léčivy s příchutí kávy, v chuťových testech na lidech nebo zvířatech, s výhodou v chuťových testech na lidech.

[0078] Dalším předmětem vynálezu je využití sloučenin identifikovaných ve zde popsaných testech jakožto aditiv nebo modulátorů příchuti v kompozicích za účelem inhibice nebo blokace hořké chuti vyvolané sloučeninami, které specificky aktivují tyto chuťové receptory. Výhodným předmětem vynálezu je použít sloučeninu, která inhibuje aktivaci alespoň jednoho z výše uvedených lidských receptorů T2R za účelem blokace hořké chuti sloučenin přítomných v kávě a v potravinách, nápojích a léčivech s příchutí kávy.

[0079] V obzvlášť výhodném provedení se použije sloučenina C a její analogy jako blokátory hořkosti s širokou působností za účelem inhibice nebo blokace hořké chuti vyvolané sloučeninami, které specificky aktivují chuťové receptory hT2R3, 7, 10, 14, 16, 44, 51, 55, 61, 63, 64, 65, 71 a/nebo hT2R5, 9, 13, 54, 67 a 75, ligandy, které aktivují násobné receptory hořké chuti, hořkými sloučeninami, které mají neznámou specifitu k receptorům, nebo kompozicemi obsahujícími neznámé nebo četné hořké sloučeniny. Vzhledem k rozsáhlým antagonistickým vlastnostem sloučeniny C by měla být výrazně zeslabena hořká chuť většiny hořkých sloučenin a kompozic obsahujících hořké sloučeniny. Výhodným předmětem vynálezu je použít sloučeninu, která inhibuje alespoň jeden z výše uvedených lidských chuťových receptorů T2R, např. sloučeninu C nebo její analog, pro blokaci hořké chuti sloučenin přítomných v kávě a v potravinách, nápojích a léčivech s příchutí kávy.

PODROBNÝ POPIS OBRÁZKŮ

[0080] Obr. 1 se týká experimentů, kde se použila částečně přečištěná hořká frakce z kávy za účelem screeningu 25 lidských T2R v přechodně transfekovaných HEK buňkách, jak je popsáno v předchozích přihláškách vynálezu přihlašovatele, které jsou zde začleněny odkazem. Jak je znázorněno na obr. 1, kávová frakce aktivovala buňky HEK293, které byly dočasně transfekovány hT2R8 a hT2R14, ve vápníkovém zobrazovacím testu (calcium imaging assay). Použilo se modré barvivo FD&C pro snížení hladiny fluorescence kávové frakce, která by rušila při testu.

[0081] Obr. 2 je graf závislosti $\Delta F/F$ na log kávové frakce, který ukazuje dávkově závislou odezvu hT2R8 a hT2R14 na hořce chutnající frakci pocházející z kávy. Test byl proveden za použití stabilních buněčných linií hT2R8 a hT2R14 a automatického fluorescenčního detektoru FLIPR.

[0082] Obr. 3 je graf závislosti procentuální inhibice aktivity hT2R8 na log koncentrace sloučeniny a ukazuje dávkově závislou inhibici pro sloučeniny A a B na stabilní buněčné linii exprimující hT2R8.

[0083] Obr. 4 je graf procentuální inhibice aktivity hT2R14 v závislosti na log koncentrace sloučeniny C a znázorňuje dávkovou inhibici pro sloučeninu C na stabilní buněčné linii exprimující hT2R8.

[0084] Obr. 5 znázorňuje inhibiční aktivitu sloučeniny C vůči různým (2) lidským receptorům hořké chuti.

[0085] Obr. 6 je graf aktivity receptoru jako funkce log koncentrace sacharinu. Obr. 6 znázorňuje dávkově závislé vztahy a účinky sacharinu na aktivity receptorů v transfekovaných buňkách exprimujících varianty hT2R43, hT2R44 a hT2R8. hT2R8 má menší odezvu na sacharin *in vitro* testu než alely hT2R43-W35 a hT2R44-W35 „ochutnávače“, ale má lepší odezvu než alely hT2R43-S35 a hT2R44-R35 „neochutnávače“.

PODROBNÝ POPIS VYNÁLEZU

[0086] Podle tohoto vynálezu mohou být sloučeniny podle vynálezu využívány k zeslabení nebo snížení hořké chuti kompozic, např. požitelné kompozice. Výraz „požitelná kompozice“, jak je zde užíván, zahrnuje jakoukoli látku určenou pro orální požití, a to buď samotnou nebo spolu s další látkou. Požitelná kompozice zahrnuje jak „potravinové nebo nápojové produkty“, tak „nejedlé produkty“. Výrazem „potravinové nebo nápojové produkty“ je míněn jakýkoli jedlý produkt určený pro požití lidmi nebo zvířaty, včetně pevných látek, polotuhých látek nebo kapalin (např. nápoje). Výraz „nejedlé produkty“ nebo „nejedlá kompozice“ zahrnuje doplňky, výživové doplňky, funkční potravinové

produkty (např. jakákoli čerstvá nebo zpracovaná potravina, o níž se prohlašuje, že má vlastnosti podporující zdraví a/nebo vlastnosti prevence nemocí kromě základní výživné funkce doplňkových živin), léky a volně prodejná léčiva, produkty pro péči o ústní dutinu, např. zubní pasty a ústní vody, kosmetické produkty, např. pomády na rty a další produkty osobní péče.

[0087] Poživatelná kompozice rovněž zahrnuje farmaceutickou, lékařskou nebo jedlou kompozici, nebo alternativně formulaci, např. farmaceutickou formulaci nebo potravinový nebo nápojový produkt nebo formulaci.

[0088] Sloučeniny podle vynálezu mohou být také poskytnuty, a to jak samostatně, tak v kombinaci, s jakoukoli poživatelnou známou nebo později objevenou kompozicí. Například může být poživatelnou kompozicí jedlá kompozice nebo nejedlá kompozice. Výraz „jedlá kompozice“ označuje jakoukoli kompozici, kterou lidé nebo zvířata mohou konzumovat jako potravinu, včetně pevných látek, gelů, pasty, pěnového materiálu, polotuhých látek, kapalin nebo jejich směsí. Výraz „nejedlá kompozice“ označuje jakoukoli kompozici, která je určena pro konzumaci nebo použití lidmi nebo zvířaty nikoli jako potravina, včetně pevných látek, gelů, pasty, pěnového materiálu, polotuhých látek, kapalin nebo jejich směsí. Nejedlá kompozice zahrnuje, ale není omezena na, lékařskou kompozici, která se vztahuje na nejedlou kompozici určenou pro použití lidmi nebo zvířaty pro terapeutické účely. „Zvířetem“ je míněn jakýkoli živoch mimo člověka, např. hospodářská zvířata nebo domácí mazlíci.

[0089] V jednom provedení mohou být sloučeniny podle vynálezu přidány k nejedlé kompozici nebo nejedlému produktu, např. k doplňkům, doplňkům výživy, funkčním potravinovým produktům (např. jakékoli čerstvé nebo zpracované jídlo, které má vlastnosti podpory zdraví a/nebo prevence nemocí, vedle základní výživné funkce doplňkových živin), farmaceutickým přípravkům a volně prodejným lékům, výrobkům pro péči o ústní dutinu, jako jsou zubní pasty a ústní vody, ke kosmetickým produktům, např. pomádám na rty a dalším produktům pro osobní péči.

[0090] Obecně se volně prodejné produkty (over the counter – OTC) a produkty ústní hygieny vztahují na produkty pro domácí a/nebo osobní použití, které mohou být prodávány bez předpisu a/nebo bez návštěvy u lékaře. Příklady OTC zahrnují, ale nejsou omezeny na, vitamíny a doplňky stravy; lokální analgetika a/nebo anestetika; prostředky proti kašli, rýmě a alergii; antihistaminika a/nebo prostředky proti alergii; a jejich kombinace. Vitamíny a doplňky stravy zahrnují, ale nejsou omezeny na vitamíny, doplňky stravy, tonika/výživné nápoje v láhvích, vitamíny pro děti, doplňky stravy a jakékoli další produkty vztahující se k výživě, nebo jejich kombinace. Lokální analgetika a/nebo anestetika zahrnují jakékoli

lokální krémy/masti/gely používané pro zeslabení povrchových nebo hloubkových bolestí, např. bolest svalů; gel proti bolesti zubů; náplasti s analgetickou složkou a jejich kombinace. Prostředky proti kašli, rýmě a alergii zahrnují, ale nejsou omezeny na, látky snižující překrvení, prostředky proti kašli, přípravky do hltanu, léčivé cukrovinky, antihistaminika a přípravky proti kašli, rýmě a alergii pro děti; a kombinace těchto produktů. Antihistaminika a/nebo prostředky proti alergii zahrnují, ale nejsou omezeny na, jakoukoli systémovou léčbu senné rýmy, nosních alergií, bodnutí hmyzem a žihadla. Příklady produktů pro ústní hygienu zahrnují, ale nejsou omezeny na, proužky pro čištění úst, zubní pastu, zubní kartáčky, ústní vody / zubní vody, prostředky pro péči o zubní protézu, osvěžovače dechu, domácí bělidla zubů a dentální nit.

[0091] V dalším provedení mohou být sloučeniny podle vynálezu přidány do potravinových nebo nápojových produktů nebo formulací. Příklady potravinových nebo nápojových produktů nebo formulací zahrnují, ale nejsou omezeny na, polevy pro jedlé produkty nebo jakýkoli předmět zahrnutý do kategorie polévek, kategorie sušených zpracovaných potravin, kategorie nápojů, kategorie hotových jídel, kategorie konzervovaných potravin, kategorie zmražených zpracovaných potravin, kategorie chlazených zpracovaných potravin, kategorie přesnídávkových potravin, kategorie pečeného zboží, kategorie cukrovinek, kategorie mléčných výrobků, kategorie zmrzlín, kategorie náhražek jídla, kategorie těstovin a nudlí, a kategorie omáček, dresinků, kořenících směsí, kategorie dětských potravin a/nebo kategorie pomazánek.

[0092] Kategorie polévek se obecně týká konzervované, dehydratované, instantní, chlazené, UHT a zmražené polévky. Pro účely této definice znamená polévka (polévky) jídlo připravené z masa, drůbeže, ryby, zeleniny, obilí, ovoce a dalších ingrediencí, vařené v kapalině, které může obsahovat viditelné kousky některých nebo všech těchto ingrediencí. Může být čirá (např. vývar) nebo hustá (např. rybí polévka), hladká, kašovitá nebo s kousky ingrediencí, hotová, polozahuštěná nebo zahuštěná a může být servírovaná horká nebo studená, jako první chod nebo jako hlavní chod nebo mezi jídlem jako snack (upíjená jako nápoj). Polévku lze použít jako ingredienci pro přípravu dalších složek jídla a může být v rozmezí od vývarů (silné polévky) po omáčky (krémové nebo sýrové polévky).

[0093] „Kategorie dehydratovaných nebo kulinářských potravin“ obvykle znamená: (i) Pomocné produkty pro vaření, např. prášky, granule, pasty, koncentrované kapalné produkty, včetně koncentrovaného bujónu, bujónu a produktů podobných bujónu ve stlačených tubách, tabletách nebo v práškové nebo granulované formě, které se prodávají odděleně od konečného produktu nebo jakožto ingredience v produktu, omáčky a recepturové směsi (nezávisle na

technologii); (ii) Produkty jídelných roztoků, např. dehydratované nebo lyofilizované polévky, včetně dehydratovaných polévkových směsí, dehydratované instantní polévky, dehydratované polévkové polotovary, dehydratované nebo vnější přípravky hotových jídel, jídla a teplé předkrmy včetně těstovinových, bramborových a rýžových jídel; a (iii) Produkty pro zkrášení jídla, např.: chuťové přísady, marinády, salátové dresinky, salátové zálivky, dipy, strouhánka, šlehané směsi, pomazánky s dlouhou trvanlivostí, omáčky pro barbecue, kapalně recepturové směsi, koncentráty, omáčky nebo omáčkové směsi, včetně recepturových směsí na salát, prodávané jako hotový produkt nebo jako ingredience produktu, ať už dehydratovaného, kapalného nebo zmrazeného.

[0094] Kategorie nápojů obvykle označuje nápoje, nápojové směsi a koncentráty, zahrnující nejen sycené a nesycené nápoje, alkoholické a nealkoholické nápoje, hotové nápoje, kapalně koncentrované formulace pro přípravu nápojů jako jsou sodovky, a suché práškové nápojové výchozí směsi. Kategorie nápojů rovněž zahrnuje alkoholické nápoje, nealkoholické nápoje, nápoje pro sport, isotonické nápoje a teplé nápoje. Alkoholické nápoje zahrnují, ale nejsou omezeny na, pivo, cider/mošt, ochucené alkoholické nápoje, víno a destiláty. Nealkoholické nápoje zahrnují, ale nejsou omezeny na, sycené nápoje, např. Colu a další sycené nápoje, ovocné džusy, nektary, džusové nápoje a nápoje s příchutí ovoce; balenou vodu, která zahrnuje sycenou vodu, pramenitou vodu a čistou/stolní vodu; funkční nápoje, které mohou být sycené nebo nesycené a zahrnují nápoje pro sport, energetické nápoje nebo léčebné nápoje; koncentráty, např. kapalně a práškové koncentráty v dávkách připravených pro pití. Teplé nápoje zahrnují, ale nejsou omezeny na, kávu, např. čerstvou (např. vařenou), instantní, kombinovanou kávu, kapalně, hotové, rozpustné a suché kávové nápoje, kávové nápojové směsi a koncentráty (sirupy, pyré, formulované, nebo v práškové formě; příkladem „práškové formy“ je produkt obsahující kávu, sladidlo a bělidlo, všechny v práškové formě); čaj, např. černý, zelený, bílý, oolong a ochucené čaje; a další teplé nápoje včetně prášků, granulí, kostek nebo tablet na bázi příchuti, sladu nebo rostlin, smíchané s mlékem nebo vodou.

[0095] Kategorie přesnídávkových potravin (snack food) se obecně vztahuje na jakoukoli potravinu, která může být lehkým neformálním jídlem včetně, ale nejen, sladkých a slaných snacků a tyčinek. Příklady takových potravin zahrnují, ale nejsou omezeny na, ovocné přesnídávkové, chipsy/lupínky, extrudované přesnídávkové, tortilly/kukuřičné lupínky, popcorn, preclíky, oříšky a další sladké a slané přesnídávkové. Příklady přesnídávkových tyčinek zahrnují, ale nejsou omezeny na, granolové/müsli tyčinky, snídaňové tyčinky, energetické tyčinky, ovocné tyčinky a další přesnídávkové tyčinky.

- [0096] Kategorie pečeného zboží se obecně vztahuje na jakýkoli jedlý produkt, jehož proces přípravy zahrnuje expozici tepla nebo nadměrnému slunečnímu záření. Příklady pečeného zboží zahrnují, ale nejsou omezeny na, chléb, rohlíky, sušenky, muffiny, obilniny, toastovací pečivo, pečivo, wafle, tortilly, keksy, koláče, bagely, dorty, kiše, buchty, jakékoli pečené potraviny a jakoukoli jejich kombinaci.
- [0097] Kategorie zmrzliny se obecně vztahuje na zmražený dezert obsahující smetanu a cukr a aromatické látky. Příklady zmrzliny zahrnují, ale nejsou omezeny na, impulzivně nakupovanou zmrzlinu (impulse ice cream), zmrzlinu pro domácí využití (take-home ice cream), zmražený jogurt a nebalenou zmrzlinu; zmrzliny na bázi sóji, ovesa, fazolí (např. červených fazolí a zelených fazolí) a rýže.
- [0098] Kategorie cukrovinek se obecně vztahuje na jedlý produkt, který je chuťově sladký. Příklady cukrovinek zahrnují, ale nejsou omezeny na, bonbóny, želatinové, čokoládové cukrovinky, cukrové cukrovinky, žvýkačky apod. a jakékoli kombinované produkty.
- [0099] Kategorie náhražek jídla se obecně vztahuje na potravinu určenou k náhradě normálních jídel, zejména pro lidi, kteří dbají o zdraví a tělesnou kondici. Příklady náhražek jídel zahrnují, ale nejsou omezeny na, produkty na hubnutí a produkty pro zotavení.
- [00100] Kategorie hotových jídel se obecně vztahuje na jakékoli potraviny, které lze servírovat jako jídlo bez rozsáhlé přípravy nebo zpracování. Hotová jídla zahrnují produkty, kterým dodal receptové „umění“ výrobce, což má za následek jejich vysoký stupeň hotovosti, kompletnosti a výhodnosti. Příklady hotových jídel zahrnují, ale nejsou omezeny na, konzervovaná, mražená, sušená, chlazená hotová jídla; obědové směsi; zmraženou pizzu; chlazenou pizzu a připravené saláty.
- [00101] Kategorie těstovin a nudlí zahrnuje jakékoli těstoviny a/nebo nudle včetně, ale nejen, konzervovaných, sušených a chlazených/čerstvých těstovin; a neochucené, instantní, chlazené, mražené a přesnídávkové nudle.
- [00102] Kategorie konzervovaných potravin zahrnuje, ale není omezena na konzervované maso a masné výrobky, ryby a mořské plody, zeleninu, rajčata, fazole, ovoce, hotová jídla, polévku, těstoviny a další konzervovaná jídla.
- [00103] Kategorie zmražených zpracovaných potravin zahrnuje, ale není omezena na, zmražené zpracované tmavé maso, zpracovanou drůbež, zpracované ryby/mořské plody, zpracovanou zeleninu, náhražky masa, zpracovaná rajčata, pekařské výrobky, dezerty, hotová jídla, pizzu, polévku, nudle a další zmražené potraviny.

- [00104] Kategorie sušených zpracovaných potravin zahrnuje, ale není omezena na, rýži, dezertové směsi, sušená hotová jídla, dehydratovanou polévku, instantní polévku, sušené těstoviny, neochucené nudle a instantní nudle.
- [00105] Kategorie chlazených zpracovaných potravin zahrnuje, ale není omezena na, chlazená zpracovaná masa, zpracované rybí produkty a mořské plody, obědové balíčky, čerstvě nakrájené ovoce, hotová jídla, pizzu, připravené saláty, polévku, čerstvé těstoviny a nudle.
- [00106] Kategorie omáček, dresinků a chuťových přísad zahrnuje, ale není omezena na, rajske protlaky a pyré, bujónové/masoxové kostky, bylinky a koření, glutamát sodný (MSG), stolní omáčky, sójové omáčky, těstovinové omáčky, tekuté/kuchyňské omáčky, suché omáčky/práškové směsi, kečup, majonézu, hořčici, salátové dresinky, octové omáčky, dipy, nakládané výrobky a další omáčky, dresinky a chuťové přísady.
- [00107] Kategorie dětských potravin zahrnuje, ale není omezena na, dětské výživy na bázi mléka nebo sóji; a připravené, sušené a jiné dětské potraviny.
- [00108] Kategorie pomazánek zahrnuje, ale není omezena na, džemy a marmelády, med, čokoládové pomazánky, oříškové pomazánky a kvasnicové pomazánky.
- [00109] Kategorie mléčných výrobků se obecně vztahuje na jedlé produkty vyrobené ze savčího mléka. Příklady mléčného výrobku zahrnují, ale nejsou omezeny na, pitné mléčné výrobky, sýr, jogurt a kyselé mléčné nápoje a další mléčné výrobky.
- [00110] Další příklady požitelné kompozice, zejména potravinových a nápojových produktů nebo formulací jsou následovné. Příklady požitelných kompozic zahrnují jeden nebo více produktů ze skupiny: cukrovinky, čokoládové cukrovinky, tablety, čokoládové a jiné tyčinky, kolekce v krabicích, standardní kolekce v krabicích, miniatury omotané provázkem, sezónní čokoláda, čokoláda s hračkou, alfajor (arabské cukroví), jiné čokoládové cukrovinky, mátové bonbóny, standardní mátové bonbóny, silné mátové bonbóny, vařené sladkosti, pastilky, žvýkačky, želé a žvýkácké bonbóny, karamelové bonbóny, karamely a nugát, léčivé cukrovinky, lízátko, lékořice, jiné cukrové cukrovinky, guma, žvýkačka, žvýkačka s obsahem cukru, žvýkačka bez cukru, funkční žvýkačka, žvýkačka, chléb, balený/průmyslový chléb, nebalený/řemeslnický chléb, pečivo, dorty, balené/průmyslové dorty, nebalené/řemeslnické dorty, sušenky, čokoládou polévané keksy, sendvičové keksy, plněné keksy, slané keksy a suchary, náhražky chleba, snídaňové cereálie, hotové cereálie, rodinné snídaňové cereálie, vločky, müsli, jiné cereálie, dětské snídaňové cereálie, horké cereálie, zmrzlina, individuální balená zmrzlina, jednorpcová mléčná zmrzlina, jednorpcová vodová zmrzlina, mléčná zmrzlina multipack, vodová zmrzlina multipack,

zmrzlina na odnesení, mléčná zmrzlina na odnesení, zmrzlinové dezerty, zmrzlina ve velkém balení, vodová zmrzlina na odnesení, mražený jogurt, ručně vyráběná zmrzlina, mléčné výrobky, mléko, čerstvé/pasterizované mléko, plnotučné čerstvé/pasterizované mléko, polotučné čerstvé/pasterizované mléko, trvanlivé/UHT mléko, plnotučné trvanlivé/UHT mléko, polotučné trvanlivé/UHT mléko, odtučněné trvanlivé/UHT mléko, kozí mléko, kondenzované/odpařované mléko, neochucené kondenzované/odpařované mléko, ochucené, funkční a další kondenzované mléko, ochucené mléčné nápoje, ochucené mléčné nápoje pouze z mléka, ochucené mléčné nápoje s ovocnou šťávou, sójové mléko, kyselé mléčné nápoje, fermentované mléčné nápoje, bělidla do kávy (např. mléčné a nemléčné smetany nebo bělidla pro kávové nápoje), práškové mléko, ochucené práškové mléčné nápoje, smetana, sýr, tavený sýr, roztíratelný tavený sýr, neroztíratelný tavený sýr, neupravený sýr, roztíratelný neupravený sýr, tvrdý sýr, balený tvrdý sýr, nebalený tvrdý sýr, jogurt, neochucený/přírodní jogurt, ochucený jogurt, ovocný jogurt, probiotický jogurt, jogurtový nápoj, běžný jogurtový nápoj, probiotický jogurtový nápoj, chlazené a trvanlivé dezerty, mléčné dezerty, sójové dezerty, chlazené přesnídávky, tvaroh, neochucený tvaroh, ochucený tvaroh, slaný tvaroh, sladké a slané přesnídávky, ovocné přesnídávky, chipsy/lupínky, extrudované přesnídávky, tortilové/kukuřičné chipsy, popcorn, preclíky, oříšky, jiné sladké a slané přesnídávky, tyčinky, granolové tyčinky, snídaně tyčinky, energetické tyčinky, ovocné tyčinky, jiné přesnídávkové tyčinky, výrobky pro náhradu jídla, výrobky na hubnutí, zotavovací nápoje, hotová jídla, konzervovaná hotová jídla, mražená hotová jídla, sušená hotová jídla, chlazená hotová jídla, obědové směsi, mražená pizza, chlazená pizza, polévka, polévka v konzervě, dehydratovaná polévka, instantní polévka, chlazená polévka, horká polévka, mražená polévka, těstoviny, těstoviny v konzervě, sušené těstoviny, chlazené/čerstvé těstoviny, nudle, neochucené nudle, instantní nudle, instantní nudle v šálku/misce, instantní nudle v sáčku, chlazené nudle, přesnídávkové nudle, potraviny v konzervách, konzervované maso a masné výrobky, konzervované ryby/mořské plody, konzervovaná zelenina, konzervovaná rajčata, konzervované fazole, konzervované ovoce, konzervovaná hotová jídla, konzervovaná polévka, konzervované těstoviny, jiné konzervované potraviny, mražené potraviny, mražené zpracované tmavé maso, mražená zpracovaná drůbež, mražené zpracované ryby/mořské plody, mražená zpracovaná zelenina, mražené zpracované masové náhražky, mražené brambory, bramborové chipsy pečené v troubě, další bramborové produkty pečené v troubě, mražené brambory nepečené v troubě, mražené pekařské výrobky, mražené dezerty, mražená hotová jídla, mražená pizza, mražená polévka, mražené nudle, jiné mražené potraviny, sušené potraviny, dezertové směsi, sušená hotová jídla, dehydratovaná polévka, instantní polévka,

sušené těstoviny, neochucené nudle, instantní nudle, instantní nudle do šálku/misky, instantní nudle v sáčku, chlazené potraviny, chlazená zpracovaná masa, chlazené rybí produkty a mořské plody, chlazená zpracovaná ryba, chlazená obalovaná ryba, chlazená uzená ryba, chlazené obědové balíčky, chlazená hotová jídla, chlazená pizza, chlazená polévka, chlazené/čerstvé těstoviny, chlazené nudle, oleje a tuky, olivový olej, rostlinný olej a olej ze semen, tuky na vaření, máslo, margarín, roztíratelné oleje a tuky, funkční roztíratelné oleje a tuky, omáčky, dresinky a chuťové přísady, rajské protlaky a pyré, bujónové a masoxové kostky, masoxy, omáčkové granule, kapalné masoxy a fondy, bylinky a koření, fermentované omáčky, sójové omáčky, těstovinové omáčky, mokré omáčky, suché omáčky/práškové směsi, kečup, majonéza, běžná majonéza, hořčice, salátové dresinky, běžné salátové dresinky, salátové dresinky s nízkým obsahem tuku, octové omáčky, dipy, nakládané výrobky, jiné omáčky, dresinky a chuťové přísady, dětské potraviny, mléčné dětské výživy, standardní mléčné výživy, pokračovací mléčné výživy, mléčné výživy pro batolata, hypoalergenní mléčné výživy, připravené dětské potraviny, sušené dětské potraviny, jiné dětské potraviny, pomazánky, džemy a marmelády, med, čokoládové pomazánky, oříškové pomazánky a kvasnicové pomazánky. Příklady požitelných kompozic rovněž zahrnují cukrovinky, pekařské výrobky, zmrzliny, mléčné výrobky, sladké a slané přesnídávky, tyčinky, produkty pro náhradu jídla, hotová jídla, polévky, těstoviny, nudle, konzervované potraviny, mražené potraviny, sušené potraviny, chlazené potraviny, oleje a tuky, dětské potraviny, nebo pomazánky nebo jejich směs. Příklady požitelných potravin také zahrnují snídaňové cereálie, sladké nápoje nebo tuhé či kapalné koncentrované směsi pro přípravu nápojů. Příklady požitelných kompozic rovněž zahrnují potraviny s příchutí kávy (např. kávová zmrzlina).

[00111] Obvykle se za účelem zeslabení nebo snížení hořké chuti spojené s kompozicí do kompozice přidá množství dostatečné pro zeslabení nebo snížení hořké chuti spojené s kompozicí, např. požitelnou kompozicí, oproti kompozicím, které jsou připraveny bez sloučenin podle vynálezu, jak to posuzují lidé nebo zvířata. Nebo v případě testování formulací, jak to posuzuje většina poroty např. osmi lidských ochutnávačů postupy běžné v oboru známými.

[00112] Koncentrace sloučenin podle vynálezu účinná pro zeslabení nebo snížení hořké chuti spojené s kompozicí bude samozřejmě záviset na mnoha proměnných, včetně konkrétního typu požitelné kompozice a jejích různých dalších složek, přirozené genetické rozmanitosti a individuálních preferencí a zdravotním stavu různých lidí testujících kompozice, a na subjektivním účinku konkrétní sloučeniny na chuť takových chemosenzoric-

kých sloučenin. V některých provedeních je koncentrace sloučeniny podle vynálezu účinná pro zeslabení nebo snížení hořké chuti spojené s kompozicí od přibližně 0,001 ppm do přibližně 100 ppm, např. od přibližně 0,1 ppm do přibližně 100 ppm, od přibližně 1 ppm do přibližně 25 ppm, od přibližně 1 ppm do přibližně 10 ppm, od přibližně 0,1 ppm do přibližně 10 ppm, od přibližně 0,01 ppm do přibližně 30 ppm, od přibližně 0,05 ppm do přibližně 10 ppm, od přibližně 0,01 ppm do přibližně 5 ppm, od přibližně 0,02 ppm do přibližně 2 ppm nebo od přibližně 0,01 ppm do přibližně 1 ppm.

[00113] Uvažuje se, že v některých provedeních vynálezu se použije směs jedné nebo více sloučenin podle vynálezu pro zeslabení nebo snížení hořké chuti spojené s kompozicí. Koncentrace jedné nebo více sloučenin může být stejná nebo může být koncentrace každé sloučeniny odlišná.

[00114] Před dalším vysvětlováním vynálezu jsou níže uvedeny následující definice.

[00115] Výraz skupina „T2R“ zahrnuje polymorfní varianty, alely, mutanty a homology, které (1) mají přibližně 30-40% identitu sekvence aminokyselin, konkrétněji asi 40, 50, 60, 70, 75, 80, 85, 90, 95, 96, 97, 98 nebo 99% identitu sekvence aminokyselin vzhledem k níže popsaným T2R, a v přihláškách Zucker (Id) (2001) a Adler (Id.) (2001) zde začleněných odkazem, více než 25 aminokyselin, nejlépe 50-100 aminokyselin; (2) specificky se vážou na protilátky vyvolané proti imunogenu obsahujícímu sekvenci aminokyselin vybranou ze skupiny sestávající ze sekvencí T2R popsaných níže a jejich konzervativně modifikovaných variant; (3) specificky hybridizují (s velikostí přibližně 100, případně alespoň přibližně 500-1000 nukleotidů) za stringentních hybridizačních podmínek na sekvenci vybranou ze skupiny sestávající z DNA sekvencí T2R popsaných níže a jejich konzervativně modifikovaných variant; (4) obsahují sekvenci alespoň přibližně ze 40 % identickou se sekvencí aminokyselin vybranou ze skupiny sestávající z níže popsaných aminokyselinových sekvencí T2R, nebo (5) jsou amplifikovány pomocí primerů, které specificky hybridizují za stringentních hybridizačních podmínek na popsané sekvence T2R.

[00116] Zejména tyto „T2R“ zahrnují GPCR chuťového receptoru, které jsou zde označovány jako hT2R8 a hT2R14 mající sekvence nukleových kyselin a sekvence aminokyselin uvedené v této přihlášce, a jejich varianty, alely, mutanty, orthology a chiméry, které se specificky vážou na hořké ligandy, které jsou zde uvedeny, a další strukturně příbuzné sloučeniny a hořké sloučeniny.

[00117] Zatímco geny T2R vykazují významnou sekvenční odchylku jak na úrovni proteinů, tak na úrovni DNA, bylo zjištěno, že všechny dodnes izolované T2R obsahují určité konvenční sekvence v konkrétních oblastech, které jsou identické nebo které mají alespoň 70-

75% sekvenční identitu s konvenčními sekvencemi T2R identifikovanými dříve ve spisech Adler a kol. (WO 01/77676 A1(2001)) a Zucker a kol. WO 01/18050 A2, které jsou zde tímto odkazem celé zahrnuty.

[00118] Topologicky mají určité chemosenzorické GPCR „N-koncovou doménu“, „mimobuněčné domény“, „transmembránovou doménu“ obsahující sedm transmembránových oblastí, a odpovídající cytoplazmatické a mimobuněčné smyčky, „cytoplazmatické oblasti“ a „C-koncovou oblast“ (viz např. Hoon a kol., Cell, 96:541-51 (1999); Buck & Axel, Cell, 65:175-87 (1991)). Tyto oblasti mohou být strukturně identifikovány za použití způsobů známých v oboru, např. sekvenční analytické programy, které identifikují hydrofobní a hydrofilní domény (viz např. Stryer, Biochemistry, (3. vydání 1988); viz rovněž kterýkoli z řady internetových sekvenčních analytických programů, např. programů nacházejících se na dot.imgen.bcm.tmc.edu). Tyto oblasti jsou užitečné pro tvorbu chimérických proteinů a pro in vitro testy podle vynálezu, např. vazebné testy ligandů. Například chimérické T2R lze vyrobit sloučením mimobuněčné oblasti jednoho T2R a transmembránové oblasti jiného T2R stejného nebo odlišného druhu.

[00119] „Mimobuněčné domény“ se tedy vztahují na domény polypeptidů T2R, které vyčnívají z buněčné membrány a jsou vystaveny mimobuněčné straně buňky. Takové oblasti by zahrnovaly „N-koncovou doménu“, která je vystavena mimobuněčné straně buňky, jakož i mimobuněčné smyčky transmembránové domény, které jsou vystaveny mimobuněčné straně buňky, tj. mimobuněčné smyčky mezi transmembránovými oblastmi 2 a 3, transmembránovými oblastmi 4 a 5 a transmembránovými oblastmi 6 a 7. „N-koncová doména“ začíná na N-konci a vede k oblasti poblíž počátku transmembránové oblasti. Tyto mimobuněčné oblasti jsou užitečné pro in vitro ligandové vazebné testy, jak rozpustné, tak v pevné fázi. Navíc se transmembránové oblasti popsané níže mohou účastnit vázání ligandů, buď ve spojení s mimobuněčnou oblastí nebo samotné, a jsou tedy užitečné pro in vitro vazebné testy ligandů.

[00120] „Buňka exprimující T2R“ zde zahrnuje rekombinantní buňky, které exprimují sekvenci lidského T2R podle vynálezu, jakož i buňky exprimující endogenní T2R. Takové buňky jsou obsaženy v jazykovém a gastrointestinálním systému a zahrnují buňky v ústní dutině, např. chuťové pohárky exprimované na jazyku, jakož i buňky v gastrointestinálním systému a přidružené orgány, např. kardiákové buňky v gastrointestinálním traktu, enteroendokrinní buňky, např. buňky STC-1. Tyto buňky mohou rovněž exprimovat G protein, např. gustducin, transducin, $G_{\alpha 15}$ nebo $G_{\alpha 16}$. Buňky, které exprimují specifické T2R,

mohou být identifikovány a izolovány známými způsoby, např. buněčnou separací FACS a/nebo postupy izolace buněk pomocí magnetických kuliček.

[00121] „Transmembránová doména“, která zahrnuje sedm transmembránových „oblastí“, se vztahuje na doménu polypeptidů T2R, která leží v plazmatické membráně, a může rovněž zahrnovat odpovídající cytoplazmatické (vnitrobuněčné) a mimobuněčné smyčky, kterým se také říká transmembránové „oblasti“. Sedm transmembránových oblastí a mimobuněčných a cytoplazmatických smyček lze identifikovat standardními způsoby, jak jsou popsány ve spisech Kyte & Doolittle, J. Mol. Biol., 157:105-32 (1982)) nebo Stryer, viz výše.

[00122] „Cytoplazmatické domény“ se vztahují na domény proteinů T2R, které jsou obráceny směrem dovnitř buňky, např. „C-koncová doména“ a vnitrobuněčné smyčky transmembránové domény, např. vnitrobuněčné smyčky mezi transmembránovými oblastmi 1 a 2, transmembránovými oblastmi 3 a 4, transmembránovými oblastmi 5 a 6. „C-koncová doména“ se vztahuje na oblast, která sahá od konce poslední transmembránové oblasti k C-konci proteinu a která se normálně nachází v cytoplazmě.

[00123] Výraz „7-transmembránový receptor“ označuje polypeptid, který patří k nadskupině transmembránových proteinů, které mají sedm oblastí, které zasahují do plazmatické membrány sedmkrát (proto se těchto sedm oblastí nazývá „transmembránové“ nebo „TM“ domény TM I až TM VII). Skupiny čichových a určitých chuťových receptorů všechny spadají do této nadskupiny. Polypeptidy 7-transmembránového receptoru mají podobné a charakteristické primární, sekundární a terciární struktury, jak bude podrobněji rozebráno níže.

[00124] Výraz „oblast vázající ligand“ se vztahuje na sekvence odvozené od chemosenzorického nebo chuťového receptoru, který významně začleňuje transmembránové domény II až VII (TM II až VII). Oblast může být schopna vázat ligand a, konkrétněji, sloučeninu navozující chuť.

[00125] Výraz „translokační doména plazmatické membrány“ nebo prostě „translokační doména“ znamená polypeptidovou doménu, která při začlenění do amino-konce polypeptidové kódující sekvence může s velkou účinností „vést“ (chaperon) nebo „translokovat“ hybridní („fúzní“) protein do buněčné plazmatické membrány. Například konkrétní „translokační doména“ původně odvozená od amino-konce polypeptidu lidského rhodopsinového receptoru, může být použita pro 7-transmembránový receptor. Další translokační doména byla odvozena ze sekvence hovězího rhodopsinu a je rovněž užitečná pro usnadnění translokace. Sekvence odvozené od rhodopsinu jsou obzvlášť účinné při translokaci 7-transmembránových fúzních proteinů do plazmatické membrány.

[00126] „Funkční ekvivalence“ znamená schopnost a působnost domény při translokaci nově translatovaných proteinů do plazmatické membrány stejně účinnou, jako má příkladná translokační doména, např. doména odvozená od rhodopsinu, za podobných podmínek; relativní působnosti lze měřit (kvantitativně) a srovnávat, jak je zde popsáno. Domény spadající do rozsahu vynálezu mohou být stanoveny rutinním screeningem jejich působnosti při translokaci nově syntetizovaných polypeptidů do plazmatické membrány v buňce (savec, žába apod.) se stejnou působností jako translokační doména SEKV. ID Č. I, dlouhá aminokyselina.

[00127] Výraz „funkční účinky“ v kontextu testů pro testování sloučenin, které modulují transdukcii chuti zprostředkovanou členem skupiny T2R, zahrnuje stanovení jakéhokoli parametru, který je nepřímo nebo přímo pod vlivem receptoru, např. funkční, fyzikální a chemické účinky. Zahrnuje vázání ligandů, změny iontového toku, membránového potenciálu, průchodu proudu, transkripce, vázání G proteinu, fosforylace nebo defosforylace GPCR, transdukce signálu, interakcí receptor-ligand, koncentrace druhého posla (např. cAMP, cGMP, IP3 nebo vnitrobuněčný Ca^{2+}), in vitro, in vivo a ex vivo a rovněž zahrnuje další fyziologické účinky, např. nárůsty nebo poklesy uvolňování nervových mediátorů nebo hormonů.

[00128] „Stanovení funkčního účinku“ označuje testy na sloučeninu, která zvyšuje nebo snižuje parametr, který je nepřímo nebo přímo pod vlivem člena skupiny T2R, např. funkční, fyzikální a chemické účinky. Takové funkční účinky lze měřit jakýmkoli prostředky známými v oboru, jako jsou např. změny spektroskopických vlastností (např. fluorescence, absorbance, index lomu), hydrodynamické (např. tvar), chromatografické nebo rozpustnostní vlastnosti, technika Patch Clamp, barviva citlivá na elektrické napětí, proudy celých buněk, odtok radioizotopu, indukovatelné markery, exprese genu oocytového T2R; exprese T2R buněk tkáňové kultury; transkripční aktivace genů T2R; ligandové vazebné testy; změny elektrického napětí, membránového potenciálu a konduktance; testy toku iontů; změny vnitrobuněčných druhých poslů, např. cAMP, cGMP a inositoltrifosfátu (IP3); změny hladin vnitrobuněčného vápníku; uvolňování nervových mediátorů apod.

[00129] „Inhibitory“, „aktivátory“ a „modulátory“ receptorů T2R proteinů se používají zaměnitelně a znamenají „inhibující“, „aktivující“ nebo „modulující“ molekuly identifikované za použití in vitro a in vivo testů pro transdukcii chuti, např. ligandy, agonisty, antagonisty a jejich homology a mimetika. Inhibitory jsou sloučeniny, které se například vážou, částečně nebo úplně blokují stimulaci, snižují, zabraňují, zpomalují aktivaci, inaktivují, desenzitizují nebo zmenšují transdukcii chuti, např. antagonisté. Aktivátory jsou sloučeniny,

kteřé se např. vážou, stimulují, zvyšují, zahajují, aktivují, usnadňují, zesilují aktivaci, senzitivizují nebo zvyšují transdukcii chuti, např. agonisté. Modulátory zahrnují sloučeniny, které např. mění interakci receptoru s mimobuněčnými proteiny, které vážou aktivátory nebo inhibitor (např. ebnerin a další členové ze třídy hydrofobních nosičů); G proteiny; kinázy (např. homology rhodopsinkinázy a kinázy beta adrenergického receptoru, které mají podíl na dezaktivaci a desenzitizaci receptoru); a arrestiny, které rovněž dezaktivují a desenzitizují receptory. Modulátory zahrnují geneticky modifikované verze členů skupiny T2R, např. se změněnou aktivitou, jakož i přirozeně se vyskytující a syntetické ligandy, antagonisty, agonisty, malé chemické molekuly apod.

[00130] Takové testy na inhibitory a aktivátory zahrnují např. expresi členů skupiny T2R v buňkách nebo buněčných membránách, použití domnělých modulátorových sloučenin v přítomnosti nebo nepřítomnosti sloučenin, které moduluje, např. hořkých sloučenin, a následně stanovení funkčních účinků na transdukcii chuti, jak bylo popsáno výše. Vzorky a testy obsahující členy skupiny T2R, na které se působilo potenciálním aktivátorem, inhibitorem nebo modulátorem, se porovnají s kontrolními vzorky bez inhibitoru, aktivátoru nebo modulátoru, aby se zkoumal rozsah modulace. Kontrolním vzorkům (na které nebylo působeno modulátory) se přiřadí relativní hodnota aktivity T2R 100 %. Inhibice T2R je dosaženo, je-li hodnota aktivity T2R vzhledem ke kontrolnímu vzorku přibližně 80 %, případně 50 % nebo 25-0 %. Aktivace T2R je dosaženo, je-li hodnota aktivity T2R vzhledem ke kontrolnímu vzorku 110 %, případně 150 %, případně 200-500 % nebo o 1000-3000 % vyšší.

[00131] Výrazy „přečištěný“ (purifikovaný), „významně přečištěný“ (purifikovaný) a „izolovaný“, jak jsou zde používány, označují stav, kdy je sloučenina podle vynálezu bez dalších, nepodobných sloučenin, s nimiž je normálně spojena ve svém přirozeném stavu. S výhodou „přečištěný“, „významně přečištěný“ a „izolovaný“ znamená, že kompozice obsahuje alespoň 0,5 %, 1 %, 5 %, 10 % nebo 20 %, nejvýhodněji alespoň 50 % nebo 75 % hmotn. daného vzorku. V jednom výhodném provedení tyto výrazy označují sloučeninu podle vynálezu obsahující alespoň 95 % hmotn. daného vzorku. Výrazy „přečištěný“, „významně přečištěný“ a „izolovaný“, jak jsou zde používány, jedná-li se o nukleovou kyselinu nebo protein, o nukleové kyseliny nebo proteiny, se rovněž vztahují ke stavu přečištění nebo zkoncentrování odlišnému než jak se přirozeně vyskytuje v savčím, zejména lidském těle. Výraz „izolovaný“ zahrnuje jakýkoli stupeň čištění nebo koncentrování vyšší než jaký se přirozeně vyskytuje v savčím, zejména lidském těle, včetně (1) přečištění od jiných spojených struktur nebo sloučenin nebo (2) spojení se strukturami nebo sloučeninami, s nimiž

sloučenina normálně není spojena v savčím, zejména lidském těle. Zde popsaná nukleová kyselina nebo protein nebo třídy nukleových kyselin nebo proteinů mohou být izolovány nebo jinak spojeny se strukturami nebo sloučeninami, s nimiž normálně nejsou v přírodě spojeny, podle mnoha různých způsobů a postupů, které jsou odborníkům známy.

[00132] Výraz „izolovaný“, jak je zde použit, pokud jde o nukleovou kyselinu nebo polypeptid, označuje stav přečištění nebo zkoncentrování odlišný od stavu, který se přirozeně vyskytuje v savčím, zejména lidském těle. Do významu výrazu „izolovaný“, jak je zde použit, spadá jakýkoli stupeň čištění nebo koncentrování vyšší než jaký se přirozeně vyskytuje v těle, včetně (1) přečištění od jiných přirozeně se vyskytujících spojených struktur nebo sloučenin nebo (2) spojení se strukturami nebo sloučeninami, s nimiž sloučenina normálně není spojena v těle. Zde popsané nukleové kyseliny nebo polypeptidy mohou být izolovány nebo jinak spojeny se strukturami nebo sloučeninami, s nimiž normálně nejsou v přírodě spojeny, podle mnoha různých způsobů a postupů, které jsou odborníkům známy.

[00133] Výrazy „amplifikující“ a „amplifikace“ se vztahují na použití jakékoli amplifikační metodologie pro generování nebo detekování rekombinantní nebo přirozeně exprimované nukleové kyseliny, jak je podrobněji popsáno níže. Vynález například poskytuje způsoby a reagentie (např. specifické oligonukleotidové primerové páry) pro amplifikaci (např. polymerázovou řetězovou reakcí, PCR) přirozeně exprimovaných (např. genomové nebo mRNA) nebo rekombinantních (např. cDNA) nukleových kyselin podle vynálezu (např. sekvence podle vynálezu, vázající sloučeninu, která navozuje chuť) in vivo nebo in vitro.

[00134] Výraz „expresní vektor“ se vztahuje na jakýkoli rekombinantní expresní systém pro expresi sekvence nukleové kyseliny podle vynálezu in vitro nebo in vivo, konstitutivně nebo indukovatelně, v jakékoli buňce, včetně prokaryotické, kvasinkové, houbové, rostlinné, hmyzí nebo savčí buňky. Výraz zahrnuje lineární a kruhové expresní systémy. Výraz zahrnuje expresní systémy, které zůstávají epizomální nebo se integrují do genomu hostitelské buňky. Expresní systémy mohou nebo nemusí mít schopnost auto-replikace, tj. řídit pouze přechodnou expresi v buňce. Výraz zahrnuje rekombinantní expresní „kazety“, které obsahují pouze minimum prvků, které jsou nezbytné pro transkripci rekombinantní nukleové kyseliny.

[00135] Výraz „knihovna“ znamená přípravek, kterým je směs různých molekul nukleových kyselin nebo polypeptidů, např. knihovna rekombinantních generovaných senzorických oblastí, zejména oblastí chuťového receptoru vázajících ligandy, generovaných amplifikací nukleové kyseliny s degenerovanými primerovými páry, nebo izolovaná sbírka vektorů, které obsahují amplifikované oblasti vázající ligandy, nebo směs buněk, které jsou každá náhodně transfekována alespoň jedním vektorem, který kóduje chuťový receptor.

[00141] Výraz „aryl” znamená aromatický substituent, který má jediný kruh nebo několik zkondenzovaných kruhů. Příklady arylových skupin zahrnují, bez omezení, skupiny: fenyl, naftyl, antracenyl, pyridinyl, pyrazinyl, pyrimidinyl, triazinyl, thiofenyl, furanyl, pyrrolyl,

oxazolyl, imidazolyl, triazolyl a tetrazolyl. Arylové skupiny, které obsahují jeden nebo více heteroatomů (např. pyridinyl) jsou často nazývány „heteroarylové skupiny.“ Je-li arylová skupina tvořena několika kruhy, je alespoň jeden z kruhů aromatický. V některých provedeníh alespoň jeden z několika kruhů obsahuje heteroatom, čímž se vytvoří arylová skupina obsahující heteroatom. Arylové skupiny obsahující heteroatom zahrnují, bez omezení, benzoxazolyl, benzimidazolyl, chinolalyl, benzofuranalyl a 1H-benzo[d][1,2,3]triazolyl. Arylové skupiny obsahující heteroatom také zahrnují, bez omezení, 2,3-dihydrobenzo[b][1,4]dioxalyl a benzo[d][1,3]dioxolyl. Arylové skupiny obsahující heteroatom rovněž zahrnují aromatické kruhy zkonzenzované na heterocyclický kruh obsahující alespoň jeden heteroatom a alespoň jednu karbonylovou skupinu. Takové skupiny zahrnují, bez omezení, dioxotetrahydrochinolalyl a dioxotetrahydrochinolalyl.

[00142] Výraz „arylalkoxy“ znamená arylovou skupinu navázanou na alkoxy skupinu.

[00143] Výraz „arylamidoalkyl“ znamená aryl-C(O)NR-alkyl nebo aryl-NRC(O)-alkyl.

[00144] Výraz „arylalkylamidoalkyl“ znamená aryl-alkyl-C(O)NR-alkyl nebo aryl-alkyl-NRC(O)-alkyl, kde R je jakákoli vhodná skupina ze seznamu níže.

[00145] Výraz „arylalkyl“ se vztahuje na arylovou skupinu navázanou na alkylovou skupinu.

[00146] Výraz „halogen“ nebo „halo“ se vztahuje na chlor, brom, fluor nebo jód.

[00147] Výraz „odstupující skupina“ se vztahuje na funkční skupinu nebo atom, které mohou být nahrazeny jinou funkční skupinou nebo atomem v substituční reakci, např. v nukleofilní substituční reakci. Příklady odstupujících skupin zahrnují chlor, brom a jód; estery kyseliny sulfonové, např. mesylát, tosylát, brosylát, nosylát apod.; a skupiny acyloxy, např. acetoxy, trifluoracetoxy apod.

[00148] Výraz „haloalkyl“ znamená alkylovou skupinu mající jeden nebo více atomů halogenu (např. CF₃).

[00149] Výraz „heteroalkyl“ se vztahuje na alkylovou skupinu, která obsahuje heteroatom, např. N, O, P, B, S nebo Si. Heteroatom může být napojen na zbytek heteroalkylové skupiny nasycenou nebo nenasycenou vazbou. Alkyl substituovaný skupinou jako je heterocykloalkyl, substituovaný heterocykloalkyl, heteroaryl, substituovaný heteroaryl, alkoxy, aryloxy, boryl, fosfin, amino, silyl, thio nebo selen spadá do rozsahu výrazu heteroalkyl. Příklady heteroalkylů zahrnují, ale nejsou omezeny na, kyano, benzoyl, 2-pyridyl a 2-furyl.

[00150] Výraz „heteroarylalkyl“ znamená heteroarylovou skupinu, k níž je připojena alkylová skupina.

- [00151] Výraz „heterocyklus“ znamená monocyklický nebo polycyklický kruh obsahující uhlíkové a vodíkové atomy, případně mající 1 nebo 2 násobné vazby, a atomy kruhu obsahují alespoň jeden heteroatom, konkrétně 1 až 4 heteroatomy, nezávisle vybrané z dusíku, kyslíku a síry. Heterocyklické kruhové struktury zahrnují, ale nejsou omezeny na, mono-, bi- a tri-cyklické sloučeniny. Specifické heterocykly jsou monocyklické nebo bicyklické. Představitelé heterocyklů zahrnují cyklické močoviny, morfolinyl, pyrrolidinonyl, pyrrolidinyl, piperidinyl, piperazinyl, hydantoinyl, valerolaktamyl, oxiranyl, oxetanyl, tetrahydrofuranyl, tetrahydropyranyl, tetrahydropyridinyl, tetrahydroprimidinyl, tetrahydrothiofenyl, tetrahydrothiopyranyl, tetrazolyl a urazolyl. Heterocyklický kruh může být nesubstituovaný nebo substituovaný. Výhodnými heterocykly jsou 5- a 6-členné heterocykly, zejména hydantoinyl a urazolyl.
- [00152] Výraz „heterocykloalkyl“ se vztahuje na cykloalkylovou skupinu, v níž je alespoň jeden uhlíkový atom v kruhu nahrazen heteroatomem (např. O, S nebo N).
- [00153] Výrazem „heterocykloalkylalkyl“ je míněna heterocykloalkylová skupina, na níž je připojena alkylová skupina.
- [00154] Výraz „substituovaný“ konkrétně zamýšlí a počítá s jednou nebo více substitucemi, které jsou v oboru běžné. Obecně však odborníci v oboru pochopí, že substituenty by měly být voleny tak, aby neovlivňovaly nepříznivě užitečné vlastnosti sloučeniny nebo aby nezasahovaly nepříznivě do její funkce. Vhodné substituenty mohou zahrnovat například halo skupiny, perfluoroalkylové skupiny, perfluoroalkoxy skupiny, alkylové skupiny, alkenylové skupiny, alkinylové skupiny, hydroxy skupiny, oxo skupiny, merkaptó skupiny, alkylthio skupiny, alkoxy skupiny, arylové nebo heteroarylové skupiny, aryloxy nebo heteroaryloxy skupiny, aralkylové nebo heteroaralkylové skupiny, aralkoxy nebo heteroaralkoxy skupiny, amino skupiny, alkyl- a dialkylamino skupiny, karbamoylové skupiny, alkylkarbonylové skupiny, karboxylové skupiny, alkoxykarbonylové skupiny, alkylaminokarbonylové skupiny, dialkylaminokarbonylové skupiny, arylkarbonylové skupiny, aryloxykarbonylové skupiny, alkylsulfonylové skupiny, arylsulfonylové skupiny, cykloalkylové skupiny, kyano skupiny, C₁-C₆ alkylthio skupiny, arylthio skupiny, nitro skupiny, keto skupiny, acylové skupiny, boronátové nebo boronylové skupiny, fosfátové nebo fosfonylové skupiny, sulfamylové skupiny, sulfonylové skupiny, sulfinylové skupiny, a jejich kombinace. V případě substituovaných kombinací, např. „substituovaného arylalkylu,“ může být substituována buď aryllová nebo alkylová skupina nebo může být substituována jak aryllová, tak alkylová skupina jedním nebo více substituenty. Navíc se v některých případech

mohou vhodné substituenty sloučit za vzniku jednoho nebo více kruhů, jak je odborníkům v oboru známo.

[00155] Zde popsané sloučeniny obsahují jednu nebo více dvojných vazeb a mohou tedy poskytovat cis/trans izomery, jakož i jiné konformační izomery. Tento vynález zahrnuje všechny takové možné izomery i směsi takových izomerů.

[00156] Zde popsané sloučeniny, a zejména výše popsané substituenty, mohou obsahovat jedno nebo více asymetrických center, a proto mohou tvořit diastereomery a optické izomery. Tento vynález zahrnuje všechny takové možné diastereomery i jejich racemické směsi, jejich v podstatě čisté rozlišené enantiomery, všechny možné geometrické izomery a jejich přijatelné soli. Dále jsou zahrnuty také směsi stereoizomerů i izolované specifické stereoizomery. Během postupů syntézy používaných pro přípravu takových sloučenin nebo při používání racemizačních nebo epimerizačních postupů známých v oboru mohou být produkty takových postupů směsi stereoizomerů.

[00157] Výrazy „soli“ a „farmaceuticky přijatelné soli“ tak, jak jsou zde používány, se vztahují na deriváty popsaných sloučenin, kde je mateřská sloučenina modifikována tak, že se z ní vytvoří kyselá nebo zásaditá sůl. Příklady farmaceuticky přijatelných solí zahrnují, ale nejsou omezeny na, soli anorganických nebo organických kyselin bazických skupin, např. aminů, a alkalické nebo organické soli kyselých skupin, např. karboxylových kyselin. Farmaceuticky přijatelné soli zahrnují běžné netoxické soli nebo kvarterní amonné soli mateřské sloučeniny vytvořené například z netoxických anorganických nebo organických kyselin. Takové běžné netoxické soli zahrnují například soli odvozené od anorganických kyselin jako je kyselina chlorovodíková, bromovodíková, sírová, sulfamová, fosforečná a dusičná; a soli připravené z organických kyselin jako je kyselina octová, propionová, jantarová, glykolová, stearová, mléčná, jablečná, vinná, citronová, askorbová, pamoová, maleinová, hydroxymaleinová, fenylactová, glutamová, benzoová, salicylová, sulfanilová, 2-acetoxybenzoová, fumarová, toluensulfonová, methansulfonová, ethandisulfonová, šťavelová a isetionová apod.

[00158] Farmaceuticky přijatelné soli podle vynálezu se mohou syntetizovat z mateřské sloučeniny, která obsahuje zásaditý nebo kyselý zbytek, běžnými chemickými způsoby. Obecně lze takové soli připravit reakcí volných kyselých nebo zásaditých forem těchto sloučenin se stechiometrickým množstvím vhodné zásady nebo kyseliny ve vodě nebo v organickém rozpouštědle nebo ve směsi vody a organického rozpouštědla; obecně jsou výhodná nevodná média jako je éter, ethylacetát, ethanol, isopropanol nebo acetonitril.

Seznamy vhodných solí lze nalézt v *Remington's Pharmaceutical Sciences*, 17. vydání, Mack Publishing Company, Easton, Pa., 1985, str. 1418, jehož obsah je zde začleněn odkazem.

[00159] Výraz „solvát“ znamená sloučeninu nebo její sůl, která dále zahrnuje stechiometrické nebo nestechiometrické množství rozpouštědla navázaného nekovalentními mezimolekulárními silami. Je-li rozpouštědlem voda, je solvát hydrát.

[00160] Výraz „proléčivo“ znamená derivát sloučeniny, který může hydrolyzovat, oxidovat nebo jinak reagovat za biologických podmínek (*in vitro* nebo *in vivo*) za vzniku aktivní sloučeniny, konkrétně sloučeniny podle vynálezu. Příklady proléčiv zahrnují, ale nejsou omezeny na, deriváty a metabolity sloučeniny podle vynálezu, které zahrnují biohydrolyzovatelné zbytky, např. biohydrolyzovatelné amidy, biohydrolyzovatelné estery, biohydrolyzovatelné karbamáty, biohydrolyzovatelné karbonáty, biohydrolyzovatelné ureidy a biohydrolyzovatelné fosfátové analogy. Specifickými proléčivy sloučenin s karboxylovými funkčními skupinami jsou estery nižších alkylů a karboxylových kyselin. Karboxylátové estery se výhodně tvoří esterifikací jakéhokoli zbytku karboxylové kyseliny přítomného v molekule. Proléčiva lze typicky připravit za použití známých způsobů, např. způsobů popsanych v *Burger's Medicinal Chemistry and Drug Discovery* 6. vydání (Donald J. Abraham ed., 2001, Wiley) a *Design and Application of Prodrugs* (H. Bundgaard ed., 1985, Harwood Academic Publishers GmbH).

[00161] Není-li uvedeno jinak, výrazy „biohydrolyzovatelný amid“, „biohydrolyzovatelný ester“, „biohydrolyzovatelný karbamát“, „biohydrolyzovatelný karbonát“, „biohydrolyzovatelný ureid“, „biohydrolyzovatelný fosfát“, jak jsou zde používány, znamenají amid, ester, karbamát, karbonát, ureid nebo fosfát, v tomto pořadí, sloučeniny, která buď: 1) nezasahuje do biologické aktivity sloučeniny, ale může dodat této sloučenině výhodné vlastnosti *in vivo*, např. příjem sloučeniny, trvání akce nebo nástup akce; nebo 2) je biologicky neaktivní, ale je převedena *in vivo* na biologicky aktivní sloučeninu. Příklady biohydrolyzovatelných esterů zahrnují, ale nejsou omezeny na, estery nižších alkylů, alkoxyacyloxyestery, alkylacylaminoalkylestery a cholinestery. Příklady biohydrolyzovatelných amidů zahrnují, ale nejsou omezeny na, amidy nižších alkylů, amidy alfa-aminokyselin, alkoxyacylamidy a alkylaminoalkylkarbonylamidy. Příklady biohydrolyzovatelných karbamátů zahrnují, ale nejsou omezeny na, nižší alkylaminy, substituované ethylendiaminy, aminokyseliny, hydroxyalkylaminy, heterocyklické a heteroaromatické aminy a polyéteraminy.

[00162] Výraz „jeho analog“, jak je zde užíván, v kontextu zde popsanych sloučenin zahrnuje diastereomery, hydráty, solváty, soli, proléčiva a N-oxidy sloučenin.

- [00163] Zde popsaná „translokační doména“, „oblast vázající ligand“ a kompozice chimérických receptorů rovněž zahrnují „analogy“ nebo „konzervativní varianty“ a „mimetika“ (peptidomimetika) se strukturami a aktivitou, které značně odpovídají ukázkovým sekvencím. Výrazy „konzervativní varianta“ nebo „analog“ nebo „mimetikum“ se tedy vztahují na polypeptid, který má sekvenci aminokyselin modifikovanou tak, že tato změna(y) nemění podstatně strukturu a/nebo aktivitu polypeptidu (konzervativní varianty), jak jsou zde popsány. Změny zahrnují konzervativně modifikované variace aminokyselinové sekvence, tj. aminokyselinové substituce, adice nebo odstranění těch zbytků, které nejsou pro aktivitu proteinu důležité, nebo substituce aminokyselin zbytky, které mají podobné vlastnosti (např. kyselé, bazické, pozitivně nebo negativně nabitě, polární nebo nepolární atd.), tak aby substituce i důležitých aminokyselin neměnila podstatně strukturu a/nebo aktivitu.
- [00164] Konkrétněji se výraz „konzervativně modifikované varianty“ týká jak sekvenci aminokyselin, tak sekvenci nukleových kyselin. Pokud jde o konkrétní sekvence nukleových kyselin, pak se konzervativně modifikované varianty vztahují na ty nukleové kyseliny, které kódují identické nebo v zásadě identické aminokyselinové sekvence, nebo kde nukleová kyselina nekóduje aminokyselinovou sekvenci, na v zásadě identické sekvence. Díky degeneraci genetického kódu mnoho funkčně identických nukleových kyselin kóduje jakýkoli daný protein.
- [00165] Např. kodony GCA, GCC, GCG a GCU všechny kódují aminokyselinu alanin. Proto v každé poloze, kde je kodonem specifikován alanin, může být kodon změněn na kterýkoli z popsaných odpovídajících kodonů, aniž by se změnil kódovaný polypeptid.
- [00166] Takové variace nukleových kyselin jsou „tiché variace“, které jsou jedním druhem konzervativně modifikovaných variací. Každá sekvence nukleových kyselin, která kóduje polypeptid, zde rovněž popisuje každou možnou tichou variaci nukleové kyseliny. Odborník v oboru pozná, že každý kodon v nukleové kyselině (kromě AUG, který je běžně jediným kodonem pro methionin, a TGG, který je běžně jediným kodonem pro tryptofan) může být modifikován za vzniku funkčně identické molekuly. Proto každá tichá variace nukleové kyseliny, která kóduje polypeptid, je zahrnuta v každé popsané sekvenci.
- [00167] Tabulky konzervativních substitucí poskytujících funkčně podobné aminokyseliny jsou v oboru dobře známy. Například jeden ukázkový návod pro výběr konzervativních substitucí zahrnuje (za původním zbytkem je uvedena ukázková substituce): ala/gly nebo ser; arg/lys; asn/gln nebo his; asp/glu; cys/ser; gin/asn; gly/asp; gly/ala nebo pro; his/asn nebo gln; ile/leu nebo val; leu/ile nebo val; lys/arg nebo gln nebo glu; met/leu nebo tyr nebo ile; phe/met nebo leu nebo tyr; ser/thr; thr/ser; trp/tyr; tyr/trp nebo phe; val/ile nebo leu.

Alternativní ukázkový návod používá následujících šest skupin, přičemž každá obsahuje aminokyseliny, které jsou si vzájemně konzervativními substitucemi: 1) Alanin (A), Serin (S), Threonin (T); 2) Kyselina asparťová (D), Kyselina glutamová (E); 3) Asparagin (N), Glutamin (Q); 4) Arginin (R), Lysin (I); 5) Isoleucin (I), Leucin (L), Methionin (M), Valin (V); a 6) Fenylalanin (F), Tyrosin (Y), Tryptofan (W); (viz také např. Creighton, Proteins, W. H. Freeman and Company (1984); Schultz and Schimer, Principles of Protein Structure, Springer-Verlag (1979)). Odborník v oboru ocení, že výše identifikované substituce nejsou jedinými možnými konzervativními substitucemi. Například pro některé účely může někdo považovat veškeré nabité aminokyseliny za vzájemné konzervativní substituce, ať už jsou nabitě pozitivně nebo kladně. Navíc mohou být za „konzervativně modifikované variace“ považovány i individuální substituce, delece nebo adice, které mění, přidávají nebo odstraňují jedinou aminokyselinu nebo malé procento aminokyselin v kódované sekvenci.

[00168] Výraz „mimetikum“ nebo „peptidomimetikum“ se vztahuje na syntetickou chemickou sloučeninu, která má výrazně stejné strukturní a/nebo funkční vlastnosti polypeptidů, např. translokační domény, oblasti vázající ligand nebo chimérické receptory podle vynálezu. Mimetikum může být buď zcela složeno ze syntetických, nepřirodních analogů aminokyselin nebo může být chimérickou molekulou částečně z přírodních peptidových aminokyselin a částečně z nepřirodních analogů aminokyselin. Mimetikum může rovněž obsahovat jakékoli množství konzervativních substitucí přirozených aminokyselin, pokud tyto substituce výrazně nemění strukturu a/nebo aktivitu mimetika.

[00169] Stejně jako u polypeptidů podle vynálezu, které jsou konzervativními variantami, rutinní experimentace určí, zda je mimetikum v rozsahu vynálezu, tj. zda není jeho struktura a/nebo funkce významně změněna. Polypeptidové mimetické kompozice mohou obsahovat jakoukoli kombinaci nepřirodních strukturních komponent, které jsou typicky ze tří strukturních skupin: a) skupiny vázající zbytky, jiné než je přirozená amidová vazba („peptidická vazba“), b) nepřirodní zbytky místo přirozeně se vyskytujících aminokyselinových zbytků; nebo c) zbytky, které navozují sekundární strukturní mimiku, tj. navozují nebo stabilizují sekundární strukturu, např. konformace beta-otočka, gama-otočka, beta skládaný list, alfa helix apod. Polypeptid lze charakterizovat jako mimetikum, když jsou všechny nebo některé z jeho zbytků chemicky spojeny chemicky, ale nikoli přirozenými peptidickými vazbami. Jednotlivé peptidomimetické struktury mohou být spojeny peptidickými vazbami, jinými chemickými vazbami nebo spojovacími prostředky, jako je např. glutaraldehyd, N-hydroxysukcinimidové estery, bifunkční maleimidy, N,N'-dicyklohexylkarbodiimid (DCC) nebo N,N'-diisopropylkarbodiimid (DIC). Spojovací skupiny, které

mohou být alternativou k tradiční amidové vazbě ("peptidické vazbě"), zahrnují např. ketomethylen (např. $-\text{C}(=\text{O})-\text{CH}_2$ pro $-\text{C}(=\text{O})-\text{NH}-$), aminomethylen (CH_2NH), ethylen, olefin (CH_2CH_2), éter (CH_2O), thioéter (CH_2-S), tetrazol (CN_4), thiazol, retroamid, thioamid nebo ester (viz např. Spatola, Chemistry and Biochemistry of Amino Acids, Peptides and Proteins, Sv. 7, 267-357, Marcell Dekker, Peptide Backbone Modifications, NY (1983)). Polypeptid může být rovněž charakterizován jako mimetikum tím, že obsahuje všechny nebo některé nepřirodní zbytky namísto přirozeně se vyskytujících aminokyselinových zbytků; nepřirodní zbytky jsou v odborné a patentové literatuře dobře popsány.

[00170] „Značka“ nebo „detekovatelný zbytek“ je kompozice detekovatelná spektroskopicky, fotochemicky, biochemicky, imunochemicky nebo chemicky. Užitečné značky zahrnují například ^{32}P , fluorescenční barviva, elektrondenční reakční činidla, enzymy (např. jaké se běžně používají v testech ELISA), biotin, digoxigenin nebo hapteny a proteiny, které mohou být učiněny detekovatelnými, např. začleněním radioznačky do peptidu, nebo používané pro detekci protilátek specificky reagujících s peptidem.

[00171] „Označená nukleotidová sonda nebo oligonukleotid“ je sonda, která je vázána buď kovalentně, prostřednictvím linkeru nebo chemickou vazbou, nebo nekovalentně, iontovými, van der Waalovými, elektrostatickými nebo vodíkovými vazbami, ke značce tak, aby přítomnost sondy mohla být detekována detekcí přítomnosti značky navázané na sondu.

[00172] Výraz „nukleotidová sonda nebo oligonukleotid“, jak je zde používán, je definován jako nukleová kyselina schopná vázat se na cílovou nukleovou kyselinu komplementární sekvence jedním nebo více typy chemických vazeb, obvykle prostřednictvím párování komplementárních bazí, obvykle prostřednictvím tvorby vodíkové vazby. Sonda, jak je zde používána, zahrnuje přirozené (tj. A, G, C nebo T) nebo modifikované báze (7-deazaguanosin, inosin atd.). Navíc mohou být báze v sondě spojeny vazbou jinou než je fosfodiesterová vazba, pokud to neruší hybridizaci. Sondy tedy mohou být například peptidové nukleové kyseliny, kde jsou konstituující báze spojeny peptidickými vazbami, spíše než fosfodiesterovými vazbami. Odborník pochopí, že sondy mohou vázat cílové sekvence, které postrádají kompletní komplementaritu k sekvenci sondy, v závislosti na stringentnosti hybridizačních podmínek. Sondy jsou případně přímo označeny např. izotopy, chromofory, luminofory, chromogeny, nebo nepřímo označeny, např. biotinem, na nějž se může později vázat streptavidinový komplex. Testováním přítomnosti nebo nepřítomnosti sondy lze detekovat přítomnost nebo nepřítomnost vybrané sekvence nebo subsekvence.

[00173] Výraz „heterologní“, užije-li se ve vztahu k částem nukleové kyseliny, značí, že nukleová kyselina obsahuje dvě nebo více subsekvencí, které se v přírodě nenacházejí ve

stejném vzájemném vztahu. Například nukleová kyselina je typicky vytvářena rekombinantní a má dvě nebo více sekvencí z nepříbuzných genů uspořádané tak, aby vytvořily novou funkční nukleovou kyselinu, např. promotor z jednoho zdroje a kódující oblast z jiného zdroje. Podobně i heterologní protein značí, že protein obsahuje dvě nebo více subsekvencí, které se v přírodě nenacházejí ve stejném vzájemném vztahu (např. fúzní protein).

[00174] „Promotor“ je definován jako sada sekvencí nukleových kyselin, která řídí transkripci nukleové kyseliny. Výraz promotor, jak je zde používán, zahrnuje nezbytné sekvence nukleových kyselin poblíž počátečního místa transkripce, např. v případě promotoru typu polymerázy II poblíž prvku TATA. Promotor rovněž případně zahrnuje vzdálené zesilovací nebo potlačující prvky, které mohou být umístěny až několik tisíc párů bází od počátečního místa transkripce. „Konstitutivním“ promotorem je promotor, který je aktivní za většiny okolních a vývojových podmínek. „Indukovatelným“ promotorem je promotor, který je aktivní za okolní nebo vývojové regulace. Výraz „funkčně spojen“ se vztahuje na funkční vazbu mezi sekvencí nukleové kyseliny řídící expresi (např. promotor nebo sada vazebných míst transkripčních faktorů) a druhou sekvencí nukleové kyseliny, přičemž sekvence řídící expresi řídí transkripci nukleové kyseliny podle druhé sekvence.

[00175] Výraz „rekombinantní“, jak je zde používán, se vztahuje na polynukleotid syntetizovaný nebo jinak zpracovaný *in vitro* (např. „rekombinantní polynukleotid“), na způsoby použití rekombinantních polynukleotidů pro tvorbu genových produktů v buňkách nebo jiných biologických systémech, nebo na polypeptid („rekombinantní protein“) kódovaný rekombinantní polynukleotidem. „Rekombinantní prostředky“ rovněž zahrnují ligaci nukleových kyselin majících různé kódující oblasti nebo domény nebo promotorové sekvence z různých zdrojů do expresní kazety nebo vektoru pro expresi, např. indukovatelnou nebo konstitutivní expresi fúzního proteinu obsahujícího translokační doménu podle vynálezu a sekvenci nukleové kyseliny amplifikovanou za použití primeru podle vynálezu.

[00176] Výraz „selektivně (nebo specificky) hybridizuje na“ se vztahuje na vázání, zdvojování nebo hybridizaci molekuly pouze na konkrétní nukleotidovou sekvenci za stringentních hybridizačních podmínek, když je sekvence přítomna v komplexní směsi (např. celá buněčná DNA nebo RNA nebo knihovny DNA nebo RNA).

[00177] Výraz „stringentní hybridizační podmínky“ se vztahuje na podmínky, za nichž sonda hybridizuje na svou cílovou subsekvenci, typicky v komplexní směsi nukleové kyseliny, ale na žádné jiné sekvence. Stringentní podmínky jsou závislé na sekvenci a budou za různých okolností různé. Další sekvence hybridizují specificky za vyšších teplot. Rozsáhlý návod na hybridizaci nukleových kyselin lze nalézt v Tijssen, *Techniques in Biochemistry*

and Molecular Biology--Hybridization with Nucleic Probes, "Overview of principles of hybridization and the strategy of nucleic acid assays" (1993). Obecně se stringentní podmínky volí tak, aby byly přibližně o 5-10 °C nižší než je tepelný bod tání (T_m) pro specifickou sekvenci za definovaného pH iontové síly. T_m je teplota (za definované iontové síly, pH a nukleové koncentrace), při níž 50 % sond komplementárních k cílové hybridizují na cílovou sekvenci za rovnováhy (jelikož jsou cílové sekvence přítomny v nadbytku, při T_m je 50 % sond obsazeno za rovnováhy). Stringentní podmínky budou takové, kde koncentrace soli je nižší než přibližně 1,0M koncentrace sodného iontu, obvykle přibližně 0,01 až 1,0M koncentrace sodného iontu (nebo jiných solí) při pH 7,0 až 8,3 a teplota je alespoň přibližně 30 °C pro krátké sondy (např. 10 až 50 nukleotidů) a alespoň přibližně 60 °C pro dlouhé sondy (např. delší než 50 nukleotidů). Stringentních podmínek lze také dosáhnout přidávkem destabilizujících činidel, např. formamidu. Pro selektivní nebo specifickou hybridizaci je pozitivní signál alespoň dvakrát pozadí, případně 10-krát pozadí hybridizace. Ukázkové stringentní hybridizační podmínky mohou být následující: 50% formamid, 5 x SSC a 1% SDS, inkubace při 42 °C, nebo 5 x SSC, 1% SDS, inkubace při 65 °C, s promytím v 0,2 x SSC a 0,1% SDS při 65 °C. Takové hybridizace a promývací kroky lze provádět po dobu například 1, 2, 5, 10, 15, 30, 60; nebo více minut.

[00178] Nukleové kyseliny, které vzájemně nehybridizují za stringentních podmínek jsou stále významně příbuzné, pokud polypeptidy, které kódují, jsou významně příbuzné. To se stane například když se vytvoří kopie nukleové kyseliny za použití maximální kodonové degenerace umožněné genetickým kódem. V takových případech nukleové kyseliny typicky hybridizují za slabě stringentních hybridizačních podmínek. Ukázkové „slabě stringentní hybridizační podmínky“ zahrnují hybridizaci v pufru ze 40% formamidu, 1M NaCl, 1% SDS při 37 °C, a promytí v 1 x SSC při 45 °C. Takové hybridizační a promývací kroky mohou být prováděny po dobu např. 1, 2, 5, 10, 15, 30, 60 nebo více minut. Pozitivní hybridizace je alespoň dvakrát pozadí. Odborník v oboru snadno pozná, že lze použít alternativní podmínky hybridizace a promývání, aby se zajistily podmínky o podobné stringentnosti.

[00179] „Protilátka“ se vztahuje na polypeptid obsahující úsek základní struktury z imunoglobulinového genu nebo jeho fragmenty, který se specificky váže a rozpoznává antigen. Rozpoznané imunoglobulinové geny zahrnují geny konstantních oblastí kappa, lambda, alfa, gama, delta, ypsilon a mí, jakož i nesčetné imunoglobulinové geny proměnlivých oblastí. Lehké řetězce jsou klasifikovány buď jako kappa nebo jako lambda. Těžké řetězce jsou klasifikovány jako gama, mí, alfa, delta nebo epsilon, které na oplátku definují imunoglobulinové třídy IgG, IgM, IgA, IgD a IgE, v tomto pořadí.

- [00180] Ukázková imunoglobulinová (protilátková) strukturní jednotka obsahuje tetrametr. Každý tetrametr je složen ze dvou identických párů polypeptidových řetězců, přičemž každý pár má jeden „lehký“ (asi 25 kDa) a jeden „těžký“ (asi 50-70 kDa) řetězec. N-konec každého řetězce definuje proměnlivou oblast o přibližně 100 až 110 nebo více aminokyselinách, která je primárně zodpovědná za rozpoznání antigenu. Výrazy proměnlivý lehký řetězec (V_L) a proměnlivý těžký řetězec (V_H) se vztahují na tyto lehké, resp. těžké řetězce.
- [00181] „Chimérická protilátka“ je molekula protilátky, kde (a) konstantní oblast nebo její část je změněna, nahrazena nebo vyměněna tak, aby bylo vazební místo antigenu (proměnlivá oblast) spojeno s konstantní oblastí jiné nebo změněné třídy, efektorové funkce a/nebo druhu, nebo ke zcela odlišné molekule, která dodá chimérické protilátce nové vlastnosti, např. k enzymu, toxinu, hormonu, růstovému faktoru, léčivu atd., nebo (b) proměnlivá oblast nebo její část je změněna, nahrazena nebo vyměněna proměnlivou oblastí mající odlišnou nebo změněnou antigenovou specifitu.
- [00182] Protilátka „anti-T2R“ je protilátka nebo fragment protilátky, která specificky váže polypeptid kódovaný genem T2R, cDNA nebo jejich subsekvencí.
- [00183] Výraz „imunologický test“ je test, který používá protilátku pro specifické vázání antigenu. Imunologický test se vyznačuje použitím specifických vazebních vlastností konkrétní protilátky pro izolaci, cílení a/nebo kvantifikaci antigenu.
- [00184] Výraz „specificky (nebo selektivně) se váže“ na protilátku nebo „specificky (nebo selektivně) imunitně reaguje s“, pokud jde o protein nebo peptid, se vztahuje na vazebnou reakci, která určuje přítomnost proteinu v heterogenní populaci proteinů a dalších biologických látek. Za daných podmínek imunologického testu se tedy protilátky vážou na konkrétní protein alespoň dvakrát pozadí a nevážou se výrazně ve významném množství na další proteiny přítomné ve vzorku. Specifické vázání na protilátku za takových podmínek může vyžadovat protilátku, která je vybrána pro svou specifitu ke konkrétnímu proteinu.
- [00185] Například polyklonální protilátky vypěstované na člena skupiny T2R ze specifických druhů, jako je krysa, myš nebo člověk, mohou být vybírány pro získání pouze takových polyklonálních protilátek, které specificky imunologicky reagují s polypeptidem T2R nebo jeho imunogenní částí a ne s jinými proteiny, kromě ortologních nebo polymorfních variant a alel polypeptidu T2R. Tohoto výběru lze dosáhnout odečtením protilátek, které křížově reagují s molekulami T2R z jiných druhů nebo s jinými molekulami T2R. Protilátky mohou být rovněž vybírány tak, aby rozpoznaly pouze členy skupiny T2R GPCR, ale nikoli GPCR z jiných skupin. Pro výběr protilátek, které specificky imunologicky reagují s konkrétním proteinem. Lze použít mnoho různých formátů imunologických testů.

Běžně se používají pro výběr protilátek specificky imunologicky reagujících s proteinem například imunologické testy ELISA na pevné fázi (viz např. Harlow & Lane, Antibodies, A Laboratory Manual, (1988) pro popis formátů a podmínek imunologických testů, které lze použít pro určení specifické imunologické reaktivity). Typicky bude specifická nebo selektivní reakce alespoň dvakrát signál nebo hluk pozadí a ještě typičtěji více než 10 až 100-krát pozadí.

[00186] Výraz „selektivně se spojuje s“ se vztahuje na schopnost nukleové kyseliny „selektivně hybridizovat“ s jinou, jak je popsáno výše, nebo schopnost protilátky selektivně (nebo specificky) se vázat na protein, jak bylo definováno výše.

[00187] Výraz „expresní vektor“ se vztahuje na jakýkoli rekombinantní expresní systém pro účely exprese sekvence nukleové kyseliny podle vynálezu in vitro nebo in vivo, konstitutivně nebo indukovatelně, v jakékoli buňce, včetně prokaryotických, kvasinek, hub, rostlin, hmyzu nebo savčích buněk. Výraz zahrnuje lineární nebo kruhové expresní systémy. Výraz zahrnuje expresní systémy, které zůstávají epizomální nebo se začlení do genomu hostitelské buňky. Expresní systémy mohou nebo nemusí mít schopnost auto-replikace, tj. řídit pouze přechodnou expresi v buňce. Výraz zahrnuje rekombinantní expresní kazety, které obsahují pouze minimum prvků nezbytných pro transkripci rekombinantní nukleové kyseliny.

[00188] „Hostitelskou buňkou“ je míněna buňka, která obsahuje expresní vektor a podporuje replikaci nebo expresi expresního vektoru. Hostitelské buňky mohou být prokaryotické buňky, např. *E. coli*, nebo eukaryotické buňky, např. buňky kvasinek, hmyzu, obojživelníků nebo savců, např. CHO, HeLa, HEK-293 apod., např. kultivované buňky, explantát a buňky in vivo.

[00189] Na základě výše uvedeného poskytuje vynález testy pro identifikaci sloučenin, které moduluji, s výhodou blokuji, specifickou aktivaci předem identifikovaného lidského receptoru hořké chuti hořkými sloučeninami, např. hořkými sloučeninami přítomnými v kávě a extraktech z kávy a strukturně příbuznými a dalšími hořkými sloučeninami. Konkrétně vynález poskytuje buněčné testy pro identifikaci sloučenin, které moduluji (např. blokuji) aktivaci hT2R8 a hT2R14. Tyto sloučeniny moduluji hořkou chuť spojenou s těmito chuťovými receptory u lidských subjektů. To se pak potvrdí v chuťových testech.

[00190] Vynález také identifikuje a poskytuje antagonistu s antagonistickými vlastnostmi o široké působnosti, které lze použít v potravinách, nápojích, léčivech a dalších materiálech pro požití člověkem nebo zvířetem, obsahujících známé nebo neznámé hořké sloučeniny, přičemž hořká chuť je vhodně minimalizována nebo eliminována.

[00191] To, že výše uvedené chuťové receptory specificky odpovídají na hořkou sloučeninu(y) přítomnou v kávě a na specifické hořké sloučeniny, které interagují s jedním, násobným nebo neznámým receptorem hořké chuti, se stanovilo v zásadě pomocí expresního systému HEK293 a vápníkových zobrazovacích metod, o nichž se píše v jiných publikacích, jakož i v přihláškách vynálezů podaných současným majitelem této přihlášky, např. US č. 10/191,058 a 09/825,882, které jsou zde obě celé zahrnuty odkazem. Konkrétněji vynálezci transfektovali buňky HEK293 konkrétním hT2R označeným rhodopsinovou 35-aminokyselinovou značkou (SEKV. ID. Č. 1) spolu s chimérickým G proteinem (G16gust44), který obsahuje sekvenci G_{u16} G proteinu modifikovanou nahrazením karboxy-44-aminokyselinových zbytků zbytky gustducinu a zaznamenali odpovědi těchto buněk na specifické hořké ligandy vápníkovými zobrazovacími metodami.

[00192] Konkrétně vynálezci použili savčí buněčný test pro monitorování aktivit hT2R. Pro vápníkové zobrazovací testy se buňky naočkovaly do 48-jamkových tkáňových kultivačních destiček. O 24 hodin později se buňky přechodně transfektovaly expresním plazmidem (pEAK10) obsahujícím sekvenci nukleové kyseliny hT2R a plazmidem (pEAK10) obsahujícím chimérický G protein (G16gust44). O dalších 24 hodin později se buňky inkubovaly s fluorescenčním barvivem specifickým pro vápník (Fluo-4; Molekulární sondy). Naplněné buňky se vystaví různým hořkým sloučeninám a aktivace hT2R vede k aktivaci G16gust44, která na oplátku vede k mobilizaci vápníku uvnitř buněk. Tento nárůst koncentrace vápníku mění fluorescenční vlastnosti vápenatého barviva uvnitř buněk. Tyto změny se monitorují za použití fluorescenční mikroskopie.

[00193] Vynálezci rovněž použili automatický fluorimetrický zaměřovací systém FLIPR za použití mírně odlišného protokolu. Buněčná linie HEK293 stabilně exprimující G16gust44 se transfektovala expresním plazmidem hT2R, o 24 hodin později se buňky naložily a analyzovaly na FLIPRu.

[00194] Poté, co je pro konkrétní hT2R identifikován ligand, vytvoří se buněčná linie stabilně exprimující jak hT2R, tak G16gust44, což usnadní budoucí screeningové testy pro identifikaci dalších ligandů, které aktivují konkrétní hT2R nebo které modulují (blokuji nebo zesilují) aktivaci tohoto hT2R jiným hořkým ligandem, jako je např. hořká sloučenina obsažená v kávě. Tím se zabrání nutnosti přechodné transfekce.

[00195] Jak je znázorněno na obrázcích, takové experimenty ukázaly, že hT2R8 a hT2R14 reagují na hořké sloučeniny přítomné v kávě, a identifikovaly sloučeniny, které inhibují nebo blokuji hořkou chuť kávy. Experimenty také na obr. 5 a v příkladu 3 níže ukazují široké antagonistické vlastnosti konkrétně sloučeniny C.

[00196] Tyto výsledky ukazují, že buňky, které identifikovaly chuťové receptory hT2R, mohou být použity v testech pro identifikaci ligandů, které modulují hořkou chuť spojenou s alespoň jedním ze zmíněných konkrétních hT2R, jakož i v testech pro detekci sloučenin zodpovědných za hořkou chuť.

[00197] Tyto testy s výhodou využijí testovací buňku, která exprimuje DNA kódující hT2R mající jednu z aminokyselinových sekvencí definovaných níže. Očekává se však, že i fragmenty, ortology, varianty a chiméry těchto receptorových polypeptidů, které si uchovají funkční vlastnosti těchto receptorů hořké chuti, tj. budou reagovat na některé hořké sloučeniny, budou v těchto testech užitečné. Příklady takových variant zahrnují spojené varianty, polymorfismy jednoho nukleotidu, alelové varianty a mutace vytvořené rekombinantně nebo chemicky, nebo přirozeně se vyskytující. Prostředky izolace a exprese T2R, které se používají v testech podle vynálezu a v testech, které jsou zamýšleny pro použití v tomto vynálezu pro identifikaci sloučenin, které inhibují aktivaci těchto receptorů, jsou objasněny níže.

Izolace a exprese T2R

[00198] Izolace a exprese T2R nebo jeho fragmentů nebo variant podle vynálezu mohou být provedeny zavedenými klonovacími postupy za použití sond nebo primerů konstruovaných na základě sekvencí nukleových kyselin T2R popsanych v této přihlášce. Příbuzné sekvence T2R mohou být také identifikovány z lidských nebo jiných genomových databází za použití zde popsanych sekvencí a známých počítačových vyhledávacích technologií, např. vyhledávání sekvencí BLAST. V jednom konkrétním provedení mohou být pro identifikaci funkčních alel nebo příbuzných genů použity zde popsané pseudogeny.

[00199] Expresní vektory pak mohou být použity k infekci nebo transfekci hostitelských buněk pro funkční expresi těchto sekvencí. Tyto geny a vektory mohou být vytvořeny a exprimovány in vitro nebo in vivo. Odborník v oboru pozná, že požadované fenotypy pro měnění a řízení exprese nukleových kyselin lze získat modulací exprese nebo aktivity genů a nukleových kyselin (např. promotorů, zesilovačů apod.) ve vektorech podle vynálezu. Lze použít jakýkoli popsany známý způsob pro zvýšení nebo snížení exprese nebo aktivity. Vynález může být praktikován ve spojení s jakýmkoli způsobem nebo protokolem známým v oboru, které jsou dobře popsány v odborné a patentové literatuře.

[00200] Alternativně mohou být tyto nukleové kyseliny syntetizovány in vitro dobře známými technikami chemické syntézy, jak je popsáno např. v Carruthers, Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol. 47:411-18 (1982); Adams, Am. Chem. Soc., 105:661 (1983); Belousov, Nucleic Acids Res. 25:3440-3444 (1997); Frenkel, Free Radic. Biol. Med. 19:373-

380 (1995); Blommers, *Biochemistry* 33:7886-7896 (1994); Narang, *Meth. Enzymol.* 68:90 (1979); Brown, *Meth. Enzymol.* 68:109 (1979); Beaucage, *Tetra. Lett.* 22:1859 (1981); U.S. patent č. 4,458,066. Fragmenty dvoušroubovicové DNA pak lze získat buď syntézou komplementárního řetězce a spojením řetězců dohromady za vhodných podmínek nebo přidáním komplementárního řetězce za použití DNA polymerázy s vhodnou primerovou sekvencí.

[00201] Techniky manipulace s nukleovými kyselinami, např. pro generování mutací v sekvencích, sub-klonování, značkovací sondy, sekvencování, hybridizace apod. jsou dobře popsány v odborné a patentové literatuře. Viz např. Sambrook, ed., *Molecular Cloning: A Laboratory Manual* (2nd ed.), Svazky 1-3, Cold Spring Harbor Laboratory (1989); Ausubel, ed., *Current Protocols in Molecular Biology*, John Wiley & Sons, Inc., New York (1997); Tijssen, ed., *Laboratory Techniques in Biochemistry and Molecular Biology: Hybridization With Nucleic Acid Probes, Part I, Theory and Nucleic Acid Preparation*, Elsevier, N.Y. (1993).

[00202] Nukleové kyseliny, vektory, kapsidy, polypeptidy apod. se mohou analyzovat a kvantifikovat jakýmkoli z mnoha obecných prostředků, které odborníci v oboru dobře znají. Tyto prostředky zahrnují např. analytické biochemické metody jako je NMR, spektrofotometrie, radiografie, elektroforéza, kapilární elektroforéza, vysokoúčinná kapalinová chromatografie (HPLC), tenkovrstvá chromatografie (TLC) a hyperdifúzní chromatografie, různé imunologické metody, např. fluidní nebo gelové precipitací reakce, imunodifúze, imunoelektroforéza, radioimunologické testy (RIA), enzymová imunosorpční analýza (ELISA), imunofluorescenční testy, analýza Southern blot, analýza Northern blot, analýza dot blot, gelová elektroforéza (např. SDS-PAGE), RT-PCR, kvantitativní PCR, další amplifikační metody pro amplifikaci nukleové kyseliny nebo cíle nebo signálu, radioznačkování, scintilační počítání a afinitní chromatografie.

[00203] Oligonukleotidové primery mohou být použity pro amplifikaci nukleových kyselin kódujících oblast T2R vázající ligand. Zde popsané nukleové kyseliny mohou být rovněž klonovány nebo měřeny kvantitativně za použití amplifikačních technik. Amplifikační metody jsou rovněž dobře známy v oboru a zahrnují např. polymerázovou řetězovou reakci (PCR) (Innis ed., *PCR Protocols, a Guide to Methods and Applications*, Academic Press, N.Y. (1990); Innis ed., *PCR Strategies*, Academic Press, Inc., N.Y. (1995)); ligázovou řetězovou reakci (LCR) (Wu, *Genomics*, 4:560 (1989); Landegren, *Science*, 241:1077 (1988); Barringer, *Gene*, 89:117 (1990)); transkripční amplifikaci (Kwoh, *PNAS*, 86:1173 (1989)); sekvenční autoreplikace (Guatelli, *PNAS*, 87:1874 (1990)); Q-beta replikázová amplifikace

(Smith, J. Clin. Microbiol., 35:1477-91 (1997)); automatizovaný Q-beta replikázový amplifikační test (Burg, Mol. Cell. Probes, 10:257-71 (1996)); a další techniky zprostředkované RNA polymerázou (např. NASBA, Cingene, Mississauga, Ontario). Viz také Berger, Methods Enzymol., 152:307-16 (1987); Sambrook; Ausubel; U.S. patenty č. 4,683,195 a 4,683,202; Sookninan, Biotechnology, 13:563-64 (1995).

[00204] Jakmile jsou nukleové kyseliny amplifikovány, buď individuálně nebo jako knihovny, mohou být klonovány způsoby známými v oboru, je-li to žádoucí, na jakýkoli z mnoha vektorů za použití rutinních molekulárních biologických metod; metody klonování nukleových kyselin amplifikovaných in vitro jsou popsány např. v U.S. patentu č. 5,426,039. Pro usnadnění klonování amplifikovaných sekvencí mohou být do PCR primerového páru „zabudována“ restrikční enzymová místa. Například místa Pst I a Bsp EI byla konstruována do ukázkových primerových párů podle vynálezu. Tato konkrétní restrikční místa mají sekvenci, která když je ligována, tak jsou „in-frame“ vzhledem k „donorové“ kódující sekvenci 7-membránového receptoru, do níž jsou napojena (sekvence kódující oblast vázající ligand je vnitřní k 7-membránovému polypeptidu, a proto je-li žádoucí, aby byl konstrukt translatován po směru zapojovacího místa restrikčního enzymu, mělo by se zabránit výsledkům out of frame; to nemusí být nutné, pokud vložená oblast vázající ligand obsahuje podstatnou většinu transmembránové oblasti VII). Primery mohou být konstruovány tak, aby uchovaly původní sekvenci „donorového“ 7-membránového receptoru. Alternativně mohou primery kódovat aminokyselinové zbytky, které jsou konzervativními substitucemi (např. hydrofobní pro hydrofobní zbytky, viz diskuze výše) nebo funkčně benigní substituce (např. nezabraňují inserci plazmatické membrány, nezpůsobují štěpení peptidázou, nezpůsobují abnormální skládání receptoru apod.).

[00205] Primerové páry mohou být konstruovány tak, aby selektivně amplifikovaly oblasti proteinů T2R vázající ligand. Tyto vazební oblasti se mohou pro různé ligandy lišit; proto co může být minimální vazební oblast pro jeden ligand, to může být příliš omezující pro druhý potenciální ligand. Proto mohou být amplifikovány vazební oblasti o různých velikostech obsahující různé doménové struktury; například transmembránové domény II až VII, III až VII, III až VI nebo II až VI nebo jejich variace (např. pouze subsekvence konkrétní domény, pomíchání pořadí domén apod.) 7-transmembránového T2R.

[00206] Jelikož doménové struktury a sekvence mnoha 7-membránových T2R proteinů jsou známy, odborník v oboru snadno zvolí sekvence sousedící s doménou a vnitřní doménové sekvence jako modelové sekvence pro konstrukci degenerovaných amplifikačních primerových párů. Například sekvence nukleové kyseliny kódující doménové oblasti II až VII

mohou být generovány PCR amplifikací za použití primerového páru. Pro amplifikaci nukleové kyseliny obsahující sekvenci transmembránové domény I (TM I) může být zkonstruován degenerovaný primer z nukleové kyseliny, která kóduje aminokyselinovou sekvenci výše popsané konvenční sekvence 1 skupiny T2R. Takový degenerovaný primer se může použít pro generování vazebné oblasti začleňující TM I až TM III, TM I až TM IV, TM I až TM V, TM I až TM VI nebo TM I až TM VII. Další degenerované primery mohou být zkonstruovány na základě zde poskytnutých ostatních konvenčních sekvencí skupiny T2R. Takový degenerovaný primer se může použít pro generování vazebné oblasti začleňující TM III až TM IV, TM III až TM V, TM III až TM VI nebo TM III až TM VII.

[00207] Vzory konstrukce degenerovaných primerových párů jsou v oboru dobře známy. Například počítačový program strategie COnsensus-DEgenerate Hybrid Oligonucleotide Primer (CODEHOP) (konvenční degenerovaný hybridní oligonukleotidový primer) je dostupný na <http://blocks.fhcrc.org/codehop.html> a je přímo napojen z místa mnohonásobného sekvenčního alignment BlockMaker pro předpověď hybridních primerů počínaje sadou příbuzných proteinových sekvencí, jako známých oblastí chuťového receptoru vázajících ligand (viz např. Rose, *Nucleic Acids Res.*, 26:1628-35 (1998); Singh, *Biotechniques*, 24:318-19 (1998)).

[00208] Prostředky pro syntézu oligonukleotidových primerových párů jsou v oboru dobře známy. Lze použít páry „přírodních“ bází nebo páry syntetických bází. Například použití umělých nukleobází nabízí všestranný přístup k manipulaci s primerovou sekvencí a ke generování komplexnější směsi amplifikačních produktů. Různé skupiny umělých nukleobází jsou schopny pojmout mnoho orientací s vodíkovou vazbou prostřednictvím rotací vnitřních vazeb, aby se poskytly prostředky pro identifikaci degenerovaných molekul. Začlenění těchto analogů do jediné polohy PCR primeru umožňuje generování komplexní knihovny amplifikačních produktů. Viz např. Hoops, *Nucleic Acid Res.*, 25:4866-71 (1997). Nepolární molekuly mohou být rovněž použity, aby napodobovaly tvar přirozených DNA bází. Napodobenina tvaru adeninu, bez vodíkových vazeb, se může účinně a selektivně replikovat proti nepolární napodobenině tvaru thyminu (viz např. Morales, *Nat. Struct. Biol.*, 5:950-54 (1998)). Například dvěma degenerovanými bázemi mohou být pyrimidinová báze 6H, 8H-3,4-dihydropyrimido[4,5-c][1,2]oxazin-7-on nebo purinová báze N6-methoxy-2,6-diaminopurin (viz např. Hill, *PNAS*, 95:4258-63 (1998)). Ukázkové degenerované primery podle vynálezu začleňují analog nukleobáze 5'-Dimethoxytrityl-N-benzoyl-2'-deoxy-cytidin,3'-[(2-kyanoethyl)--(N,N-diisopropyl)]-fosforamidit („P“ v sekvencích – viz výše). Tento analog pyrimidinu tvoří vodíkové vazby s puriny, včetně A a G zbytků.

- [00209] Polymorfní varianty, alely a mezidruhové homology, které jsou značně identické se zde popsaným chuťovým receptorem, mohou být izolovány pomocí výše popsaných sond nukleových kyselin. Alternativně mohou být použity expresní knihovny pro klonování T2R polypeptidů a jejich polymorfních variant, alel a mezidruhových homologů, detekcí exprimovaných homologů imunologicky s antiséry nebo purifikovanými protilátkami proti T2R polypeptidu, které také rozpoznávají a selektivně se vážou na homolog T2R.
- [00210] Nukleové kyseliny, které kódují oblasti chuťových receptorů vázající ligand, mohou být generovány amplifikací (např. PCR) vhodných sekvencí nukleových kyselin za použití vhodných (dokonalých nebo degenerovaných) primerových párů. Amplifikovanou nukleovou kyselinou může být genomová DNA z jakékoli buňky nebo tkáně nebo mRNA nebo cDNA odvozená z buněk exprimujících chuťový receptor.
- [00211] V jednom provedení mohou být konstruovány hybridní sekvence kódující protein, obsahující nukleové kyseliny kódující T2R spojené s translokačními sekvencemi. Poskytnuty jsou i hybridní T2R obsahující translokační motivy a oblasti vázající sloučeninu vyvolávající chuť z jiných skupin chemosenzorických receptorů, zejména chuťových receptorů. Tyto sekvence nukleových kyselin mohou být funkčně spojeny s transkripčními nebo translačními řídicími prvky, např. transkripčními nebo translačními iniciačními sekvencemi, promotory a zesilovači, transkripčními a translačními terminátory, polyadenylačními sekvencemi a dalšími sekvencemi užitečnými pro transkripci DNA do RNA. Při konstrukci rekombinantních expresních kazet, vektorů a transgenických forem se může použít fragment promotoru pro řízení exprese požadované nukleové kyseliny ve všech požadovaných buňkách nebo tkáních.
- [00212] V dalším provedení mohou fúzní proteiny zahrnovat C-koncové nebo N-koncové translokační sekvence. Dále mohou fúzní proteiny obsahovat další prvky, např. pro detekci proteinu, purifikaci nebo další aplikace. Domény usnadňující detekci a purifikaci zahrnují např. peptidy tvořící cheláty s kovy, např. polyhistidinové oblasti, histidin-tryptofanové moduly nebo další domény, které umožňují purifikaci na imobilizovaných kovech; protein vázající maltózu, domény proteinu A umožňující purifikaci na imobilizovaném imunoglobulinu; nebo doménu používanou v extenzním/afinitním purifikačním systému FLAGS (Immunex Corp, Seattle Wash.).
- [00213] Inkluze sekvencí odštěpitelného linkeru, např. Factor Xa (viz např. Ottavi, *Biochimie*, 80:289-93 (1998)), subtilisin proteázového rozpoznávacího motivu (viz např. Polyak, *Protein Eng.*, 10:615-19 (1997)); enterokinázy (Invitrogen, San Diego, Calif.) apod. mezi translokační doménu (pro účinnou expresi plazmatické membrány) a zbytek nově translatovaného polypeptidu může být užitečná pro usnadnění purifikace. Jeden konstrukt

například může obsahovat polypeptid kódující sekvenci nukleové kyseliny napojený na šest histidinových zbytků, následovaný thioredoxinem, enterokinázovým štěpicím místem (viz např. Williams, *Biochemistry*, 34:1787-97 (1995)) a C-koncovou translokační doménou. Histidinové zbytky usnadňují detekci a purifikaci, zatímco enterokinázové štěpicí místo poskytuje prostředky pro purifikaci požadovaného proteinu(ů) od zbytku fúzního proteinu. Technologie týkající se vektorů kódujících fúzní proteiny a aplikace fúzních proteinů jsou dobře popsány v odborné a patentové literatuře (viz např. Kroll, *DNA Cell. Biol.*, 12:441-53 (1993)).

[00214] Expresní vektory, buď jako individuální expresní vektory nebo jako knihovny expresních vektorů, obsahující sekvence kódující oblast vázající ligand mohou být zavedeny do genomu nebo do cytoplazmy nebo do jádra buňky a exprimovány mnoha různými běžnými postupy, které jsou dobře popsány v odborné a patentové literatuře. Viz např. Roberts, *Nature*, 328:731 (1987); Berger viz výše; Schneider, *Protein Exper. Purif.*, 6435:10 (1995); Sambrook; Tijssen; Ausubel. Informace o produktu od výrobců biologických reakčních činidel a experimentální vybavení rovněž poskytují informace týkající se známých biologických metod. Vektory mohou být izolovány z přírodních zdrojů, získány z takových zdrojů jako jsou ATCC nebo knihovny genových bank nebo připraveny metodami syntézy nebo rekombinace.

[00215] Nukleové kyseliny mohou být exprimovány v expresních kazetách, vektorech nebo virech, které jsou stabilně nebo přechodně exprimovány v buňkách (např. epizomální expresní systémy). Selekcční markery mohou být začleněny do expresních kazet a vektorů, aby transformovaným buňkám a sekvencím dodaly volitelný genotyp. Selekcční markery mohou například kódovat epizomální udržení a replikaci tak, aby integrace do hostitelského genomu nebyla nutná. Marker může například kódovat odolnost vůči antibiotikům (např. chloramfenikol, kanamycin, G418, bleomycin, hygromycin) nebo odolnost vůči herbicidům (např. chlorsulfuron nebo Basta), aby se umožnil výběr těch buněk, které jsou transformovány s požadovanými DNA sekvencemi (viz např. Blondelet-Rouault, *Gene*, 190:315-17 (1997); Aubrecht, *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, 281:992-97 (1997)). Protože mohou být geny volitelných markerů dodávajících odolnost substrátům jako je neomycin nebo hygromycin používány pouze ve tkáňové kultuře, mohou být chemorezistentní geny rovněž použity jako volitelné markery in vitro a in vivo.

[00216] Sekvence chimérické nukleové kyseliny může kódovat oblast T2R vázající ligand v jakémkoli 7-transmembránovém polypeptidu. Protože polypeptidy 7-transmembránového receptoru mají podobné primární sekvence a sekundární a terciární struktury, mohou být

strukturní domény (např. mimobuněčná doména, TM domény, cytoplazmatická doména atd.) snadno identifikovány sekvenční analýzou. Například modelování homologie, Fourierova analýza a detekce periodicity helixu mohou identifikovat a charakterizovat sedm domén se sekvencí 7-transmembránového receptoru. Algoritmy rychlé Fourierovy transformace (FFT) se mohou použít pro vyhodnocení dominantních period, které charakterizují profily hydrofobicity a variability analyzovaných sekvencí. Zesílení detekce periodicity a index periodicity alfa-helixu lze provést např. pomocí Donnelly, *Protein Sci.*, 2:55-70 (1993). Další algoritmy pro alignment a modelování jsou v oboru dobře známy (viz např. Peitsch, *Receptors Channels*, 4:161-64 (1996); Kyte & Doolittle, *J. Md. Biol.*, 157:105-32 (1982); a Cronet, *Protein Eng.*, 6:59-64 (1993).

[00217] Vynález rovněž zahrnuje nejen molekuly nukleových kyselin a polypeptidů mající specifikované sekvence nukleových kyselin a aminokyselin, ale také jejich fragmenty, zejména fragmenty o např. 40, 60, 80, 100, 150, 200 nebo 250 nukleotidech, nebo více, jakož i polypeptidové fragmenty o např. 10, 20, 30, 50, 70, 100 150 aminokyselinách, nebo více. Případně mohou fragmenty nukleových kyselin kódovat antigenní polypeptid, který je schopen navázat se na protilátku vypěstovanou proti členu skupiny T2R. Dále může být fragment proteinu podle vynálezu případně antigenním fragmentem, který je schopen vázat se na protilátku vypěstovanou proti členu skupiny T2R.

[00218] Zamýšleny jsou i chimérické proteiny obsahující alespoň 10, 20, 30, 50, 70, 100 nebo 150 aminokyselin, nebo více, z alespoň jednoho ze zde popsanych polypeptidů T2R, navázané na další aminokyseliny představující celý nebo část dalšího GPCR, s výhodou členu 7-transmembránové nadskupiny. Tyto chiméry mohou být vytvořeny z okamžitých receptorů a dalšího GPCR nebo mohou být vytvořeny kombinací dvou nebo více přítomných receptorů. V jednom provedení jedna část chiméry odpovídá nebo je odvozena z transmembránové domény T2R polypeptidu podle vynálezu. V dalším provedení jedna část chiméry odpovídá nebo je odvozena z jedné nebo více transmembránových oblastí zde popsaného T2R polypeptidu a zbývající část nebo části mohou pocházet z jiného GPCR. Chimérické receptory jsou v oboru dobře známy a postupy jejich přípravy a výběr a hranice domén nebo fragmentů receptorů spojených s G-proteiny pro začlenění jsou rovněž dobře známy. Tato znalost odborníků může být tedy snadno využita pro tvorbu takových chimérických receptorů. Použití takových chimérických receptorů může poskytnout například chuťovou selektivitu charakteristickou pro jeden ze zde popsanych receptorů, spojenou s vlastnostmi signální transdukce jiného receptoru, jako je dobře známý receptor používaný v testovacích systémech dosavadního stavu techniky.

[00219] Například oblast jako je oblast vázající ligand, mimobuněčná doména, transmembránová doména, cytoplazmatická doména, N-koncová doména, C-koncová doména nebo jakákoli jejich kombinace může být kovalentně vázána na heterologní protein. Například transmembránová oblast T2R může být spojena s transmembránovou doménou heterologního GPCR nebo mimobuněčná doména heterologního GPCR může být spojena s transmembránovou oblastí T2R. Další vybrané heterologní proteiny mohou zahrnovat např. zelený fluorescenční protein, beta-galaktosidázové polypeptidy, glutamátový receptor a rhodopsinové polypeptidy, např. N-koncové fragmenty rhodopsinu, např. hovězího rhodopsinu.

[00220] V rozsahu vynálezu je i použití různých hostitelských buněk pro expresi T2R, fragmentů nebo variant podle vynálezu. Pro získání vysokých úrovní exprese klonovaného genu nebo nukleové kyseliny, např. cDNA kódující T2R, fragmenty nebo varianty podle vynálezu, se typicky sub-klonuje sekvence nukleové kyseliny, která nás zajímá, do expresního vektoru, který obsahuje silný promotor přímé transkripce, terminátor transkripce/translace, a pokud jde o nukleovou kyselinu kódující protein, vazební místo pro ribozom pro iniciaci translace. Vhodné bakteriální promotory jsou v oboru dobře známy a popsány, např. v Sambrook a kol. S výhodou se pro expresi předmětného receptoru hT2R použijí eukaryotické expresní systémy.

[00221] Lze použít jakýkoli z dobře známých postupů zavedení cizích nukleotidových sekvencí do hostitelských buněk. Ty zahrnují použití kalcium-fosfátové transfekce, polybren, fúze protoplastů, elektroporace, lipozomy, mikroinjekce, plazmatické vektory, virové vektory a jakýkoli z dalších dobře známých způsobů pro zavedení klonované genomové DNA, cDNA, syntetické DNA nebo dalšího cizího genetického materiálu do hostitelské buňky (viz např. Sambrook a kol.). Je pouze nutné, aby byl konkrétní postup genového inženýrství schopen úspěšně zavést alespoň jednu molekulu nukleové kyseliny do hostitelské buňky schopné exprimovat T2R, fragment nebo variantu, které nás zajímají.

[00222] Poté, co je expresní vektor zaveden do buněk, jsou transfekované buňky kultivovány za podmínek podporujících expresi receptoru, fragmentu nebo varianty, které nás zajímají a který je pak izolován z kultury za použití standardních technik. Příklady takových technik jsou v oboru dobře známy. Viz např. WO 00/06593, který je zde začleněn odkazem konzistentně s tímto popisem.

Testy detekce sloučenin, které moduluji aktivitu hT2R podle vynálezu

[00223] Způsoby a kompozice pro určení, zda se testovaná sloučenina specificky váže na polypeptid T2R podle vynálezu, jak in vitro, tak in vivo, jsou popsány níže. Pro vyhodnocení

účinku vázání ligandu na přirozeně se vyskytující nebo chimérické T2R lze monitorovat mnoho aspektů buněčné fyziologie. Tyto testy mohou být prováděny na intaktních buňkách exprimujících polypeptid T2R, na permeabilizovaných buňkách nebo na membránových frakcích vytvořených standardními způsoby.

[00224] Chuťové receptory vážou sloučeniny vyvolávající chuť a iniciují transdukcii chemického podnětu do elektrických signálů. Aktivovaný nebo inhibovaný G protein na oplátku změní vlastnosti cílových enzymů, kanálků a dalších efektorových proteinů. Některé příklady jsou aktivace cGMP fosfodiesterázy transdukcí ve zrakovém systému, adenylátcyklázy stimulačním G proteinem, fosfolipázy C pomocí Gq a dalších příbuzných G proteinů a modulace různých kanálků pomocí Gi a dalších G proteinů. Mohou být zkoumány i důsledky po směru exprese, např. generování diacylglycerolu a IP3 fosfolipázou C a na oplátku mobilizace vápníku pomocí IP3.

[00225] Předmětné hT2R proteiny nebo polypeptidy z testu se typicky zvolí z polypeptidu majícího sekvenci obsaženou v seznamu sekvencí, který je uveden před nároky, nebo jeho fragmenty nebo konzervativně modifikované varianty.

[00226] Alternativně mohou být T2R proteiny nebo polypeptidy z testu odvozeny z eukaryotické hostitelské buňky a mohou obsahovat aminokyselinovou sekvenci mající určité procento aminokyselinové sekvenční identity s těmito T2R polypeptidy nebo jejich konzervativně modifikovanými variantami. Obecně je aminokyselinová sekvenční identita alespoň 30%, s výhodou 30–40%, konkrétněji 50–60, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98% nebo 99%. Případně mohou T2R proteiny nebo polypeptidy z testů obsahovat oblast T2R polypeptidu, např. mimobuněčnou doménu, transmembránovou oblast, cytoplazmatickou doménu, doménu vázající ligand apod. Případně, jak je to doloženo příklady, může být T2R polypeptid nebo jeho část kovalentně vázána na heterologní protein pro tvorbu chimérického proteinu používaného ve zde popsaných testech.

[00227] Modulátory aktivity T2R mohou být testovány za použití T2R proteinů nebo polypeptidů, jak bylo popsáno výše, buď rekombinantních nebo přirozeně se vyskytujících. T2R proteiny nebo polypeptidy mohou být izolovány, exprimovány v buňce, exprimovány v membráně odvozené z buňky, exprimovány ve tkáni nebo ve zvířeti, buď rekombinantní nebo přirozeně se vyskytující. Mohou se použít např. plátky jazyka, disociované buňky z jazyka, transformované buňky nebo membrány. Modulace se může testovat za použití zde popsaných in vitro nebo in vivo testů.

Detekce modulátorů

[00228] Kompozice a způsoby určení, zda se testovaná sloučenina specificky váže na T2R receptor podle vynálezu, jak *in vitro*, tak *in vivo*, jsou popsány níže. Pro vyhodnocení účinku vázání ligandu na T2R polypeptid podle vynálezu může být monitorováno mnoho aspektů buněčné fyziologie. Tyto testy mohou být prováděny na intaktních buňkách exprimujících chemosenzorický receptor, na permeabilizovaných buňkách nebo na membránových frakcích vytvořených standardními způsoby nebo *in vitro* za použití znovu syntetizovaných proteinů.

[00229] *In vivo* se chuťové receptory vážou na sloučeniny modulující chuť a iniciují transdukcii chemických podnětů na elektrické signály. Aktivovaný nebo inhibovaný G protein na oplátku změní vlastnosti cílových enzymů, kanálků a dalších efektorových proteinů. Některé příklady jsou aktivace cGMP fosfodiesterázy transdukcí ve zrakovém systému, adenylátcyklázy stimulačním G proteinem, fosfolipázy C pomocí Gq a dalších příbuzných G proteinů a modulace různých kanálků pomocí Gi a dalších G proteinů. Mohou být zkoumány i důsledky po směru exprese, např. generování diacylglycerolu a IP3 fosfolipázou C a na oplátku mobilizace vápníku pomocí IP3.

[00230] Alternativně mohou být T2R proteiny nebo polypeptidy z testu odvozeny z eukaryotické hostitelské buňky a mohou obsahovat aminokyselinovou sekvenci mající aminokyselinovou sekvenci identitu se zde popsanými T2R polypeptidy nebo jejich fragmenty nebo jejich konzervativně modifikovanými variantami. Obecně je aminokyselinová sekvenci identita alespoň 35 až 50%, nebo případně 75%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98% nebo 99%. Případně mohou T2R proteiny nebo polypeptidy z testů obsahovat oblast T2R proteinu, např. mimobuněčnou doménu, transmembránovou oblast, transmembránovou doménu, cytoplazmatickou doménu, doménu vázající ligand apod. Dále, jak je zde popsáno, může být T2R polypeptid nebo jeho doména kovalentně vázána na heterologní protein pro tvorbu chimérického proteinu používaného ve zde popsaných testech.

[00231] Modulátory aktivity T2R se testují za použití T2R proteinů nebo polypeptidů, jak bylo popsáno výše, buď rekombinantních nebo přirozeně se vyskytujících. T2R proteiny nebo polypeptidy mohou být izolovány, exprimovány v buňce, exprimovány v membráně odvozené z buňky, exprimovány ve tkáni nebo ve zvířeti, buď rekombinantní nebo přirozeně se vyskytující. Mohou se použít např. plátky jazyka, disociované buňky z jazyka, transformované buňky nebo membrány. Modulace se může testovat za použití zde popsaných *in vitro* nebo *in vivo* testů.

In vitro vazebné testy

[00232] Transdukcce chuti může být také zkoumána *in vitro* reakcemi v rozpustném nebo pevném stavu, za použití T2R polypeptidů podle vynálezu. V jednom konkrétním provedení

mohou být domény T2R vázající ligand použity *in vitro* v reakcích v rozpustném nebo pevném stavu za účelem testování vázání ligandu.

[00233] Je možné, aby byla doména vázající ligand tvořena N-koncovou doménou spolu s dalšími částmi mimobuněčné domény, např. mimobuněčnými smyčkami transmembránové domény.

[00234] *In vitro* vazebné testy se použily s dalšími GPCR, např. s metabotropickými glutamátovými receptory (viz např. Han and Hampson, J. Biol. Chem. 274:10008-10013 (1999)). Tyto testy by mohly zahrnovat odstranění radioaktivně nebo fluorescenčně označeného ligandu, měření změn vlastní fluorescence nebo změn proteolytické susceptibility atd.

[00235] Vázání ligandu na T2R polypeptid podle vynálezu se může testovat v roztoku, ve dvouvrstvé membráně, případně připojené k pevné fázi, v lipidické monovrstvě nebo ve vezikulách. Vázání modulatoru se může testovat pomocí např. změn spektroskopických vlastností (např. fluorescence, absorbance, index lomu), hydrodynamických vlastností (např. tvar), chromatografických vlastností nebo změn rozpustnosti.

[00236] Ve výhodném provedení podle vynálezu se použije vazební test [³⁵S]GTPγS. Jak bylo popsáno výše, po aktivaci GPCR je podjednotka Ga komplexu G proteinu stimulována k tomu, aby vyměnila navázaný GDP za GTP. Stimulace výměnné aktivity G proteinu zprostředkovaná ligandem se může měřit biochemickým testem, kde se měří vázání přidaného radioaktivně značeného [³⁵S]GTPγS ke G proteinu v přítomnosti domnělého ligandu. Typicky se membrány obsahující chemosenzorický receptor, který nás zajímá, smíchají s G proteinem. K testu se přidají potenciální inhibitory a/nebo aktivátory [³⁵S]GTPγS a měří se vázání [³⁵S]GTPγS na G protein. Vázání lze měřit kapalinovým scintilačním počítáním nebo jakýmkoli jinými prostředky známými v oboru, včetně scintilačních proximitních testů (SPA). V jiných testech lze použít fluorescenčně označený [³⁵S]GTPγS.

Fluorescenční polarizační testy

[00237] V dalším provedení lze použít testy na bázi fluorescenční polarizace („FP“) pro detekci a monitorování vázání ligandů. Fluorescenční polarizace je všestranná laboratorní technika pro měření rovnovážného vázání, hybridizace nukleových kyselin a enzymatické aktivity. Fluorescenční polarizační testy jsou homogenní v tom, že nevyžadují krok separace, jako je např. centrifugace, filtrace, chromatografie, srážení nebo elektroforéza. Tyto testy se provádějí v opravdovém čase, přímo v roztoku a nevyžadují imobilizovanou fázi. Hodnoty polarizace lze měřit opakovaně a po přidání reakčních činidel, protože měření polarizace je rychlé a neničí vzorek. Obecně může být tato technika použita pro měření hodnot polarizace

fluoroforů od nízkých pikomolárních hodnot až na mikromolární hodnoty. Tato část popisuje, jak lze fluorescenční polarizaci využít jednoduchým a kvantitativním způsobem pro měření vázání ligandů na T2R polypeptidy podle vynálezu.

[00238] Když se fluorescenčně označená molekula excituje lineárně polarizovaným zářením, emituje záření, které má stupeň polarizace, který je nepřímo úměrný k její molekulární rotaci. Velké fluorescenčně označené molekuly během excitovaného stavu zůstávají poměrně stacionární (4 nanosekundy v případě fluoresceinu) a polarizace záření zůstává mezi excitací a emisí poměrně konstantní. Malé fluorescenčně označené molekuly se během excitovaného stavu rychle otáčejí a polarizace se významně mění mezi excitací a emisí. Proto mají malé molekuly nízké hodnoty polarizace a velké molekuly mají vysoké hodnoty polarizace. Například jednořetězcový fluoresceinem značený oligonukleotid má poměrně nízkou hodnotu polarizace, ale když se hybridizuje ke komplementárnímu řetězci, má vyšší hodnotu polarizace. Když se použije FP pro detekci a monitorování vázání sloučeniny vyvolávající chuť, která může aktivovat nebo inhibovat chemosenzorické receptory podle vynálezu, mohou se použít fluorescenčně značené sloučeniny vyvolávající chuť nebo autofluorescenční sloučeniny vyvolávající chuť.

[00239] Fluorescenční polarizace (P) je definována jako:

$$P = \frac{[Int_{par} - Int_{perp}]}{[Int_{par} + Int_{perp}]}$$

[00240] kde Int_{par} je intenzita emisního záření rovnoběžného s rovinou excitačního záření a Int_{perp} je intenzita emisního záření kolmého k rovině excitačního záření. Polarizace P je poměr intenzit záření, a proto je bezrozměrná. Například Beacon™ a Beacon 2000™. Systém lze použít ve spojení s těmito testy. takové systémy typicky vyjadřují polarizaci v milipolarizačních jednotkách (1 polarizační jednotka = 1000 mP jednotek).

[00241] Vztah mezi molekulovou rotací a velikostí je popsán Perrinovou rovnicí a čtenář je odkázán na Jolley, M. E. (1991) v Journal of Analytical Toxicology, strany 236-240, který je zde začleněn odkazem a který podává důkladné vysvětlení této rovnice. Ve stručnosti, Perrinova rovnice udává, že polarizace je přímo úměrná času rotačního odpočinku, času, který molekule zabere rotace o úhel přibližně 68,5 °C. Čas rotačního odpočinku se vztahuje k viskozitě (éta), absolutní teplotě (T), molekulovému objemu (V) a plynové konstantě (R) dle následující rovnice: $2(\text{čas rotačního odpočinku}) = 3 V RT$

[00242] Čas rotačního odpočinku je malý (~ nanosekunda) pro malé molekuly (např. fluorescein) a velký (~ 100 nanosekund) pro velké molekuly (např. imunoglobuliny).

Udrží-li se viskozita a teplota konstantní, pak čas rotačního odpočinku, a tím i polarizace, přímo souvisí s objemem molekuly. Změny molekulového objemu mohou být způsobeny interakcemi s dalšími molekulami, disociací, polymerací, degradací, hybridizací nebo konformačními změnami fluorescenčně značené molekuly. Například fluorescenční polarizace byla používána pro měření enzymatického štěpení velkých fluoresceinem značených polymerů proteázami, DNázami a RNázami. Byla také používána pro měření rovnovážného vázání pro interakce protein/protein, vázání protilátka/antigen a vázání protein/DNA.

Vysokopropustné testy v pevném stavu a rozpustné

[00243] V ještě dalším provedení vynález poskytuje rozpustné testy za použití T2R polypeptidu, nebo buňky nebo tkáň exprimující T2R polypeptid. V dalším provedení vynález poskytuje in vitro testy na bázi pevné fáze ve vysokopropustném formátu, kde T2R polypeptid, nebo buňka nebo tkáň exprimující T2R polypeptid, je připojen k substrátu nebo sloučenině stimulující chuť, která jsou v pevné fázi, a je uveden do styku s T2R receptorem a vázání se detekuje pomocí vhodné značky nebo protilátky vypěstované proti T2R receptoru.

[00244] Ve vysokopropustných testech podle vynálezu lze provést screening až několika tisíců různých modulátorů nebo ligandů za jediný den. Konkrétně může být každá jamka mikrotitrační destičky použita pro provádění jiného testu na vybraný potenciální modulátor nebo, pokud se mají pozorovat účinky na koncentraci nebo inkubační dobu, může se v každých 5-10 jamkách testovat jeden modulátor. Na jediné standardní mikrotitrační destičce se tedy může snadno testovat přibližně 100 (např. 96) modulátorů. Použije-li se 1536 jamek, pak se na jediné destičce může snadno testovat od přibližně 1000 do přibližně 1500 různých sloučenin. Také lze testovat více sloučenin v každé jamce destičky. Lze testovat několik různých destiček denně; při použití integrovaných systémů podle vynálezu je možné testování až přibližně 6.000-20.000 různých sloučenin. Nedávno byly vyvinuty mikrofluidní metody manipulace s reakčním činidlem.

[00245] Molekula, která nás zajímá, může být navázána na složku v pevné fázi, přímo nebo nepřímo, prostřednictvím kovalentní nebo nekovalentní vazby, např. pomocí značky (tag). Značkou může být jakákoli z mnoha různých komponent. Obecně je molekula, která váže značku (tag binder), fixována na pevném nosiči a označovaná molekula, která nás zajímá (např. molekula pro transdukcii chuti), je připojena k pevnému nosiči interakcí značky (tag) a molekuly, která váže značku (tag binder).

[00246] Lze použít mnoho značek a molekul, které vážou značku, na základě známých molekulárních interakcí, které jsou dobře popsány v literatuře. Například když má značka

přirozený spojovací prvek, například biotin, protein A nebo protein G, může být použita ve spojení s vhodnými molekulami, které vážou značku (avidin, streptavidin, neutravidin, Fc oblast imunoglobulinu atd.). Protilátky k molekulám s přirozenými spojovacími prvky jako je biotin jsou rovněž široce dostupné a vhodné jako tag binders (viz SIGMA Immunochemicals 1998 catalogue SIGMA, St. Louis Mo.).

[00247] Podobně může být jakákoli hapténová nebo antigenní sloučenina použita v kombinaci s vhodnou protilátkou pro tvorbu páru tag/tag binder. Tisíce specifických protilátek jsou komerčně dostupné a v literatuře je popsáno mnoho dalších protilátek. Například v jedné běžné konfiguraci je značka první protilátkou a tag binder je druhou protilátkou, která rozpoznává první protilátku. Kromě interakcí protilátka-antigen jsou jako páry tag a tag binder vhodné i interakce receptor-ligand. Například agonisté a antagonisté receptorů buněčné membrány (např. buněčné interakce receptor-ligand, např. transferrin, c-kit, virové receptorové ligandy, cytokinové receptory, chemokinové receptory, interleukinové receptory, imunoglobulinové receptory a protilátky, rod kadherinů, rod integrinů, rod selektinů apod.; viz např. Pigott & Power, *The Adhesion Molecule Facts Book I* (1993)). Podobně mohou s různými buněčnými receptory interagovat toxiny a venomy, virové epitopy, hormony (např. opiáty, steroidy atd.), vnitrobuněčné receptory (např. ty, které zprostředkovávají účinky různých malých ligandů, včetně steroidů, hormonů štítné žlázy, retinoidů a vitamínu D; peptidů), léčiva, lektiny, cukry, nukleové kyseliny (jak lineární, tak cyklické polymerní konfigurace), oligosacharidy, proteiny, fosfolipidy a protilátky.

[00248] Vhodnou značku (tag) nebo tag binder mohou tvořit i syntetické polymery, např. polyuretany, polyester, polykarbonáty, polymočoviny, polyamidy, polyethyleniminy, polyarylsulfidy, polysiloxany, polyamidy a polyacetáty. Mnoho párů tag/tag binder je rovněž užitečných ve zde popsaných testovacích systémech, jak bude pro odborníka po přečtení popisu zjevné.

[00249] Jako značky mohou sloužit i běžné linkery, např. peptidy, polyétery apod., které zahrnují polypeptidové sekvence, např. poly-gly-sekvence o přibližně 5 až 200 aminokyselinách. Takové flexibilní linkery jsou odborníkům v oboru známy. Například poly(ethylenglykolové) linkery jsou dostupné u firmy Shearwater Polymers, Inc. Huntsville, Ala. Tyto linkery mají případně amidové vazby, sulfhydrylové vazby nebo heterofunkční vazby.

[00250] Tag bindery jsou fixovány na pevné substráty pomocí jakéhokoli z mnoha různých v současnosti dostupných způsobů. Pevné substráty jsou běžně derivatizovány nebo na ně je zaváděna funkční skupina vystavením celého nebo části substrátu chemickému činidlu, které k povrchu fixuje chemickou skupinu, která reaguje s částí tag binderu. Například skupiny,

kteřé jsou vhodné pro napojení na dlouhou řetězcovou část, zahrnují aminy, hydroxylové, thiolové a karboxylové skupiny. Pro zavádění funkčních skupin na mnoho různých povrchů, např. na skleněné povrchy, lze použít aminoalkylsilany a hydroxyalkylsilany. Konstrukce takových testů biopolymerů v pevné fázi je v literatuře dobře popsána. Viz např. Merrifield, J. Am. Chem. Soc., 85:2149-2154 (1963) (popisující syntézu např. peptidů v pevné fázi); Geysen a kol., J. Immun. Meth., 102:259-274 (1987) (popisující syntézu komponent v pevné fázi na čepech); Frank & Doring, Tetrahedron, 44:60316040 (1988) (popisující syntézu různých peptidových sekvencí na celulózových kruhových destičkách); Fodor a kol., Science, 251:767-777 (1991); Sheldon a kol., Clinical Chemistry, 39(4):718-719 (1993); a Kozal a kol., Nature Medicine, 2(7):753759 (1996) (všechny popisují testy biopolymerů fixovaných na pevných substrátech). Nechemické metody fixování tag binderů k substrátům zahrnují další běžné metody, např. teplo, síťování UV zářením apod.

Buněčné testy

[00251] V jednom výhodném provedení je T2R protein exprimován v eukaryotické buňce buď v nemodifikovaných formách nebo jako chimérické, variantní nebo zkrácené receptory s nebo s výhodou bez heterologní chaperonové sekvence, která usnadňuje jeho maturaci a cílení sekreční cestou. Takové T2R polypeptidy mohou být exprimovány v jakékoli eukaryotické buňce, např. v HEK-293 buňkách. S výhodou buňky obsahují funkční G protein, např. Ga15, nebo chimérický Ga16, gustducin nebo transducin nebo chimérický G protein, např. G16gust44, který je schopen vázat chimérický receptor na vnitrobuněčnou signalizační cestu nebo na signalizační protein jako je fosfolipáza C. Aktivace receptorů T2R v takových buňkách se může detekovat pomocí jakéhokoli standardního způsobu, např. detekci změn vnitrobuněčného vápníku prostřednictvím detekce FURA-2-dependentní fluorescence v buňce. Takový test je základem experimentálních zjištění prezentovaných v této přihlášce.

[00252] Aktivované GPCR receptory jsou často substráty pro kinázy, které fosforylují C-koncový konec receptoru (a eventuálně i další místa). Aktivátory tedy podpoří přenos 32P z radioznačeného ATP na receptor, který může být testován scintilačním počítačem. Fosforylace C-koncového konce podpoří vázání proteinů podobných arrestinu a bude rušit vázání G proteinů. Pro obecný přehled transdukce signálu GPCR a způsobů testování transdukce signálu viz např. Methods in Enzymology, svazky 237 a 238 (1994) a svazek 96 (1983); Bourne a kol., Nature, 10:349:117-27 (1991); Bourne a kol., Nature, 348:125-32 (1990); Pitcher a kol., Annu. Rev. Biochem., 67:653-92 (1998).

[00253] Modulace T2R může být testována porovnáním odezvy T2R polypeptidů ošetřených domnělým modulátorem T2R s odezvou neošetřeného kontrolního vzorku nebo

vzorku obsahujícího známý „pozitivní“ kontrolní vzorek. Takové domnělé modulátory T2R mohou zahrnovat molekuly, které buď inhibují nebo aktivují aktivitu polypeptidu T2R. V jednom provedení je kontrolním vzorkům ošetřeným sloučeninou, která aktivuje T2R, přiřazena relativní aktivita T2R o velikosti 100. Inhibice polypeptidu T2R se dosáhne, je-li hodnota aktivity T2R vzhledem ke kontrolnímu vzorku přibližně 90 %, případně 50 %, případně 25-0 %. Aktivace polypeptidu T2R se dosáhne, je-li hodnota aktivity T2R vzhledem ke kontrolnímu vzorku přibližně 110 %, případně 150 %, 200-500 % nebo 1000-2000 %.

[00254] Změny iontového toku mohou být hodnoceny stanovením změn iontové polarizace (např. elektrického potenciálu) buňky nebo membrány exprimující polypeptid T2R. Jedním prostředkem stanovení změn buněčné polarizace je měření změn proudu (čímž se měří změny polarizace) pomocí technik napětového zámku nebo terčíkového zámku (viz např. technika „přilnutí k buňce“ („cell-attached“), technika „inside-out“ a technika snímání celé buňky („whole cell“), např. Ackerman a kol., *New Engl. J. Med.*, 336:1575-1595 (1997)). Proudů celých buněk jsou obvykle stanoveny za použití standardu. Další známé testy zahrnují: testy radioznačeného iontového toku a fluorescenční testy za použití barviv citlivých na napětí (viz např. Vestergaard-Bogind a kol., *J. Membrane Biol.*, 88:67-75 (1988); Gonzales & Tsien, *Chem. Biol.*, 4:269-277 (1997); Daniel a kol., *J. Pharmacol. Meth.*, 25:185-193 (1991); Holevinsky a kol., *J. Membrane Biology*, 137:59-70 (1994)).

[00255] Účinky testovaných sloučenin na funkci polypeptidů se mohou měřit zkoumáním kteréhokoli z výše uvedených parametrů. Jakákoli vhodná fyziologická změna, která ovlivňuje aktivitu GPCT, může být použita pro stanovení vlivu testované sloučeniny na polypeptidy podle vynálezu. Když se určí funkční následky za použití intaktních buněk nebo zvířat, lze rovněž změřit mnoho různých účinků, např. uvolňování přenašeče, uvolňování hormonů, transkripční změny jak známých, tak neidentifikovaných genetických markerů (např. hybridizace „northern blot“), změny buněčného metabolismu, např. růst buněk nebo změny pH, a změny vnitrobuněčných druhých posílů, např. Ca^{2+} , IP3, cGMP nebo cAMP.

[00256] Výhodné testy GPCR zahrnují buňky, naplněné barvivy citlivými na ionty nebo napětí pro záznam aktivity receptoru. Testy stanovení aktivity takových receptorů mohou rovněž využívat známé agonisty a antagonisty pro další receptory vázané na G-proteiny jako kontrolní vzorky pro stanovení aktivity testovaných sloučenin. V testech identifikace modulačních sloučenin (např. agonistů, antagonistů) se monitorují změny hladiny iontů v cytoplazmě nebo membránové napětí pomocí fluorescenčního indikátoru citlivého na ionty, respektive na membránové napětí. Mezi iontově citlivé indikátory a napětové sondy, které lze použít, patří ty, co jsou popsány v katalogu Molecular Probes 1997 Catalog. Pro receptory

vázané na G-proteiny lze ve vybraném testu použít promiskuitní G proteiny, např. Gα15 a Gα16 (Wilkie a kol., Proc. Nat'l Acad. Sci., 88:10049-10053 (1991)). Alternativně lze použít jiné G proteiny, např. gustducin, transducin a chimérické G proteiny, např. Gα16gust44 nebo Gα16t25.

[00257] Aktivace receptoru iniciuje následné vnitrobuněčné děje, např. nárůst druhých posílů. Aktivace některých receptorů vázaných na G-protein stimuluje tvorbu inositoltrifosfátu (IP3) prostřednictvím hydrolýzy fosfatidylinositolu zprostředkované fosfolipázou C (Berridge & Irvine, Nature, 312:315-21 (1984)). IP3 pak na oplátku stimuluje uvolňování zásob vnitrobuněčných vápenatých iontů. Změna hladin cytoplazmatických vápenatých iontů nebo změna hladin druhých posílů, např. IP3, tedy může být použita pro stanovení funkce receptoru vázaného na G protein. Buňky exprimující takové receptory vázané na G protein mohou vykazovat zvýšené hladiny cytoplazmatického vápníku v důsledku příspěvku jak uvolněného vápníku z vnitrobuněčných zásob, tak vstupu mimobuněčného vápníku iontovými kanálky plazmatické membrány.

[00258] Ve výhodném provedení se aktivita T2R polypeptidu měří expresí genu T2R v heterologní buňce s promiskuitním G proteinem, který váže receptor na cestu transdukce signálu fosfolipázy C (viz Offermanns & Simon, J. Biol. Chem., 270:15175-15180 (1995)). S výhodou je buněčnou linií HEK-293 (která normálně neexprimuje geny T2R) a promiskuitním proteinem je Gα15 (Offermanns & Simon, viz výše) nebo chimérický G protein, např. Gα16gust44. Modulace transdukce chuti se testuje měřením změn hladin vnitrobuněčného Ca²⁺, které se mění v odpověď na modulaci cesty transdukce signálu T2R prostřednictvím podání molekuly, která se spojuje s polypeptidem T2R. Změny hladin Ca²⁺ se případně měří pomocí fluorescenčních Ca²⁺ indikátorových barviv a fluorimetrického zobrazování.

[00259] V dalším provedení lze hydrolýzu fosfatidylinositolu (PI) analyzovat podle US patentu č. 5,436,128, který je zde začleněn odkazem. Ve stručnosti, test zahrnuje označování buněk 3H-myoinositolem po dobu 48 hodin nebo déle. Na označené buňky se působí testovanou sloučeninou po dobu 1 hodiny. Takto ošetřené buňky se lýžují a extrahují do chloroformu-methanolu-vody a poté se inositolfosfáty oddělí iontoměničovou chromatografií a kvantifikují se scintilačním počítáním. Násobná stimulace se určí výpočtem poměru cpm v přítomnosti agonisty k cpm v přítomnosti pufového kontrolního vzorku. Podobně se násobná inhibice určí výpočtem poměru v přítomnosti agonisty k cpm v přítomnosti pufového kontrolního vzorku (který může, ale nemusí obsahovat agonistu).

- [00260] Další testy receptorů mohou zahrnovat stanovení hladiny vnitrobuněčných cyklických nukleotidů, např. cAMP nebo cGMP. V případech, kdy má aktivace receptoru za následek snížení hladin cyklických nukleotidů, může být výhodné před přidáním sloučeniny aktivující receptor k buňkám testu vystavit buňky činidlům, které zvyšují hladiny vnitrobuněčných cyklických nukleotidů, např. forskolinu. V jednom provedení lze změny vnitrobuněčného cAMP nebo cGMP měřit pomocí imunologických testů. Pro stanovení hladiny cAMP lze použít způsob popsáný v Offermanns & Simon, *J. Bio. Chem.*, 270:15175-15180 (1995). Pro stanovení hladiny cGMP lze použít způsob popsáný v Felley-Bosco a kol., *Am. J. Resp. Cell and Mol. Biol.*, 11:159-164 (1994). Navíc je v US patentu č. 4,115,538, který je zde začleněn odkazem, popsána testovací souprava pro měření cAMP a/nebo cGMP.
- [00261] V dalším provedení lze měřit transkripční hladiny za účelem stanovení účinků testované sloučeniny na transdukcii signálu. Hostitelská buňka obsahující polypeptid T2R, který nás zajímá, se uvede do styku se sloučeninou po dostatečně dlouhou dobu, aby se provedly jakékoli interakce, a pak se měří hladina exprese genu. Množství času pro provedení takových interakcí lze empiricky stanovit, např. měřením hladiny transkripce v závislosti na čase. Množství transkripce lze měřit za použití jakéhokoli vhodného způsobu známého odborníkům v oboru. Např. expresi mRNA proteinu, který nás zajímá, lze detekovat za použití analýzy „northern blot“ nebo jejich polypeptidové produkty mohou být identifikovány za použití imunologických testů. Alternativně lze použít testy založené na transkripci, za použití reportérového genu, jak je popsáno v US patentu č. 5,436,128, který je zde začleněn odkazem. Reportérovými geny mohou být např. chloramfenikolacetyltransferáza, luciferáza, beta-galaktosidáza, beta-laktamáza a alkalická fosfatáza. Navíc protein, který nás zajímá, může být použit jako nepřímý reportér prostřednictvím připojení k druhému reportéru, např. zelenému fluorescenčnímu proteinu (viz např. Mistili & Spector, *Nature Biotechnology*, 15:961-964 (1997)).
- [00262] Množství transkripce se pak porovná s množstvím transkripce buď v téže buňce v nepřítomnosti testované sloučeniny, nebo se může porovnat s množstvím transkripce ve v podstatě identické buňce, v níž chybí polypeptid(y) T2R, které nás zajímají. Tato v podstatě identická buňka může být odvozena z týchž buněk, z nichž se připravila rekombinantní buňka, ale která nebyla modifikována zavedením heterologní DNA. Jakýkoli rozdíl v množství transkripce značí, že testovaná sloučenina nějakým způsobem změnila aktivitu polypeptidu T2R, který nás zajímá.

Transgenní živočichové, nikoli lidé, kteří exprimují chemosenzorické receptory

- [00263] Pro receptorové testy lze rovněž využít živočichy, vyjma lidí, exprimující jednu nebo více sekvencí chuťového receptoru podle vynálezu. Taková exprese se může použít ke stanovení, zda se testovaná sloučenina specificky váže na savčí chuťový transmembránový receptorový komplex in vivo, a to tak, že se živočich, ne člověk, stabilně nebo přechodně transfektovaný nukleovými kyselinami kódujícími chemosenzorické receptory nebo jejich oblasti vázající ligandy uvede do styku s testovanou sloučeninou a určí se, zda živočich reaguje na testovanou sloučeninu specifickým vázáním na receptorový polypeptidový komplex.
- [00264] Živočichové transfektovaní nebo infikovaní vektory podle vynálezu jsou obzvláště užiteční pro testy k identifikaci a charakterizaci chuťových podnětů, které se mohou vázat na specifický receptor nebo na sady receptorů. Takoví vektorem infikovaní živočichové exprimující sekvence lidského chuťového receptoru se mohou použít pro in vivo screening chuťových podnětů a jejich účinku na např. buněčnou fyziologii (např. na chuťové neurony), na CNS nebo na chování.
- [00265] Prostředky infekce/exprese nukleových kyselin a vektorů jsou v oboru známy buď individuálně nebo jako knihovny. Mnoha různými prostředky lze měřit mnoho různých individuálních parametrů buňky, orgánu nebo celého živočicha. Sekvence T2R podle vynálezu mohou být například exprimovány ve zvířecích chuťových tkáních dodáním infikujícího činidla, např. adenovirového expresního vektoru.
- [00266] Endogenní geny chuťového receptoru mohou zůstat funkční a aktivita divokého typu (nativní) může být nadále přítomna. V jiných situacích, kde je žádoucí, aby byla veškerá aktivita chuťového receptoru díky zavedenému exogennímu hybridnímu receptoru, je výhodné použít knock-outovou linii. Způsoby konstrukce transgenních živočichů, ne lidí, zejména transgenních myší, a výběr a příprava rekombinantních konstruktů pro generování transformovaných buněk jsou v oboru dobře známy.
- [00267] Konstrukce „knock-outové“ buňky a živočicha je založena na předpokladu, že hladina exprese konkrétního genu v savčí buňce může být snížena nebo zcela zrušena tím, že se do genomu zavede nová sekvence DNA, která slouží k přerušení nějaké části DNA sekvence genu, který má být potlačen. Pro přerušení hostitelského genu lze rovněž použít tzv. „vlození genové pasti“ („gene trap insertion“) a myší embryonální kmenové (ES) buňky se mohou použít pro produkci knock-outovaných transgenních živočichů (viz např. Holzschu, Transgenic Res 6:97-106 (1997)). Vložení exogenní sekvence se typicky provede homologní rekombinací mezi komplementárními sekvencemi nukleových kyselin. Exogenní sekvencí je

nějaká část cílového genu, který má být modifikován, např. exonové, intronové nebo transkripční regulační sekvence, nebo jakákoli genomová sekvence, která je schopna ovlivnit hladinu exprese cílového genu; nebo jejich kombinace. Genové cílení prostřednictvím homologní rekombinace v pluripotentních embryonálních kmenových buňkách umožňuje přesně modifikovat genomové sekvence, které nás zajímají. Pro tvorbu, vyhledávání, propagaci knock-outového živočicha lze použít jakoukoli techniku, viz např. Bijvoet, Hum. Mol. Genet. 7:53-62 (1998); Moreadith, J. Mol. Med. 75:208-216 (1997); Tojo, Cytotechnology 19:161-165 (1995); Mudgett, Methods Mol. Biol. 48:167-184 (1995); Longo, Transgenic Res. 6:321-328 (1997); U.S. patenty č. 5,616,491; 5,464,764; 5,631,153; 5,487,992; 5,627,059; 5,272,071; WO 91/09955; WO 93/09222; WO 96/29411; WO 95/31560; WO 91/12650.

[00268] Nukleové kyseliny podle vynálezu mohou být rovněž použity jako reakční činidla pro produkci „knock-outových“ lidských buněk a jejich potomstvo. Obdobně mohou být nukleové kyseliny podle vynálezu také použity jako reakční činidla pro produkci „knock-inů“ u myši. Lidské nebo krysí sekvence genu T2R mohou nahradit ortologní T2R v myším genomu. Takto se vytvoří myš exprimující lidský nebo krysí T2R. Tato myš pak může být použita k analýze funkce lidských nebo krysích T2R a k identifikaci ligandů pro takové T2R.

Modulátory

[00269] Sloučeninami testovanými jako modulátory ze členů skupiny T2R mohou být jakékoli malé chemické sloučeniny nebo biologické entity, např. protein, cukr, nukleová kyselina nebo lipid. Alternativně mohou být modulátory geneticky změněné verze člena skupiny T2R. Typicky mohou být testovanými sloučeninami malé chemické molekuly a peptidy. V testech podle vynálezu může být použita v zásadě jakákoli chemická sloučenina jako potenciální modulátor nebo ligand, ačkoli nejčastěji používanými sloučeninami jsou ty, které lze rozpustit ve vodném nebo organickém (zejména na bázi DMSO) rozpouštědle. Testy mohou být navrženy ke screeningu mnoha chemických knihoven automatizací kroků testu a poskytnutím sloučenin z jakéhokoli vhodného zdroje do testů, které jsou typicky prováděny paralelně (např. mikrotitrační formáty na mikrotitračních destičkách v robotických testech). Ocení se, že existuje mnoho dodavatelů chemických sloučenin, včetně společností Sigma (St. Louis, Mo.), Aldrich (St. Louis, Mo.), Sigma-Aldrich (St. Louis, Mo.), Fluka Chemika-Biochemica Analytika (Buchs, Švýcarsko) apod.

[00270] V jednom provedení zahrnují vysokopropustné screeningové metody poskytnutí kombinatorické chemické nebo peptidové knihovny obsahující velké množství potenciálních terapeutických sloučenin (potenciálních modulátorových nebo ligandových sloučenin).

Takové „kombinatorické chemické knihovny“ nebo „ligandové knihovny“ se pak prohlédávají v jednom nebo více zde popsaných testech, aby se identifikovali ti členové knihovny (zejména chemické druhy nebo podtřídy), které vykazují požadovanou charakteristickou aktivitu. Takto identifikované sloučeniny mohou sloužit jako konvenční „vedoucí sloučeniny“ nebo mohou být samy použity jako potenciální nebo aktuální spotřebitelské produkty.

[00271] Kombinatorická chemická knihovna je sbírka rozmanitých chemických sloučenin generovaných buď chemickou syntézou nebo biologickou syntézou, spojením mnoha chemických „stavebních bloků“, například reakčních činidel. Například lineární kombinatorická chemická knihovna, jako je polypeptidová knihovna, se vytvoří spojením sady chemických stavebních bloků (aminokyselin) jakýmkoli možným způsobem pro danou délku sloučeniny (tj. počet aminokyselin v polypeptidové sloučenině). Takovým kombinatorickým mícháním chemických stavebních bloků lze syntetizovat miliony chemických sloučenin.

[00272] Příprava a screening kombinatorických chemických knihoven je odborníkům v oboru dobře známa. Takové kombinatorické chemické knihovny zahrnují, ale nejsou omezeny na, peptidové knihovny (viz např. U.S. patent č. 5,010,175, Furka, Int. J. Pept. Prot. Res., 37:487-93 (1991) a Houghton a kol., Nature, 354:84-88 (1991)). Lze použít i jiné chemické procesy pro generování chemických výběrových knihoven. Takové chemické procesy zahrnují, ale nejsou omezeny na: peptoidy (např. WO 91/19735), kódované peptidy (např. WO 93/20242), náhodné bio-oligomery (např. WO 92/00091), benzodiazepiny (např. U.S. patent č. 5,288,514), diverzomery, např. hydantoiny, benzodiazepiny a dipeptidy (Hobbs a kol., PNAS., 90:6909-13 (1993)), vinylogní polypeptidy (Hagihara a kol., J. Amer. Chem. Soc., 114:6568 (1992)), nepeptidické peptidomimetiky s glukózovým scaffoldem (Hirschmann a kol., J. Amer. Chem. Soc., 114:9217-18 (1992)), analogické organické syntézy knihoven malých sloučenin (Chen a kol., J. Amer. Chem. Soc., 116:2661 (1994)), oligokarbamáty (Cho a kol., Science, 261:1303 (1993)), peptidické fosfonáty (Campbell a kol., J. Org. Chem., 59:658 (1994)), knihovny nukleových kyselin (Ausubel, Berger a Sambrook, vše viz výše), knihovny peptidů a nukleových kyselin (U.S. patent č. 5,539,083), knihovny protilátek (Vaughn a kol., Nature Biotechnology, 14(3):309-14 (1996) a PCT/US96/10287), sacharidové knihovny (Liang a kol., Science, 274:1520-22 (1996) a U.S. patent č. 5,593,853), knihovny malých organických molekul (benzodiazepiny, Baum, C&EN, Jan 18, str. 33 (1993); thiazolidinony a metathiazanony, U.S. patent č. 5,549,974; pyrrolidiny,

U.S. patent č. 5,525,735 a 5,519,134; morfolinové sloučeniny, U.S. patent č. 5,506,337; benzodiazepiny, 5,288,514 apod.).

[00273] Zařízení pro přípravu kombinatorických knihoven jsou komerčně dostupná (viz např. 357 MPS, 390 MPS (Advanced Chem Tech, Louisville Ky.), Symphony (Rainin, Woburn, Mass.), 433A (Applied Biosystems, Foster City, Calif.), 9050 Plus (Millipore, Bedford, Mass.)). Navíc je mnoho samotných kombinatorických knihoven komerčně dostupných (viz např. ComGenex, Princeton, N.J.; Tripos, Inc., St. Louis, Mo.; 3D Pharmaceuticals, Exton, Pa.; Martek Biosciences; Columbia, Md.; atd.).

[00274] V jednom aspektu vynálezu mohou být modulátory T2R použity v jakémkoli potravinovém produktu, cukrovinkách, farmaceutické kompozici nebo jejich ingredienci, čímž se požadovaným způsobem moduluje chuť produktu, kompozice nebo ingredience. Například modulátory T2R, které zesilují pocit hořké chuti, mohou být přidány za účelem poskytnutí hořké chuti produktu nebo kompozice, zatímco modulátory T2R, které blokují pocity hořké chuti, se mohou přidat za účelem blokace hořké chuti produktu nebo kompozice. Vynález také poskytuje prostředky pro identifikaci hořkých sloučenin, které se nacházejí v potravinách, nápojích, kosmetice a léčivech, a prostředky pro tvorbu chuťově vylepšených potravin, nápojů a léčiv, které tyto hořké sloučeniny nemají nebo je mají ve sníženém množství.

Použití sloučenin identifikovaných podle vynálezu

[00275] Sloučeniny identifikované podle vynálezu se mohou přidat do potravin, nápojů, kosmetiky nebo léčebných kompozic pro modulaci, s výhodou blokování hořké chuti spouštěné aktivací alespoň jednoho z hT2R8 a/nebo hT2R14 hořkými sloučeninami přítomnými v kávě a příbuzných potravinách, nápojích a léčivech nebo strukturně příbuznými sloučeninami nebo dalšími hořkými sloučeninami, např. sloučeninami nacházejícími se v potravinách a nápojích nebo léčivech nebo kosmetice, které vyvolávají vjem hořké chuti.

[00276] Konkrétně sloučenina C, a její analogy, může být na základě svých široce působících antagonistických vlastností použita jako aditivum do potravin, nápojů, léčiv nebo materiálu pro požití lidmi nebo zvířaty, přičemž je vhodně zeslabena hořká chuť. Vzhledem k vlastnostem sloučeniny C mohou tyto materiály obsahovat hořké ligandy, o nichž je známo, že interagují se specifickými receptory hořkosti jako jsou hT2R3, 7, 10, 14, 16, 44, 51, 55, 61, 63, 64, 65 nebo 71 a/nebo s hT2R5, 9, 13, 54, 67 a 75, nebo jejich kombinací, nebo obsahují hořké sloučeniny, pro něž není určena selektivita jejich receptoru hořkosti. Obzvláště výhodnými aplikacemi jsou kompozice obsahující sloučeniny, které aktivují násobné receptory hořkosti.

[00277] Navíc mohou být předmětné sloučeniny včetně sloučeniny C použity v kompetitivních vazebných a funkčních testech, jakož i v chuťových testech za účelem identifikace hořkých sloučenin, jimž sloučenina C blokuje nebo inhibuje hořkou chuť.

[00278] Jak bylo uvedeno dříve, vlastnosti modulující chuť, s výhodou vlastnosti blokující hořkou chuť sloučenin identifikovaných v předmětných buněčných testech T2R se potvrdí v lidských nebo zvířecích chuťových testech, s výhodou v lidských chuťových testech.

Soupravy

[00279] Geny T2R a jejich homology jsou užitečnými nástroji pro identifikaci buněk chuťových receptorů, pro soudní analýzu a určování otcovství a pro zkoumání transdukce chuti. Reakční činidla specifická pro členy skupiny T2R, která specificky hybridizují na nukleové kyseliny T2R, např. T2R sondy a primery, a reakční činidla specifická pro T2R, která se specificky vážou na protein T2R, např. protilátky T2R, se používají pro zkoumání buněčné exprese chuti a řízení transdukce chuti.

[00280] Testy nukleových kyselin na přítomnost DNA a RNA u člena skupiny T2R ve vzorku zahrnují mnoho technik, které jsou odborníkovi v oboru známy, např. analýza southern blot, northern blot, analýza dot blot, RNázová ochrana, analýza S1, amplifikační techniky jako je PCR, a in situ hybridizace. Například při in situ hybridizaci je cílová nukleová kyselina uvolněna ze svého buněčného okolí tak, aby byla dostupná pro hybridizaci v buňce, zatímco se uchová buněčná morfologie pro následnou interpretaci a analýzu. Následující články poskytují přehled oboru in situ hybridizace: Singer a kol., *Biotechniques*, 4:230250 (1986); Haase a kol., *Methods in Virology*, sv. VII, 189-226 (1984); a Names a kol., eds., *Nucleic Acid Hybridization: A Practical Approach* (1987). Navíc může být protein T2R detekován různými imunologickými testy popsány výše. Testovací vzorek se obvykle porovná jak s pozitivním kontrolním vzorkem (např. vzorkem exprimující rekombinantní T2R protein), tak s negativním vzorkem.

[00281] Vynález rovněž poskytuje soupravy pro screening modulátorů členů skupiny T2R. Takové soupravy lze připravit ze snadno dostupných materiálů a reakčních činidel. Takové soupravy mohou například obsahovat kterýkoli nebo více z následujících materiálů: T2R nukleové kyseliny nebo proteiny, reakční zkušavky a návod pro testování aktivity T2R. Souprava případně obsahuje funkční T2R polypeptid. Lze připravit velké množství různých souprav a komponent podle vynálezu, v závislosti na zamýšleném uživateli soupravy a konkrétních potřebách uživatele.

[00282] Když byl nyní obecně popsán vynález, bude snáze pochopen s odkazem na následující příklady, které slouží pro ilustraci a nejsou určeny pro omezení rozsahu vynálezu.

Rozumí se, že lze vytvořit různé modifikace a změny zde popsanych ukázkových provedení, aniž bychom se odchýlili od ducha a rozsahu vynálezu.

PŘÍKLADY

Příklad 1

hT2R8 a hT2R14 jsou aktivovány hořkou kávovou frakcí

[00283] K provedení screeningu 25 lidských T2R v přechodně transfektovaných HEK buňkách se použila částečně přečištěná hořká kávová frakce, jak bylo popsáno v předchozích patentových přihláškách. Stručně (jak již bylo podrobněji probráno ve zveřejněném US patentu č. 2003/0170608, který je zde zahrnut tímto odkazem), lidské embryonální buňky ledvin, které stabilně exprimují velký antigen T-buněk a G15 protein (HEK-G15), se přechodně transfektovaly s hT2R expresním plazmidem (např. použitím Ca^{2+} fosfátu nebo použitím systémů na bázi lipidu). Dále, jiné HEK-G15 buněčné linie se přechodně transfektovaly jinými lidskými T2R. Pro detekci změn koncentrace vápníku v přechodně transfektovaných buňkách se poté provedl fluorescenční test. Interakce testované sloučeniny(nin) s transfektovanými buňkami vyvolávají signalizační kaskádu, která vede k aktivaci PLC a následnému zvýšení vnitrobuněčné koncentrace vápníku, což vede ke zvýšení fluorescence, která se detekuje použitím fluorescenčního barviva citlivého na vápník. Tyto změny se monitorují např. použitím fluorescenčního mikroskopického a vhodně navrženého softwaru (jako je Imaging Workstation, Axon).

[00284] Kávová frakce vykazuje vysokou míru fluorescence, což interferuje s testem. Aby se zabránilo interferenci, u řady modrých barviv se testovala schopnost blokovat fluorescenci z kávové frakce. Jak je ukázáno na Obr. 1, kávová frakce aktivovala hT2R8 a hT2R14 v zobrazovacím testu vápníku použitím přechodně transfektovaných buněk. Modré barvivo použité v pokusu z Obr. 1 je FD&C 1 při 1,9 mM. Také se jeví, že několik jiných hT2R se aktivuje touto kávovou frakcí. Různé kombinace hT2R se aktivují (Tabulka 1) s různými modrými barvivy. Nicméně, hT2R8 a hT2R14 jsou konzistentně vybrány jako citlivé na kávovou frakci a aktivity těchto dvou receptorů jsou závislé na dávce kávové frakce (Obr. 2). Modrým barvivem, které se použije v pokusu z Obr. 2, je tryptanová modř.

Tabulka 1 hT2R aktivované kávovou frakcí s různými modrými barvivy

Modré barvivo	Identifikované hT2R receptory	
	aktivace	týdenní aktivace
FD&C 1	8, 14	---
Trypan	1, 8, 14	10, 75
Coomassie	14	---

[00285] Použitím tohoto testu bylo zjištěno, že přidavek hořké kávové frakce k buňkám, které exprimují hT2R8 a hT2R14, aktivuje vnitrobuněčné G proteiny. Naproti tomu při použití stejného testu hořká kávová frakce specificky neaktivovala HEK-G15 buňky, které byly přechodně transfektovány jinými hT2R. Tento pokus podporuje závěr, že chuťové receptory hT2R8 a hT2R14 jsou specificky citlivé na hořkou sloučeninu(ny) přítomnou v kávě.

Příklad 2

Identifikace antagonistů hT2R8 a hT2R14

[00286] K identifikaci antagonistů se vygenerovaly buněčné linie, které stabilně exprimovaly hT2R8 a hT2R14, podle pořadí, spolu s promiskuitním chimérickým G16g44 proteinem, jak je popsáno v předešlých přihláškách vynálezu. Vysokopropustný test (HT) byl ustanoven použitím stabilních buněčných linií a FLIPR (čtečky destiček zobrazující fluorescenci). K aktivaci receptorů až do výše 70-80 % jejich příslušné maximální aktivity se použil agonista hT2R8 nebo hT2R14. Pro hT2R8 je použitým agonistou andrografolid (200 μ M); pro hT2R14 je to kyselina aristolochová (3 μ M). K identifikaci antagonistů se přidaly sloučeniny s různorodými chemickými strukturami společně s agonistou. Sloučeniny, které zapříčinily statisticky významné snížení aktivity receptoru, se spojily a znovu se ověřily inhibičními křivkami v závislosti na dávce. Sloučenina A a sloučenina B se identifikovaly jako hT2R8 antagonisté (Obr. 3). Sloučenina C je identifikována jako hT2R14 antagonist (Obr. 4).

Příklad 2a**Kombinace hT2R8 a hT2R14 antagonistů snižujících hořkou chuť kávy**

[00287] Provedly se chuťové testy s kombinacemi hT2R8 a hT2R14 antagonistů v kávové frakci a ve dvou typech instantní kávy (středně pražené a středně-tmavě pražené) za použití metody 2-alternativní rychlé volby s 4 - 5 odborníky na chuť. Vzorky kávy s antagonisty se daly odborníkům na chuť spolu se vzorky bez antagonistů, odborníci byli požádáni, aby identifikovali hořčejší vzorek v páru. Jak je ukázáno v Tabulce 2, odborníci konzistentně identifikovali vzorky kávových frakcí bez antagonistů jako více hořké, než ty s antagonisty, což naznačuje, že antagonisté snižují hořkou chuť kávové frakce. Stejně tak, jak je ukázáno v Tabulce 3, antagonisté snižují hořkou chuť u obou typů instantní kávy.

[00288] Jak ukázaly chuťové testy tohoto příkladu, vnímání hořkosti v kompozicích (např. potravinách, nápojích a/nebo lécích), jež vykazují hořkou chuť, může být snížena nebo eliminována včleněním antagonistů hT2R8 a/nebo hT2R14 do takovýchto kompozic.

[00289] Ke stanovení podílu jednotlivého antagonisty se provedly chuťové testy se středně praženou kávou se sloučeninou C. Jak je ukázáno v Tabulce 4, hT2R14 antagonist (sloučenina C) dostatečně sám o sobě snižuje hořkou chuť kávy z tohoto Příkladu.

Tabulka 2 Výsledky chuťových testů s kávovou frakcí a 2 různé kombinace antagonistů

Test	Antagonista		Koncentrace (μ M)	vybrán jako hořčejší		P hodnota
	hT2R8	hT2R14		bez antagonisty	s antagonistou	
1	slouč. A	slouč. C	30	32	0	<0,001
2	slouč. B	slouč. C	30	15	1	0,001
3	slouč. A	slouč. C	10	16	0	<0,001

Tabulka 3 Výsledky chuťových testů se dvěma typy instantní kávy

Instantní káva	Antagonisté		Koncentrace (μM)	vybrán jako hořejší		P hodnota
	hT2R8	hT2R14		bez antagonistů	s antagonistou	
střední	slouč. A	slouč. C	30	16	0	<0,001
středně-tmavá	slouč. A	slouč. C	30	13	3	0,021

Tabulka 4 Výsledky chuťových testů se středně praženou kávou a jednotlivým antagonistou

Chuťový test	Antagonista	Koncentrace (μM)	vybrán jako hořejší		P hodnota
			bez antagonisty	s antagonistou	
1	sloučenina C	50	18	2	<0,001
2	sloučenina C	25	19	1	<0,001

Příklad 3

Sloučenina C je všestranně aktivujícím antagonistou receptoru hořkosti

[00290] Příklad 2 výše ukazuje, že sloučenina C je lidským T2R antagonistou identifikovaný pomocí vysokopropustných screeningových testů za použití hT2R14. Další pokusy odhalují, že sloučenina C je všestranně laděným antagonistou pro 13 lidských T2R a v menším rozsahu antagonizuje šest jiných lidských T2R. Navíc, v chuťových testech tato sloučenina blokuje intenzitu hořké chuti vyvolanou řadou různorodých hořkých látek.

[00291] Specificky, aby se vyhodnotila inhibiční selektivita sloučeniny C, testovala se tato sloučenina proti 22 lidským T2R, které pomocí Senomyxu přestaly být tzv. "orphan" proteiny. Tyto receptory a hořké ligandy, které aktivují tyto lidské T2R, jsou uvedeny v dřívějších přihláškách vynálezu, které jsou zde zahrnuty tímto odkazem. Těmito 22 lidskými T2R jsou hT2R1, 3, 4, 5, 7, 8, 9, 10, 13, 14, 16, 44, 51, 54, 55, 61, 63, 64, 65, 67, 71 a 75. Sekvence aminokyselin a nukleových kyselin všech těchto T2R mohou být nalezeny v těchto dřívějších přihláškách vynálezu. Tyto lidské T2R se každý jednotlivě přechodně transfektovaly do HEK293 buněk, které stabilně exprimovaly promiskuitní G protein G16g44

a provedly se funkční testy za použití těchto receptorů, jak se uvádí v těch stejných přihláškách vynálezu. V těchto pokusech se každý receptor aktivuje jedním z jeho ligandů vybraných z hořkých molekul, u kterých se dříve ukázalo, že aktivují určitý T2R. Tyto ligandy se použily v EC80 stupních koncentrace. Seznam použitých hořkých ligandů a koncentrace testovaných ligandů jsou obsaženy v Tabulce 5 tohoto příkladu.

[00292] Dále, aby se potvrdila *in vitro* aktivita této sloučeniny v testu receptoru, vynálezci provedli párové srovnání chuťového testu, aby se stanovil účinek sloučeniny *in vivo*. Odborníci na chuť byli požádáni, aby ochutnali hořké látky s a bez sloučeniny C a aby identifikovali, který ze vzorků chutná hořčeji. Testovala se řada párů každým odborníkem, aby se zvýšil počet vzorků a tyto výsledky se analyzovaly za použití příslušných statistických metod. Pořadí vzorků s nebo bez sloučeniny C se randomizovalo a vzájemně vyvážilo.

[00293] Aby se stanovily široké antagonistické vlastnosti této sloučeniny, testovala se její schopnost blokovat hořkou chuť vyvolanou rozmanitými hořkými ligandy, jakož i hořkou chuť vyvolanou hořkými ligandy, u kterých je známo, že aktivují rozmanité receptory hořké chuti, a hořkými ligandy, u kterých ještě nebylo dokázáno, že aktivují specifický hT2R. Několik hořkých molekul, o nichž je známo, že aktivují receptory hořkosti, se testovalo, která aktivace je inhibována sloučeninou C. Konkrétně, salicin je hořkou molekulou, která aktivuje hT2R16, a výsledky chuťových testů ukázaly, že sloučenina C při 40 μ M může snižovat její hořkou chuť. Fenylothiomočovina je hořkou molekulou, jež aktivuje hT2R51, a sloučenina C snižuje její hořkou chuť při 25 μ M.

[00294] Několik hořkých molekul, které mohou aktivovat rozmanité T2R, se testovaly se sloučeninou C. Aktivace receptorů hořkosti pro některé z těchto molekul byly částečně inhibovány sloučeninou C. Omeprazol je hořkou molekulou, která aktivuje hT2R10, 14 a 75. Třebaže jeho hořká chuť může zapojit násobné receptory hořkosti, jeho hořká chuť je také znatelně snížena sloučeninou C. Rebaudiosid A je přírodním sladidlem se silnou hořkou chutí, jež aktivuje alespoň 7 lidských T2R. Jeho hořká chuť je také snížena sloučeninou C.

[00295] Dále sloučenina C inhibuje hořkou chuť pro některé sloučeniny, kde receptor(y), se kterým interagují, je neznámý, například dextromethorfan a difenhydramin. Testoval se účinek sloučeniny C na tyto sloučeniny a zjistilo se, že se také snížila hořká chuť.

[00296] Ve vztahu k výše uvedenému, Obr. 5 obsahuje výsledky pokusů, kde se sloučenina C testovala s různými sloučeninami agonistů. Inhibiční aktivita je prezentována redukcí

aktivity receptoru v přítomnosti sloučeniny C. Obr. 5 ukazuje, že 13 různých hT2R bylo významně (více než 30 %) inhibováno sloučeninou C. Těchto 13 hT2R je hT2R3, 7, 10, 14, 16, 44, 51, 55, 61, 63, 64, 65 a 71. Šest jiných receptorů, včetně hT2R5, 9, 13, 54, 67 a 75, se také inhibovalo, třebaže v menším rozsahu.

Tabulka 5 Seznam ligandů a koncentrací použitých pro každý testovaný T2R.

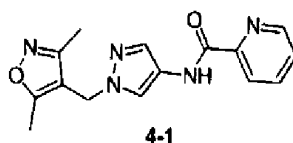
hT2R	agonista	koncentrace
1	kyselina pikrová	0,05 mM
3	chlorchinin pH 6,5	50 μ M
4	chlorchinin pH 6,5	5 mM
5	pikolin	10 mM
7	chlorchinin pH6,5	10 mM
8	andrografolid	0,5 mM
9	ofloxacin	1 mM
10	strychnin	50 μ M
13	oxyfenonium	1 mM
14	kyselina aristolocholová	2 μ M
16	salicin	1 mM
44	denatonij μ M	0,5 μ M
51	prop	2,5 μ M
54	runitidin	5 mM
55	cinchonin	150 μ M
61	kyselina aristolocholová	25 nM
63	kofein	1 mM
63	andrografolid	100 μ M
64	kyselina aristolochiolová	1 μ M
65	oleuropein	1 mM
67	andrografolid	5 μ M
71	kyselina pikrová	10 μ M
75	strychnin	1 μ M

Příklad 4

hT2R8 antagonisté: Příprava sloučenin podle vynálezu

Příklady sloučenin podle vynálezu jsou syntetizovány následovně.

Příklad 4-1: N-(1-((3,5-dimethylizoxazol-4-yl)methyl)-1H-pyrazol-4-yl)pikolinamid.



[00297] Hydrochlorid 1-((3,5-dimethylizoxazol-4-yl)methyl)-1H-pyrazol-4-aminu (Příklad 4-1a) (400 mg, 2,1 mmol), kyselina pikolinová (256 mg, 2,1 mmol) a HOBt (388 mg, 2,50 mmol) se smíchaly v DCM (7 ml). Reakční směs se nachala reagovat s triethylaminem (670 ml, 4,8 mmol) a míchala se po dobu 15 minut při teplotě místnosti v dusíkové atmosféře. Přidal se EDC (598 mg, 3,1 mmol) a reakční směs se míchala po dobu dalších 4 hodin. Reakční směs se pak zředila dichlormethanem (5 ml) a promyla se vodným nasyceným roztokem NaHCO₃ (5 ml, 2x), a pak vodným nasyceným roztokem NaCl (5 ml). Organická vrstva se sebrala, vysušila a zfiltrovala. Rozpouštědla se za vakua odstranila. Surový produkt se znovu suspendoval v EtOH (5 ml) a přečistil se pomocí reverzní fázové HPLC (5%-95% ACN v H₂O: 25 minutový gradient). Čisté frakce se spojily a koncentrovaly, což dalo N-(1-((3,5-dimethylizoxazol-4-yl)methyl)-1H-pyrazol-4-yl)pikolinamid (372 mg, 60%) jako bílou pevnou látku. ¹H NMR (CDCl₃, 400 MHz): δ 2,21 (s, 3H), 2,44 (s, 3H), 5,05 (s, 2H), 7,49-7,47 (m, 1H), 7,59 (s, 1H), 7,93-7,88 (dt, J= 14, 2 Hz, 1H), 8,07 (s, 1H), 8,24-8,21 (d, J= 8 Hz, 1H), 8,61-8,56 (m, 1H), 9,83 (bs, 1H). LC/MS; [M+H] vypočteno pro C₁₅H₁₅N₅O₂; očekáváno 297,1; nalezeno 298,3. : Teplota tání: 135 -137 °C.

[00298] Sloučenina měla IC₅₀ 0,57 μM na hT2R8 receptoru hořkosti.

Příklad 4-1a: hydrochlorid 1-((3,5-dimethylizoxazol-4-yl)methyl)-1H-pyrazol-4-aminu

[00299] Terc.butyl-(1-((3,5-dimethylizoxazol-4-yl)methyl)-1H-pyrazol-4-yl-karbamát) (Příklad 4-1b) (592 mg, 2 mmol) se míchal v roztoku 4N HCl v dioxanu (20 ml) při teplotě okolí po dobu 2 hodin. Rozpouštědlo se odstranilo za sníženého tlaku a zbytek se spojil se

směsí 1/1 ethylacetát/hexany (30 ml) a koncentroval se (dvakrát). Pevná látka se třela s hexany a sebrala se filtrací, což dalo hydrochlorid 1-((3,5-dimethylizoxazol-4-yl)methyl)-1H-pyrazol-4-aminu (500 mg, 99%) jako bílou pevnou látku. ^1H NMR (DMSO- d_6 , 400 MHz): δ 2,11 (s, 3H), 2,38 (s, 3H), 5,16 (s, 2H), 7,51 (s, 1H), 8,03 (s, 1H), 10,27 (bs, 3H).

Příklad 4-1b: Terc.butylu-(1-((3,5-dimethylizoxazol-4-yl)methyl)-1H-pyrazol-4-yl)karbamát)

[00300] 3,5-Dimethyl-4-((4-nitro-1H-pyrazol-1-yl)methyl)izoxazol (Příklad 4-1c) (14,6 g, 66 mmol), Boc anhydrid a 10% Pd/C (3,8 g) se míchal v MeOH (400 ml) pod 101,3 kPa (1 atmosférou) H_2 po dobu 16 hodin při teplotě okolí. Směs se zfiltrovala a roztok se odstranil za sníženého tlaku. Zbytek se přečistil chromatografií na silikagelu (20% ethylacetát v hexanech), což dalo terc.butyl-(1-((3,5-dimethylizoxazol-4-yl)methyl)-1H-pyrazol-4-yl)karbamát (12,7 g, 66%) jako světle růžovou pevnou látku, ^1H NMR (CDCl_3 , 400 MHz): δ 1,41 (s, 9H), 2,10 (s, 3H), 2,32 (s, 3H), 4,90 (s, 2H), 6,19 (bs, 1H), 7,19 (s, 1H), 7,50 (s, 1H). MS 293 (MH^+).

Příklad 4-1c: 3,5-dimethyl-4-((4-nitro-1H-pyrazol-1-yl)methyl)izoxazol

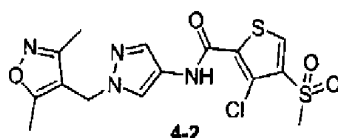
[00301] Do 4-nitro-1H-pyrazolu (Příklad 4-1d) (3,8 g, 34 mmol) v DMF (80 ml) ochlazeného na 0 °C pomocí ledové lázně se přidal *t*-BuOK (4,2 g, 38 mmol). Po přidavku této báze se ledová lázeň odstranila a směs se míchala po dobu 30 minut, načež následoval přídavek 4-(chlormethyl)-3,5-dimethylizoxazolu (5 g, 34 mmol). Reakční směs se refluxovala po dobu 16 hodin, poté se ochladila na teplotu okolí. Do reakční směsi se přidala H_2O a vzniklá sraženina se sebrala pomocí filtrace. Sraženina se promyla další H_2O , pak se vysušila za vysokého vakua, což dalo 3,5-dimethyl-4-((4-nitro-1H-pyrazol-1-yl)methyl)izoxazol (5,8 g, 78%) jako světle žlutou pevnou látku. ^1H NMR (CDCl_3 , 400 MHz): δ 2,23 (s, 3H), 2,46 (s, 3H), 5,08 (s, 2H), 8,02 (s, 1H), 8,08 (s, 1H).

Příklad 4-1d: 4-nitro-1H-pyrazol

[00302] Pyrazol (10 g, 147 mmol) se po částech přidal do koncentrované kyseliny sírové (100 ml), zatímco se vnitřní reakční teplota udržovala pod 50 °C pomocí ledové lázně. Poté se po kapkách přidala koncentrovaná kyselina dusičná (10 ml), přičemž se udržovala vnitřní reakční teplota pod 50 °C pomocí ledové lázně. Ledová lázeň se odstranila a reakční směs se zahřála na 60 °C a míchala se po dobu 4 hodin. Reakční směs se ochladila pomocí ledové lázně a přidala se báze 18 N vodný NaOH roztok (150 ml) na ~ pH 8. Produkt, který se

vysrážel jako bílá pevná látka, se sebral filtrací, promyl se H_2O a vysušil se za vysokého vakua, což dalo 4-nitro-1H-pyrazol (7g, 42%) jako bílou pevnou látku. ^{13}C NMR (100 MHz, CDCl_3): δ 126,4, 137,0.

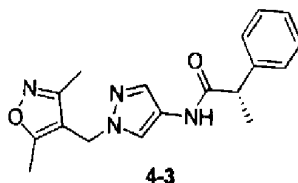
Příklad 4-2: 3-chlor-N-(1-((3,5-dimethylizoxazol-4-yl)methyl)-1H-pyrazol-4-yl)-4-(methylsulfonyl)thiofen-2-karboxamid



[00303] Do míchané směsi hydrochloridu ((3,5-dimethylizoxazol-4-yl)methyl)-1H-pyrazol-4-aminu (Příklad 4-1a) (500 mg, 2 mmol) v DCM (20 ml), ochlazeného na 0 °C pomocí ledové lázně, se přidal triethylamin (600 mg, 6 mmol). Směs se míchala, dokud nebyla všechna pevná látka v roztoku (~10 minut). 3-Chlor-4-(methylsulfonyl)thiofen-2-karbonyl-chlorid (543 mg, 2,1 mmol) v 2 ml CH_3CN se přidal pomocí stříkačky do volného aminu při 0 °C. Ledová lázeň se odstranila a směs se míchala po dobu 2 hodin. Reakční směs se zředila dichlormethanem (100 ml) a organická fáze se promyla H_2O (200 ml). Organická vrstva se vysušila nad síranem sodným, zfiltrovala se a koncentrovala se za sníženého tlaku. Pevná látka se třela s ethylacetát/hexany (1/5), což dalo 3-chlor-N-(1-((3,5-dimethylizoxazol-4-yl)methyl)-1H-pyrazol-4-yl)-4-(methylsulfonyl)thiofen-2-karboxamid (375 mg, 45%) jako bílou pevnou látku. ^1H NMR (CDCl_3 , 400 MHz): δ 2,20 (s, 3H), 2,43 (s, 4H), 3,22 (s, 3H), 5,05 (s, 2H), 7,57 (s, 1H), 7,94 (s, 1H), 8,41 (s, 1H), 8,59 (bs, 1H), LC/MS ; $[\text{M}+\text{H}]$ 415,5. Teplota tání: 202-204 °C.

[00304] Sloučenina měla IC_{50} 2,09 μM na hT2R8 receptoru hořkosti.

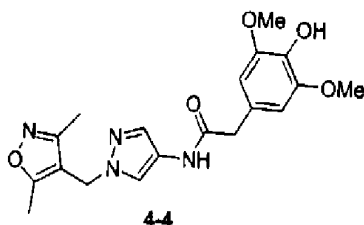
Příklad 4-3: (S)-N-(1-((3,5-dimethylizoxazol-4-yl)methyl)-1H-pyrazol-4-yl)-2-fenylpropanamid.



[00305] Hydrochlorid 1-((3,5-dimethylizoxazol-4-yl)methyl)-1H-pyrazol-4-aminu (Příklad 4-1a) (200 mg, 1 mmol), kyselina (S)-2-fenylpropionová (156 mg, 1 mmol) a PyBop (650 mg, 1,3 mmol) se přidaly do DMF (4 ml), načež následoval triethylamin (0,3 ml, 2,1 mmol). Reakční směs se míchala po dobu 4 hodin při teplotě místnosti v dusíkové atmosféře, pak se zředila ethylacetátem (20 ml), promyla se vodným nasyceným roztokem NaHCO₃ (2 x 15 ml), následován vodným nasyceným roztokem NaCl (15 ml). Organická fáze se vysušila, zfiltrovala a koncentrovala na rotační odparce. Surový produkt se znovu suspendoval v methanolu (3 ml) a přečistil se pomocí reverzní fázové HPLC (5% - 95% ACN ve H₂O: 25 minutový gradient). Frakce obsahující čistý produkt se koncentrovala, což dalo (S)-N-(1-((3,5-dimethylizoxazol-4-yl)methyl)-1H-pyrazol-4-yl)-2-fenylpropanamid (200 mg, 60%) jako bílou pevnou látku. ¹H NMR (400 MHz, DMSO-d₆) δ 1,36 (d, J = 7,2, Hz, 3H), 2,09 (s, 3H), 2,36 (s, 3H), 3,71- 3,66 (m, 1H), 5,05 (s, 2H), 7,33-7,17 (m, 5H), 7,37 (s, 1H), 7,90 (s, 1H), 10,05 (s, 1H), MS 325 (M+H). Teplota tání 108°C – 110°C.

[00306] Sloučenina měla IC₅₀ 0,41 μM na hT2R8 receptoru hořkosti.

Příklad 4-4 : N-(1-((3,5-dimethylizoxazol-4-yl)methyl)-1H-pyrazol-4-yl)-2-(4-hydroxy-3,5-dimethoxyfenyl)acetamid.

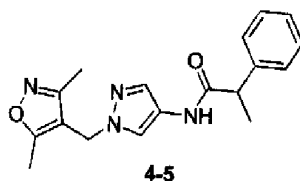


[00307] Hydrochlorid 1-((3,5-dimethylizoxazol-4-yl)methyl)-1H-pyrazol-4-aminu (Příklad 4-1a) (376 mg, 1,7 mmol), kyselina 2-(4-hydroxy-3,5-dimethoxyfenyl) octová (350 mg,

1,7 mmol), PyBop (1 g, 2 mmol) a triethylamin (605 mg, 6 mmol) se společně míchaly v DMF (10 ml) při teplotě místnosti po dobu 2 hodin. Reakční směs zředila se vodnou 1N HCl (100 ml) a extrahovala se DCM (3x, 75 ml). Spojené organické extrakty se vysušily nad síranem sodným, zfiltrovaly se a koncentrovaly se na rotační odparce. Zbytek se přečistil chromatografií na silikagelu (30% ethylacetát v hexanech), což dalo N-(1-((3,5-dimethylizoxazol-4-yl)methyl)-1H-pyrazol-4-yl)-2-(4-hydroxy-3,5-dimethoxy-fenyl)-acetamid (189 mg, 29%) jako bílou pevnou látku. ^1H NMR (CDCl_3 , 400 MHz) δ 2,10 (s, 3H), 2,36 (s, 3H), 3,40 (s, 2H), 3,70 (s, 6H), 5,07 (s, 2H), 6,53 (s, 2H), 7,39 (s, 1H), 7,92 (s, 1H), 8,18 (s, 1H), 10,03 (s, 1H). LC/MS; $[\text{M}+\text{H}]$ vypočteno pro $\text{C}_{19}\text{H}_{22}\text{N}_4\text{O}_5$; očekáváno 387,16; nalezeno 387,6. Teplota tání: 187-188°C.

[00308] Sloučenina měla IC_{50} 0,46 μM na hT2R8 receptoru hořkosti.

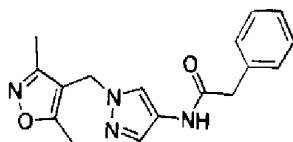
Příklad 4-5 : N-(1-((3,5-dimethylizoxazol-4-yl)methyl)-1H-pyrazol-4-yl)-2-fenylpropanamid.



[00309] Hydrochlorid 1-((3,5-dimethylizoxazol-4-yl)methyl)-1H-pyrazol-4-amin (Příklad 4-1a) (300 mg, 1,3 mmol), kyselina 2-fenylpropanová (225 mg, 1,5 mmol), triethylamin (300 mg, 3 mmol), DMAP (61 mg, 0,5 mmol) a EDC (386 mg, 2 mmol) se společně míchaly v DCM (10 ml) při teplotě místnosti po dobu 4 hodin. Reakční směs zředila se vodnou 1N HCl (100 ml) a extrahovala se DCM (3x, 75 ml). Spojené organické extrakty vysušily se nad síranem sodným, zfiltrovaly se a koncentrovaly se na rotační odparce. Zbytek se přečistil chromatografií na silikagelu (30% ethylacetát v hexanech), což dala N-(1-((3,5-dimethylizoxazol-4-yl)methyl)-1H-pyrazol-4-yl)-2-fenylpropanamid (272 mg, 81%) jako bílou pevnou látku. ^1H NMR (CDCl_3 , 400 MHz) δ 1,36 (d, 3H, $J=7,2$ Hz), 2,10 (s, 3H), 2,37 (s, 3H), 3,70 (m, 1H, $J=6,8$ Hz), 5,06 (s, 2H), 7,20 (t, 1H, $J=8,4$ Hz), 7,31-7,28 (m, 4H), 7,38 (s, 1H), 7,91 (s, 1H), 10,10 (s, 1H). LC/MS; $[\text{M}+\text{H}]$ vypočteno pro $\text{C}_{18}\text{H}_{20}\text{N}_4\text{O}_2$; očekáváno 325,16; nalezeno 325,5. Teplota tání: 129-130°C.

[00310] Sloučenina měla IC_{50} 0,32 μM na hT2R8 receptoru hořkosti.

Příklad 4-6: N-(1-((3,5-dimethylizoxazol-4-yl)methyl)-1H-pyrazol-4-yl)-2-fenylacetamid.

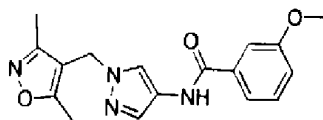


4-6

[00311] Hydrochloridová sůl 1-((3,5-dimethylizoxazol-4-yl)methyl)-1H-pyrazol-4-aminu (Příklad 4-1a) (230 mg, 1 mmol) a triethylamin (300 mg, 3 mmol) se smíchaly v DCM (10 ml) ochlazeného na 0 °C pomocí ledové lázně. 2-Fenylacetylchlorid (184 mg, 1,3 mmol) se přidal po kapkách do míchané reakční směsi. Když se přidavek dokončil, odstranila se ledová lázeň a reakční směs se míchala po dobu 1 hodiny. Směs se zředila DCM (50 ml), promyla se 1N vodnou HCl (100 ml), následována 1N vodným NaOH (100 ml) a pak H₂O (100 ml). Spojené organické extrakty se vysušily nad síranem sodným, zfiltrovaly se a rozpouštědlo se odstranilo na rotační odparce. Výsledný zbytek se přečistil chromatografií na silikagelu (50% ethylacetát v hexanech), což dalo 210 mg pevného produktu, který se třel v ethylacetát/hexanech (1/9), což dalo N-(1-((3,5-dimethylizoxazol-4-yl)methyl)-1H-pyrazol-4-yl)-2-fenylacetamid (188 mg, 68%) jako bílou pevnou látku. ¹H NMR (CDCl₃, 400 MHz): δ 2,15 (s, 3H), 2,38 (s, 3H), 3,69 (s, 2H), 4,97 (s, 2H), 7,15 b(s, 1H), 7,40-7,27 (m, 6H), 7,84 (s, 1H). LC/MS ; [M+H] vypočteno pro C₁₇H₁₈N₄O₂; očekáváno 311,14; nalezeno 311,40. Teplota tání: 106-108 °C.

[00312] Sloučenina měla IC₅₀ 0,53 μM na hT2R8 receptoru hořkosti.

Příklad 4-7: N-(1-((3,5-dimethylizoxazol-4-yl)methyl)-1H-pyrazol-4-yl)-3-methoxybenzamid.



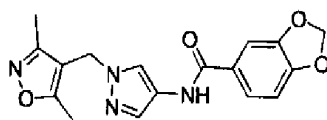
4-7

[00313] Hydrochlorid 1-((3,5-dimethylizoxazol-4-yl)methyl)-1H-pyrazol-4-aminu (Příklad 4-1a) (300 mg, 1,3 mmol), kyselina 3-methoxybenzoová (172 mg, 1,3 mmol), EDC (386 mg, 2 mmol) a triethylamin (303 mg, 3 mmol) se míchaly v DCM (5 ml) při teplotě okolí po dobu 6 hodin. Reakční směs se zředila DCM (50 ml) a organická fáze se promyla vodnou 0,1 N

HCl (150 ml), následována vodným 1N NaOH (150 ml). Organická vrstva se vysušila nad síranem sodným, zfiltrovala se a koncentrovala se na rotační odparce. Surový produkt se přečistil chromatografií na silikagelu (40% ethylacetátem v hexanech), což dalo 225 mg ne zcela bílé pevné látky. Pevná látka se třela ethylacetátem/hexany (1/9) a bílá pevná látka se sebrala filtrací. Čistý produkt se rozpustil v absolutním ethanolu a koncentroval se na rotační odparce (4x, 25 ml), což dalo N-(1-((3,5-dimethylizoxazol-4-yl)methyl)-1H-pyrazol-4-yl)-3-methoxybenzamid (185 mg, 43%) jako bílou pevnou látku. ^1H NMR (CDCl_3 , 400 MHz): δ 2,20 (s, 3H), 2,42 (s, 3H), 3,85 (s, 3H), 5,03 (s, 2H), 7,09-7,06 (m, 1H), 7,37-7,35 (m, 2H), 7,41 (m, 1H), 7,51 (s, 1H), 7,93 (bs, 1H), 8,03 (s, 1H). LC/MS; $[\text{M}+\text{H}]$ vypočteno pro $\text{C}_{17}\text{H}_{18}\text{N}_4\text{O}_3$; očekáváno 327,14; nalezeno 327,30. Teplota tání: 127-129 °C.

[00314] Sloučenina měla IC_{50} 0,39 μM na hT2R8 receptoru hořkosti.

Příklad 4-8: N-(1-((3,5-dimethylizoxazol-4-yl)methyl)-1H-pyrazol-4-yl)benzo[d][1,3]-dioxol-5-karboxamid

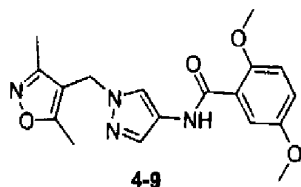


4-8

[00315] Hydrochlorid 1-((3,5-dimethylizoxazol-4-yl)methyl)-1H-pyrazol-4-aminu (Příklad 1a) (8 mg, 35 μmol) a kyselina benzo[d][1,3]dioxol-5-karboxylová (7 mg, 42 μmol) se každý zvlášť rozpustily v 200 μl dimethylformamidu. Si-karbodiimidová pryskyřice (70 mg, 70 μmol) se dala do 1,2 ml Greinerovy destičky s 96-ti jamkami, načež následoval přidavek aminu a kyseliny. Hydroxybenzotriazol (6 mg, 42 μmol) se rozpustil ve 100 μl dimethylformamidu a přidal se do reakční jamky. Reakční směs se přes noc protřepávala při teplotě místnosti. Aby se odstarnil přebytek karboxylové kyseliny a hydroxybenzotriazolu, přidala se do reakční směsi PS-trisaminová pryskyřice (35 mg, 70 μmol) za stálého protřepávání přes noc při teplotě místnosti. 200 μl acetonitrilu se přidalo do reakční jamky a protřepávalo se po dobu 1 minuty. Horní čirý roztok se převedl do nové desky. Proces extrakce se ještě dvakrát opakoval. Roztok se odpařil za vakua a dal požadovaný produkt. Výtěžek 6%. MS $\text{M}+\text{H}$ vypočteno 341,1, nalezeno 341,2.

[00316] Sloučenina měla IC_{50} 0,2 μM na hT2R8 receptoru hořkosti.

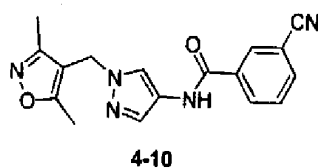
Příklad 4-9: N-(1-((3,5-dimethylizoxazol-4-yl)methyl)-1H-pyrazol-4-yl)-2,5-dimethoxybenzamid



[00317] Připravený jak v Příkladu 4-8 z kyseliny 2,5-dimethoxybenzoové a hydrochloridu 1-((3,5-dimethylizoxazol-4-yl)methyl)-1H-pyrazol-4-aminu (Příklad 4-1a). Výtěžek 13%. MS M+H vypočteno 357,5, nalezeno 357,3.

[00318] Sloučenina měla IC_{50} 0,17 μ M na hT2R8 receptoru hořkosti.

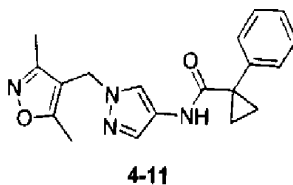
Příklad 4-10: 3-N-(1-((3,5-dimethylizoxazol-4-yl)methyl)-1H-pyrazol-4-yl)benzamid



[00319] Připravený jak v Příkladu 4-8 z kyseliny 3-kyanobenzoové a hydrochloridu 1-((3,5-dimethylizoxazol-4-yl)methyl)-1H-pyrazol-4-aminu (Příklad 4-1a). Výtěžek 15%. MS M+H vypočteno 322,6, nalezeno 322,3.

[00320] Sloučenina měla IC_{50} 0,2 μ M na hT2R8 receptoru hořkosti.

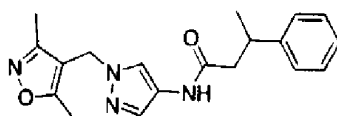
Příklad 4-11: N-(1-((3,5-dimethylizoxazol-4-yl)methyl)-1H-pyrazol-4-yl)-1-fenylcyklopropankarboxamid



[00321] Připravený jak v Příkladu 4-8 z kyseliny 1-fenylcyklopropankarboxylové a hydrochloridu 1-((3,5-dimethylizoxazol-4-yl)methyl)-1H-pyrazol-4-aminu (Příklad 4-1a). Výtěžek 6%. MS M+H vypočteno 337,6, nalezeno 337,5.

[00322] Sloučenina měla IC_{50} 0,25 μ M na hT2R8 receptoru hořkosti.

Příklad 4-12: N-(1-((3,5-dimethylizoxazol-4-yl)methyl)-1H-pyrazol-4-yl)-3-fenylbutanamid

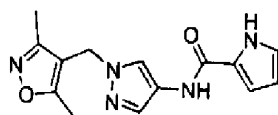


4-12

[00323] Připravený jak v Příkladu 4-8 z kyseliny 3-fenylbutanové a hydrochloridu 1-((3,5-dimethylizoxazol-4-yl)methyl)-1H-pyrazol-4-aminu (Příklad 4-1a). Výtěžek 6%. MS M+H vypočteno 339,6, nalezeno 339,5.

[00324] Sloučenina měla IC_{50} 0,28 μ M na hT2R8 receptoru hořkosti.

Příklad 4-13: N-(1-((3,5-dimethylizoxazol-4-yl)methyl)-1H-pyrazol-4-yl)-1H-pyrol-2-karboxamid

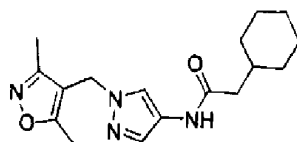


4-13

[00325] Připravený jak v Příkladu 4-8 z kyseliny 1H-pyrol-2-karboxylové a hydrochloridu 1-((3,5-dimethylizoxazol-4-yl)methyl)-1H-pyrazol-4-aminu (Příklad 4-1a). Výtěžek 18%. MS M+H vypočteno 286,6, nalezeno 286,3.

[00326] Sloučenina měla IC_{50} 0,57 μ M na hT2R8 receptoru hořkosti.

Příklad 4-14: 2-cyklohexyl-N-(1-((3,5-dimethylizoxazol-4-yl)methyl)-1H-pyrazol-4-yl)acetamid

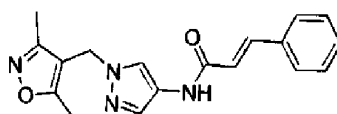


4-14

[00327] Připravený jak v Příkladu 4-8 z kyseliny 2-cyklohexyloctové a hydrochloridu 1-((3,5-dimethylizoxazol-4-yl)methyl)-1H-pyrazol-4-aminu (Příklad 4-1a). Výtěžek 17%. MS M+H vypočteno 317,6, nalezeno 317,4.

[00328] Sloučenina měla IC_{50} 0,73 μ M na hT2R8 receptoru hořkosti.

Příklad 4-15: N-(1-((3,5-dimethylizoxazol-4-yl)methyl)-1H-pyrazol-4-yl)cinnamamid

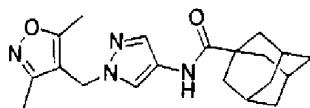


4-15

[00329] Připravený jak v Příkladu 4-8 z kyseliny skořicové a hydrochloridu 1-((3,5-dimethylizoxazol-4-yl)methyl)-1H-pyrazol-4-aminu (Příklad 4-1a). Výtěžek 4%. MS M+H vypočteno 322,6, nalezeno 322,4.

[00330] Sloučenina měla IC_{50} 0,7 μ M na hT2R8 receptoru hořkosti.

Příklad 4-16: N-(1-((3,5-dimethylizoxazol-4-yl)methyl)-1H-pyrazol-4-yl)adamantan.



4-16

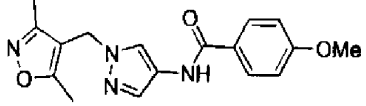
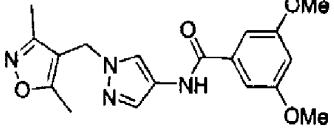
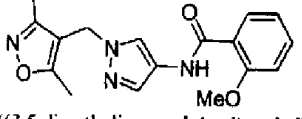
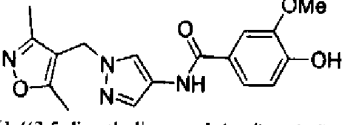
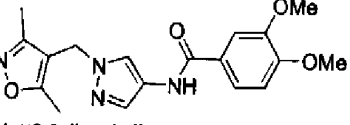
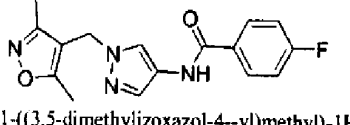
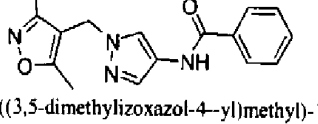
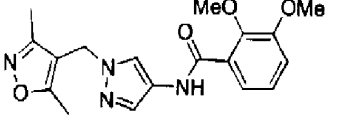
[00331] Hydrochlorid 1-((3,5-dimethylizoxazol-4-yl)methyl)-1H-pyrazol-4-aminu (300 mg, 1,56 mmol), kyselina adamantan-1-karboxylová (281 mg, 1,56 mmol), PyBop (972 mg, 1,87 mmol) a triethylamin (0,438 ml, 3,12 mmol) se míchaly v DMF (5 ml). Reakční směs se míchala při teplotě místnosti po dobu 4 hodin v dusíkové atmosféře. Reakční směs se zředila

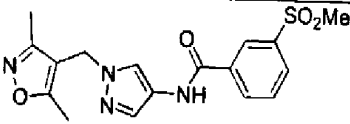
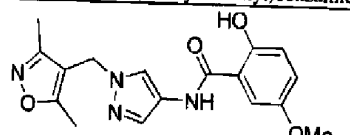
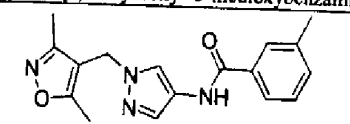
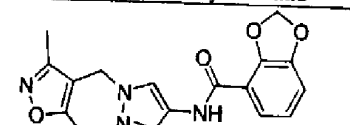
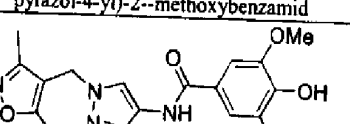
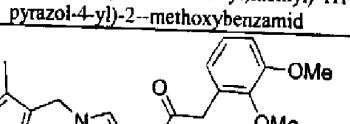
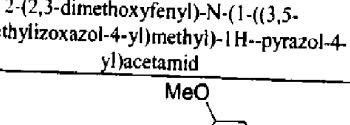
ethylacetátem (4 ml) a promyla se nasyceným roztokem NaHCO_3 (2x, 3 ml) a pak nasyceným NaCl roztokem (3 ml). Organická vrstva se extrahovala, vysušila a zfiltróvala. Rozpouštědla se za vakua odstranila. Surový produkt se znovu suspendoval v methanolu (4 ml) a přečistil se pomocí HPLC. Čistý produkt se znovu rozpustil v ethanolu a koncentroval se za vakua (3 x 3 ml), což dalo N-(1-((3,5-dimethylizoxazol-4-yl)methyl)-1H-pyrazol-4-yl)adamantan jako bílou pevnou látku v 60% výtěžku. ^1H NMR (400 MHz, CDCl_3): δ 1,79-1,70 (m, 6H), 1,93 – 1,92 (m, 6H), 2,08 (bs, 3H), 2,18 (s, 3H), 2,41 (s, 3H), 4,98 (s, 2H), 7,37 (s, 1H), 7,38 (s, 1H), 7,92 (s, 1H), MS 355 (M+H). Teplota tání 167-169 °C.

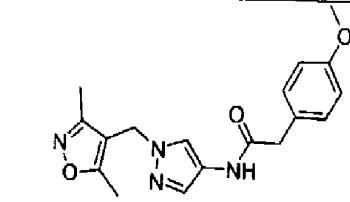
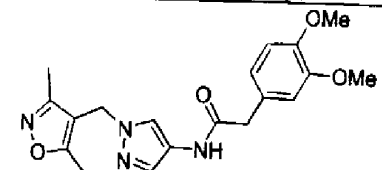
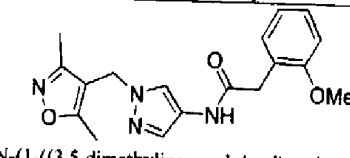
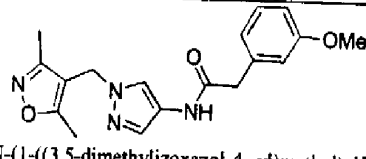
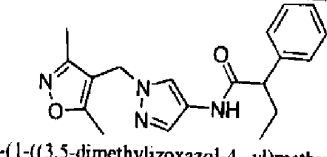
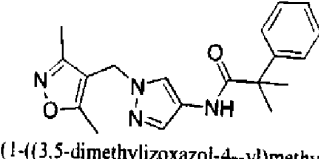
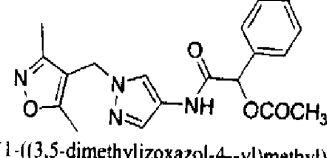
[00332] Sloučenina měla IC_{50} 0,88 μM na hT2R8 receptoru hořkosti.

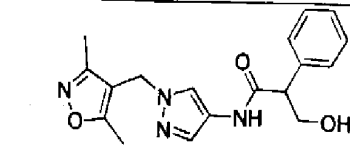
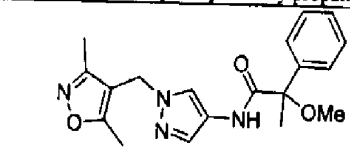
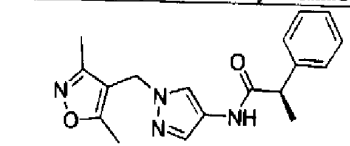
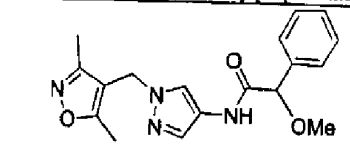
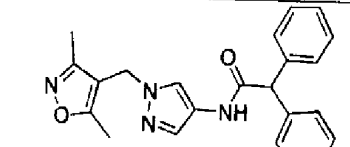
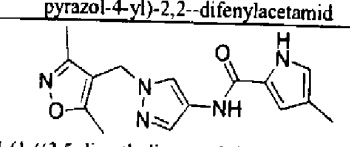
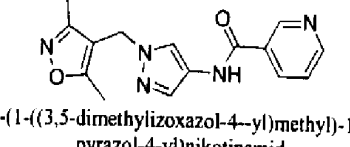
[00333] Další sloučeniny se syntetizovaly následujícími podobnými postupy, jak je popsáno v Příkladech 4-1 až 4-16 a pokusně se testovaly a zjistilo se, že mají relativně vysokou míru účinnosti jako inhibitory hT2R8 receptoru hořkosti. Výsledky těchto testů jsou ukázány v Tabulce A.

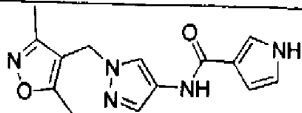
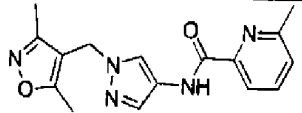
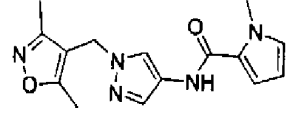
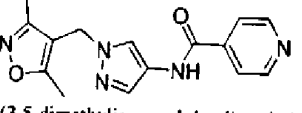
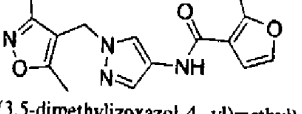
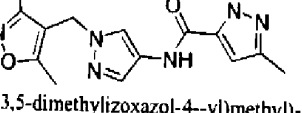
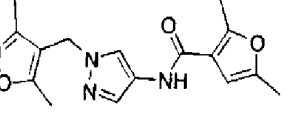
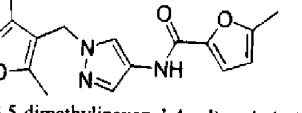
Tabulka A

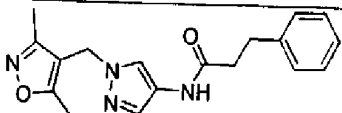
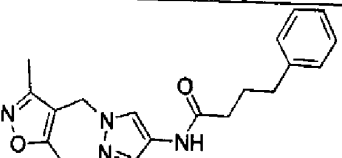
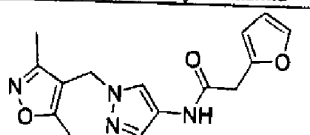
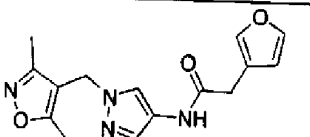
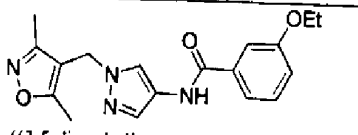
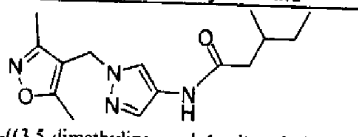
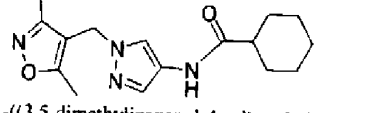
Sloučenina č.	Sloučenina	hT2R8 IC ₅₀ (μM)
4-17	 N-(1-((3,5-dimethylisoxazol-4-yl)methyl)-1H-pyrazol-4-yl)-4-methoxybenzamid	0,26
4-18	 N-(1-((3,5-dimethylisoxazol-4-yl)methyl)-1H-pyrazol-4-yl)-3,5-dimethoxybenzamid	0,28
4-19	 N-(1-((3,5-dimethylisoxazol-4-yl)methyl)-1H-pyrazol-4-yl)-2-methoxybenzamid	0,39
4-20	 N-(1-((3,5-dimethylisoxazol-4-yl)methyl)-1H-pyrazol-4-yl)-4-hydroxy-3-methoxybenzamid	0,48
4-21	 N-(1-((3,5-dimethylisoxazol-4-yl)methyl)-1H-pyrazol-4-yl)-3,4-dimethoxybenzamid	0,56
4-23	 N-(1-((3,5-dimethylisoxazol-4-yl)methyl)-1H-pyrazol-4-yl)-4-fluorbenzamid	1,56
4-24	 N-(1-((3,5-dimethylisoxazol-4-yl)methyl)-1H-pyrazol-4-yl)benzamid	2,62
4-25	 N-(1-((3,5-dimethylisoxazol-4-yl)methyl)-1H-pyrazol-4-yl)-2,3-dimethoxybenzamid	0,61

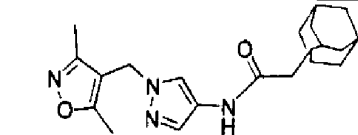
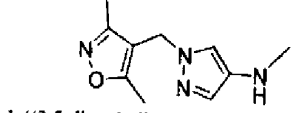
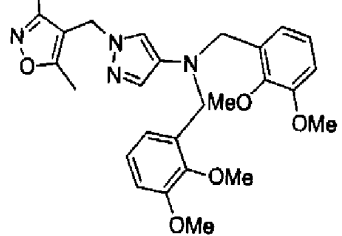
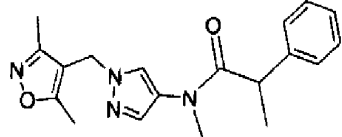
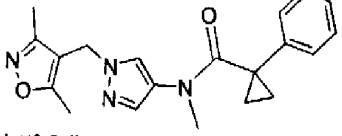
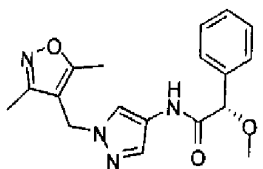
Sloučenina č.	Sloučenina	hT2R8 IC ₅₀ (μM)
4-26	 N-(1-((3,5-dimethylizoxazol-4-yl)methyl)-1H-pyrazol-4-yl)-3-((methylsulfonyl)benzamid	0,72
4-27	 N-(1-((3,5-dimethylizoxazol-4-yl)methyl)-1H-pyrazol-4-yl)-2-hydroxy-5-methoxybenzamid	0,98
4-28	 N-(1-((3,5-dimethylizoxazol-4-yl)methyl)-1H-pyrazol-4-yl)-3-methylbenzamid	0,57
4-29	 N-(1-((3,5-dimethylizoxazol-4-yl)methyl)-1H-pyrazol-4-yl)-2-methoxybenzamid	0,30
4-30	 N-(1-((3,5-dimethylizoxazol-4-yl)methyl)-1H-pyrazol-4-yl)-2-methoxybenzamid	0,39
4-31	 2-(2,3-dimethoxyphenyl)-N-(1-((3,5-dimethylizoxazol-4-yl)methyl)-1H-pyrazol-4-yl)acetamid	0,80
4-32	 2-(3,5-dimethoxyphenyl)-N-(1-((3,5-dimethylizoxazol-4-yl)methyl)-1H-pyrazol-4-yl)acetamid	0,96

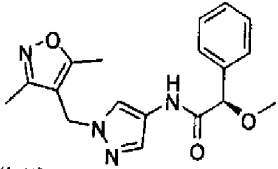
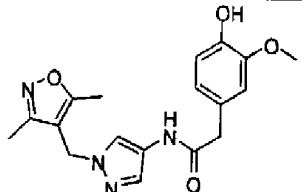
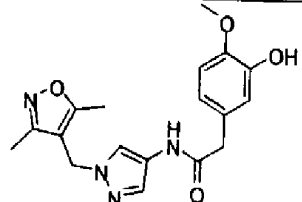
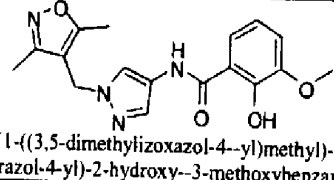
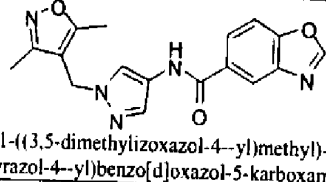
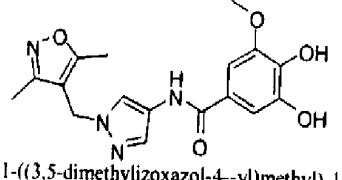
Sloučenina č.	Sloučenina	hT2R8 IC ₅₀ (μM)
4-33	 N-(1-((3,5-dimethylisoxazol-4-yl)methyl)-1H-pyrazol-4-yl)-2-(4-methoxyphenyl)acetamid	0,99
4-34	 N-(1-((3,5-dimethylisoxazol-4-yl)methyl)-1H-pyrazol-4-yl)-2-(3,4-dimethoxyphenyl)acetamid	1,11
4-35	 N-(1-((3,5-dimethylisoxazol-4-yl)methyl)-1H-pyrazol-4-yl)-2-(2-methoxyphenyl)acetamid	1,16
4-36	 N-(1-((3,5-dimethylisoxazol-4-yl)methyl)-1H-pyrazol-4-yl)-2-(3-methoxyphenyl)acetamid	1,85
4-37	 N-(1-((3,5-dimethylisoxazol-4-yl)methyl)-1H-pyrazol-4-yl)-2-phenylbutanamid	0,50
4-38	 N-(1-((3,5-dimethylisoxazol-4-yl)methyl)-1H-pyrazol-4-yl)-2-(2-phenylpropan-2-yl)acetamid	0,53
4-39	 (2-(1-((3,5-dimethylisoxazol-4-yl)methyl)-1H-pyrazol-4-ylamino)-2-oxo-1-phenylethyl)-acetat	0,83

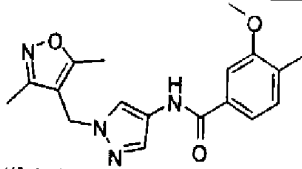
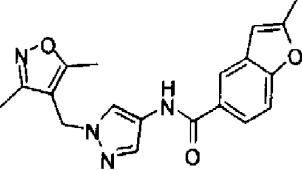
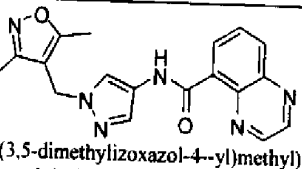
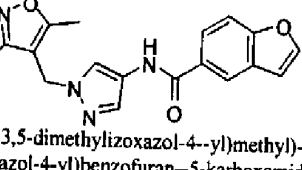
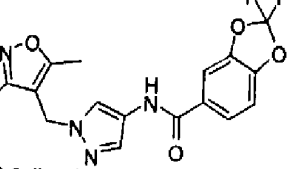
Sloučenina č.	Sloučenina	hT2R8 IC ₅₀ (μM)
4-40	 N-(1-((3,5-dimethylisoxazol-4-yl)methyl)-1H-pyrazol-4-yl)-3-hydroxy-2-phenylpropanamid	0,96
4-41	 N-(1-((3,5-dimethylisoxazol-4-yl)methyl)-1H-pyrazol-4-yl)-2-methoxybenzamid	2,10
4-42	 (R)-N-(1-((3,5-dimethylisoxazol-4-yl)methyl)-1H-pyrazol-4-yl)-2-phenylpropanamid	3,72
4-43	 N-(1-((3,5-dimethylisoxazol-4-yl)methyl)-1H-pyrazol-4-yl)-2-methoxy-2-phenylacetamid	3,43
4-44	 N-(1-((3,5-dimethylisoxazol-4-yl)methyl)-1H-pyrazol-4-yl)-2,2-diphenylacetamid	5,19
4-45	 N-(1-((3,5-dimethylisoxazol-4-yl)methyl)-1H-pyrazol-4-yl)-4-methyl-1H-pyrol-2-karboxamid	0,72
4-46	 N-(1-((3,5-dimethylisoxazol-4-yl)methyl)-1H-pyrazol-4-yl)nikotinamid	1,05

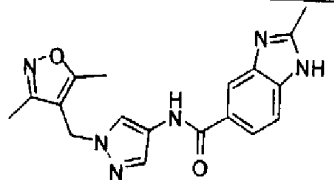
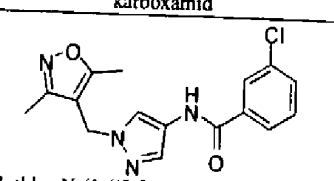
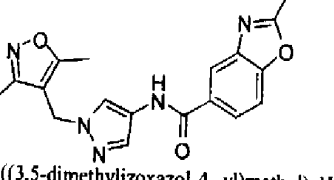
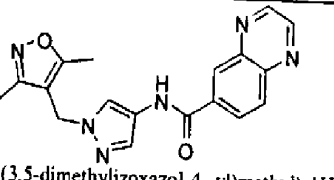
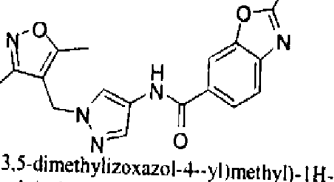
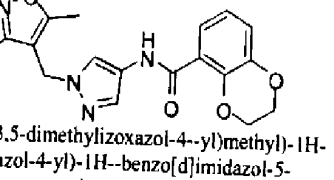
Sloučenina č.	Sloučenina	hT2R8 IC ₅₀ (μM)
4-47	 N-(1-((3,5-dimethylisoxazol-4-yl)methyl)-1H-pyrazol-4-yl)-2-methoxybenzamid	1,35
4-48	 N-(1-((3,5-dimethylisoxazol-4-yl)methyl)-1H-pyrazol-4-yl)-6-methylpikolinamid	1,95
4-49	 N-(1-((3,5-dimethylisoxazol-4-yl)methyl)-1H-pyrazol-4-yl)-1-methyl-1H-pyrol-2-karboxamid	3,40
4-50	 N-(1-((3,5-dimethylisoxazol-4-yl)methyl)-1H-pyrazol-4-yl)izonikotinamid	4,59
4-51	 N-(1-((3,5-dimethylisoxazol-4-yl)methyl)-1H-pyrazol-4-yl)-2-methylfuran-3-karboxamid	7,87
4-52	 N-(1-((3,5-dimethylisoxazol-4-yl)methyl)-1H-pyrazol-4-yl)-1,3-dimethyl-1H-pyrazol-5-karboxamid	18,05
4-53	 N-(1-((3,5-dimethylisoxazol-4-yl)methyl)-1H-pyrazol-4-yl)-2,5-dimethylfuran-3-karboxamid	3,03
4-54	 N-(1-((3,5-dimethylisoxazol-4-yl)methyl)-1H-pyrazol-4-yl)-5-methylfuran-2-karboxamid	3,19

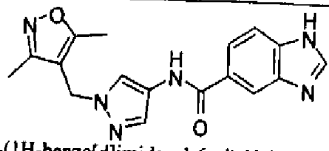
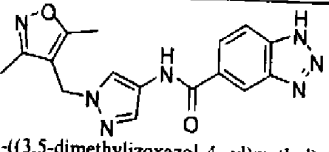
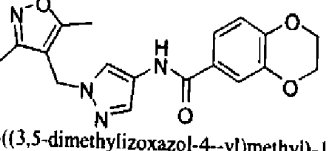
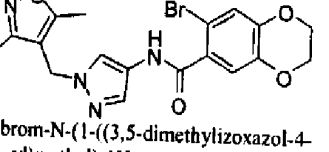
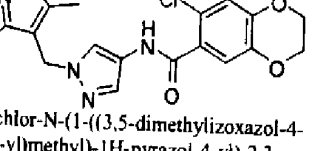
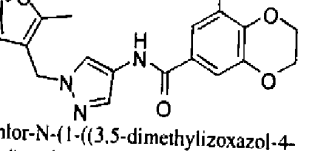
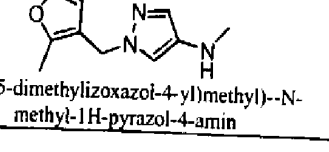
Sloučenina č.	Sloučenina	hT2R8 IC ₅₀ (μM)
4-55	 N-(1-((3,5-dimethylisoxazol-4-yl)methyl)-1H-pyrazol-4-yl)-3-phenylpropanamid	0,49
4-56	 N-(1-((3,5-dimethylisoxazol-4-yl)methyl)-1H-pyrazol-4-yl)-4-phenylbutanamid	0,83
4-57	 N-(1-((3,5-dimethylisoxazol-4-yl)methyl)-1H-pyrazol-4-yl)-2-methoxybenzamid	4,16
4-58	 N-(1-((3,5-dimethylisoxazol-4-yl)methyl)-1H-pyrazol-4-yl)-2-(furan-3-yl)acetamid	8,66
4-59	 N-(1-((3,5-dimethylisoxazol-4-yl)methyl)-1H-pyrazol-4-yl)-3-ethoxybenzamid	0,22
4-60	 N-(1-((3,5-dimethylisoxazol-4-yl)methyl)-1H-pyrazol-4-yl)-3-methylpentanamid	1,94
4-61	 N-(1-((3,5-dimethylisoxazol-4-yl)methyl)-1H-pyrazol-4-yl)cyclohexanecarboxamid	2,20

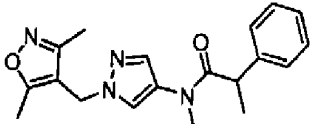
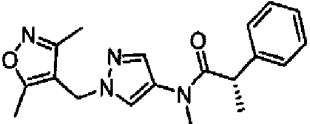
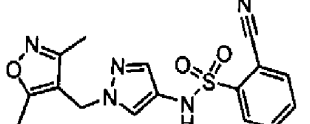
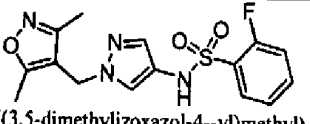
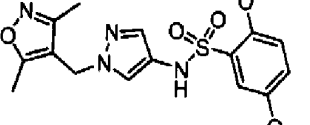
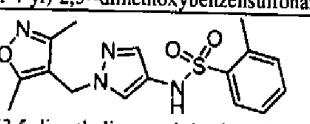
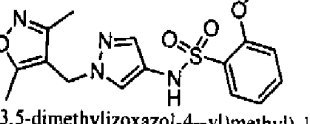
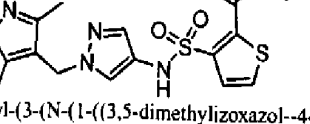
Sloučenina č.	Sloučenina	hT2R8 IC ₅₀ (μM)
4-62	 N-(1-((3,5-dimethylizoxazol-4-yl)methyl)-1H-pyrazol-4-yl)-2-(adamantan-1-yl)acetamid	3,77
4-63	 1-((3,5-dimethylizoxazol-4-yl)methyl)-N-methyl-1H-pyrazol-4-amin	8,76
4-64	 N,N-bis(2,3-dimethoxybenzyl)-1-((3,5-dimethylizoxazol-4-yl)methyl)-1H-pyrazol-4-amin	12,60
4-65	 N-(1-((3,5-dimethylizoxazol-4-yl)methyl)-1H-pyrazol-4-yl)-N-methyl-2-phenylpropanamid	2,81
4-66	 N-(1-((3,5-dimethylizoxazol-4-yl)methyl)-1H-pyrazol-4-yl)-N-methyl-1-phenylcyclopropanecarboxamid	8,23
4-67	 (S)-N-(1-((3,5-dimethylizoxazol-4-yl)methyl)-1H-pyrazol-4-yl)-2-methoxy-2-phenylacetamid	8,6

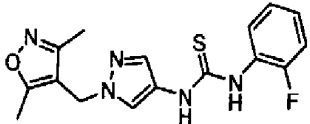
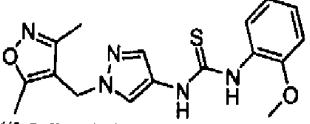
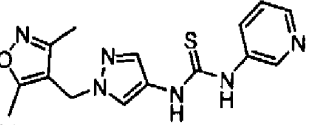
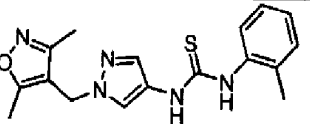
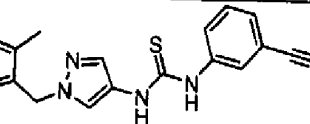
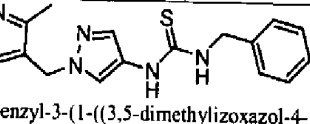
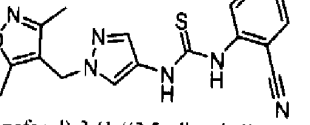
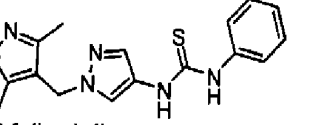
Sloučenina č.	Sloučenina	hT2R8 IC ₅₀ (μM)
4-68	 (R)-N-(1-((3,5-dimethylizoxazol-4-yl)methyl)-1H-pyrazol-4-yl)-2-methoxy-2-phenylacetamid	5,0
4-69	 N-(1-((3,5-dimethylizoxazol-4-yl)methyl)-1H-pyrazol-4-yl)-2-(4-hydroxy-3-methoxyphenyl)acetamid	4,7
4-70	 N-(1-((3,5-dimethylizoxazol-4-yl)methyl)-1H-pyrazol-4-yl)-2-(3-hydroxy-4-methoxyphenyl)acetamid	3,1
4-71	 N-(1-((3,5-dimethylizoxazol-4-yl)methyl)-1H-pyrazol-4-yl)-2-hydroxy-3-methoxybenzamid	2,9
4-72	 N-(1-((3,5-dimethylizoxazol-4-yl)methyl)-1H-pyrazol-4-yl)benzo[d]oxazol-5-karboxamid	2,6
4-73	 N-(1-((3,5-dimethylizoxazol-4-yl)methyl)-1H-pyrazol-4-yl)-3,4-dihydroxy-5-methoxybenzamid	2,2

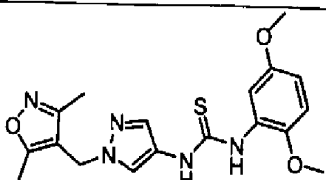
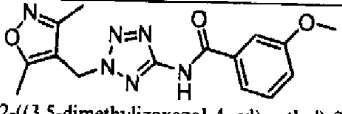
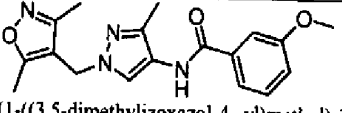
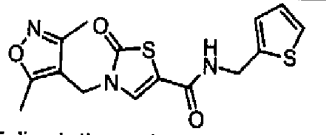
Sloučenina č.	Sloučenina	hT2R8 IC ₅₀ (μM)
4-74	 N-(1-((3,5-dimethylisoxazol-4-yl)methyl)-1H-pyrazol-4-yl)-3-methoxy-4-methylbenzamid	2,2
4-75	 N-(1-((3,5-dimethylisoxazol-4-yl)methyl)-1H-pyrazol-4-yl)-2-methylbenzofuran-5-karboxamid	2,1
4-76	 N-(1-((3,5-dimethylisoxazol-4-yl)methyl)-1H-pyrazol-4-yl)chinoxalin-5-karboxamid	1,7
4-77	 N-(1-((3,5-dimethylisoxazol-4-yl)methyl)-1H-pyrazol-4-yl)benzofuran-5-karboxamid	1,4
4-78	 N-(1-((3,5-dimethylisoxazol-4-yl)methyl)-1H-pyrazol-4-yl)-2,2-difluorbenzo[d][1,3]dioxol-5-karboxamid	1,3

Sloučenina č.	Sloučenina	hT2R8 IC ₅₀ (μ M)
4-79	 N-(1-((3,5-dimethylizoxazol-4-yl)methyl)-1H-pyrazol-4-yl)-2-methyl-1H-benzo[d]imidazol-5-karboxamid	1,0
4-80	 3-chlor-N-(1-((3,5-dimethylizoxazol-4-yl)methyl)-1H-pyrazol-4-yl)benzamid	0,9
4-81	 N-(1-((3,5-dimethylizoxazol-4-yl)methyl)-1H-pyrazol-4-yl)-2-ethylbenzo[d]oxazol-5-karboxamid	0,8
4-82	 N-(1-((3,5-dimethylizoxazol-4-yl)methyl)-1H-pyrazol-4-yl)chinoxalin-6-karboxamid	0,8
4-83	 N-(1-((3,5-dimethylizoxazol-4-yl)methyl)-1H-pyrazol-4-yl)-2-methylbenzo[d]oxazol-6-karboxamid	0,7
4-85	 N-(1-((3,5-dimethylizoxazol-4-yl)methyl)-1H-pyrazol-4-yl)-1H-benzo[d]imidazol-5-karboxamid	0,6

Sloučenina č.	Sloučenina	hT2R8 IC ₅₀ (μM)
4-86	 2-(1H-benzo[d]imidazol-6-yl)-N-(1-((3,5-dimethylizoxazol-4-yl)methyl)-1H-pyrazol-4-yl)acetamid	0,6
4-87	 N-(1-((3,5-dimethylizoxazol-4-yl)methyl)-1H-pyrazol-4-yl)-1H-benzo[d][1,2,3]triazol-5-karboxamid	0,6
4-88	 N-(1-((3,5-dimethylizoxazol-4-yl)methyl)-1H-pyrazol-4-yl)-2,3-dihydrobenzo[b][1,4]dioxin-6-karboxamid	0,4
4-89	 7-brom-N-(1-((3,5-dimethylizoxazol-4-yl)methyl)-1H-pyrazol-4-yl)-2,3-dihydrobenzo[b][1,4]dioxin-6-karboxamid	0,3
4-90	 7-chlor-N-(1-((3,5-dimethylizoxazol-4-yl)methyl)-1H-pyrazol-4-yl)-2,3-dihydrobenzo[b][1,4]dioxin-6-karboxamid	0,1
4-91	 8-chlor-N-(1-((3,5-dimethylizoxazol-4-yl)methyl)-1H-pyrazol-4-yl)-2,3-dihydrobenzo[b][1,4]dioxin-6-karboxamid	0,1
4-96	 1-((3,5-dimethylizoxazol-4-yl)methyl)-N-methyl-1H-pyrazol-4-amin	8,764

Sloučenina č.	Sloučenina	hT2R8 IC ₅₀ (μM)
4-97	 N-(1-((3,5-dimethylizoxazol-4-yl)methyl)-1H-pyrazol-4-yl)-N-methyl-2-phenylpropanamid	2,126
4-98	 (S)-N-(1-((3,5-dimethylizoxazol-4-yl)methyl)-1H-pyrazol-4-yl)-N-methyl-2-phenylpropanamid	2,811
4-99	 2-kyano-N-(1-((3,5-dimethylizoxazol-4-yl)methyl)-1H-pyrazol-4-yl)benzensulfonamid	1,358
4-100	 N-(1-((3,5-dimethylizoxazol-4-yl)methyl)-1H-pyrazol-4-yl)-2-fluorbenzensulfonamid	8,510
4-101	 N-(1-((3,5-dimethylizoxazol-4-yl)methyl)-1H-pyrazol-4-yl)-2,5-dimethoxybenzensulfonamid	1,631
4-102	 N-(1-((3,5-dimethylizoxazol-4-yl)methyl)-1H-pyrazol-4-yl)-2-methylbenzensulfonamid	2,153
4-103	 N-(1-((3,5-dimethylizoxazol-4-yl)methyl)-1H-pyrazol-4-yl)-2-methoxybenzensulfonamid	3,801
4-104	 methyl-(3-(N-(1-((3,5-dimethylizoxazol-4-yl)methyl)-1H-pyrazol-4-yl)sulfamoyl)thiophen-2-yl)karboxylát	1,252

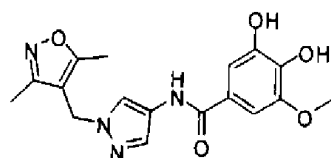
Sloučenina č.	Sloučenina	hT2R8 IC ₅₀ (μM)
4-105	 1-(1-((3,5-dimethylisoxazol-4-yl)methyl)-1H-pyrazol-4-yl)-3-(2-fluorophenyl)thiomocovina	1,629
4-106	 1-(1-((3,5-dimethylisoxazol-4-yl)methyl)-1H-pyrazol-4-yl)-3-(2-methoxyphenyl)thiomocovina	2,607
4-107	 1-(1-((3,5-dimethylisoxazol-4-yl)methyl)-1H-pyrazol-4-yl)-3-(pyridin-3-yl)thiomocovina	2,999
4-108	 1-(1-((3,5-dimethylisoxazol-4-yl)methyl)-1H-pyrazol-4-yl)-3-o-tolylthiomocovina	3,013
4-109	 1-(3-kyanofenyl)-3-(1-((3,5-dimethylisoxazol-4-yl)methyl)-1H-pyrazol-4-yl)thiomocovina	0,783
4-110	 1-benzyl-3-(1-((3,5-dimethylisoxazol-4-yl)methyl)-1H-pyrazol-4-yl)thiomocovina	1,097
4-111	 1-(2-kyanofenyl)-3-(1-((3,5-dimethylisoxazol-4-yl)methyl)-1H-pyrazol-4-yl)thiomocovina	2,347
4-112	 1-(1-((3,5-dimethylisoxazol-4-yl)methyl)-1H-pyrazol-4-yl)-3-fenylthiomocovina	2,492

Sloučenina č.	Sloučenina	hT2R8 IC ₅₀ (μM)
4-113	 1-(2,5-dimethoxyfenyl)-3-((1-((3,5-dimethylizoxazol-4-yl)methyl)-1H-pyrazol-4-yl)thiomocovina	5,240
4-114	 N-(2-((3,5-dimethylizoxazol-4-yl)methyl)-2H-tetrazol-5-yl)-3-methoxybenzamid	1,866
4-115	 N-(1-((3,5-dimethylizoxazol-4-yl)methyl)-3-methyl-1H-pyrazol-4-yl)-3-methoxybenzamid	9,248
4-116	 3-((3,5-dimethylizoxazol-4-yl)methyl)-2-oxo-N-(thiofen-2-ylmethyl)-2,3-dihydrothiazol-5-karboxamid	2,279

Příklady 4-67 až 4-91:

[00334] Připravený jak v Příkladu 4-73 z hydrochloridu 1-((3,5-dimethylizoxazol-4-yl)methyl)-1H-pyrazol-4-aminu (Příklad 4-1a) a jeho odpovídajících funkčních karboxylových kyselin. Charakterizace se provedla pomocí LCMS, kde se našly požadované hmotnosti.

Příklad 4-73: N-(1-((3,5-dimethylizoxazol-4-yl)methyl)-1H-pyrazol-4-yl)-3,4-dihydroxy-5-methoxybenzamid

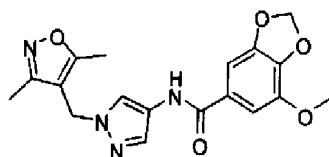


4-73

[00335] Hydrochlorid 1-((3,5-dimethylizoxazol-4-yl)methyl)-1H-pyrazol-4-aminu (Příklad 4-1a) (228 mg, 1 mmol), kyselina 3,4-dihydroxy-5-methoxybenzoová (184 mg, 1 mmol), HOBt (135mg, 1 mmol) a EDC (191mg, 1 mmol) se rozpustily v 2 ml DMF v mikrovlnné zkumavce, načež následoval přidavek triethylaminu (101mg, 1 mmol). Reakční směs se dala do mikrovlnného reaktoru při 165 °C po dobu 5 minut. Surový produkt se přečistil přímo použitím variantní HPLC (10%-95% ACN v H₂O: 25 minutový gradient). Čisté frakce se spojily a koncentrovaly, což dalo N-(1-((3,5-dimethylizoxazol-4-yl)methyl)-1H-pyrazol-4-yl)-3,4-dihydroxy-5-methoxybenzamid. (280 mg, 70%). LC/MS; [M+H] vypočteno pro C₁₇H₁₈N₄O₅; očekáváno 359,1; nalezeno 359,1.

[00336] Sloučenina měla IC₅₀ 2,2 μM na hT2R8 receptoru hořkosti.

**Příklad 4-92: N-(1-((3,5-dimethylizoxazol-4-yl)methyl)-1H-pyrazol-4-yl)-7-methoxy-
-benzo[d][1,3]dioxol-5-karboxamid**

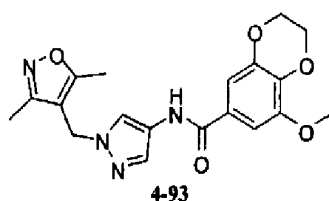


4-92

[00337] N-(1-((3,5-dimethylizoxazol-4-yl)methyl)-1H-pyrazol-4-yl)-3,4-dihydroxy-5-methoxybenzamid (Příklad 73) (50 mg, 0,14 mmol) a uhličitán cesný (113 mg, 2,5 mmol) se rozpustily v 1 ml acetonu, načež následoval přidavek dibrommethanu (239 mg, 1,4 mmol). Reakční směs se umístila do mikrovlnného reaktoru při 120 °C po dobu 20 minut. Z reakční směsi se odstranil čirý roztok a odpařil se za vakua. Surový produkt se rozpustil v 1 ml ethanolu a přečistil se variantní HPLC (10%-95% ACN v H₂O: 25 minutový gradient). Čisté frakce se spojily a koncentrovaly, což dalo N-(1-((3,5-dimethylizoxazol-4-yl)methyl)-1H-pyrazol-4-yl)-2-(7-methoxybenzo[d][1,3]dioxol-5-yl)acetamid. (12 mg, 23%). LC/MS; [M+H] vypočteno pro C₁₈H₁₈N₄O₅; očekáváno 371,1; nalezeno 371,1.

[00338] Sloučenina měla IC₅₀ 0,7 μM na hT2R8 receptoru hořkosti.

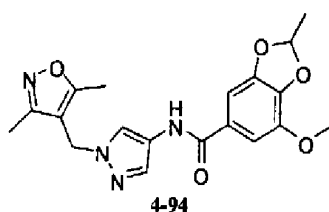
**Příklad 4-93: N-(1-((3,5-dimethylizoxazol-4-yl)methyl)-1H-pyrazol-4-yl)-8-methoxy-2,3-
-dihydrobenzo[b][1,4]dioxin-6-karboxamid**



[00339] Připravený jak v Příkladu 4-92 z N-(1-((3,5-dimethylizoxazol-4-yl)methyl)-1H-pyrazol-4-yl)-3,4-dihydroxy-5-methoxybenzamid (Příklad 4-73), uhličitán cesný a dibromethan. Výtěžek 20%. MS M+H vypočteno 385,1, nalezeno 385,1.

[00340] Sloučenina měla IC_{50} 0,7 μ M na hT2R8 receptoru hořkosti.

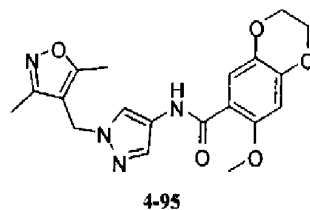
Příklad 4-94: N-(1-((3,5-dimethylizoxazol-4-yl)methyl)-1H-pyrazol-4-yl)-7-methoxy-2-methylbenzo[d][1,3]dioxol-5-karboxamid



[00341] Připravený jak v Příkladu 4-92 z N-(1-((3,5-dimethylizoxazol-4-yl)methyl)-1H-pyrazol-4-yl)-3,4-dihydroxy-5-methoxybenzamid (Příklad 4-73), uhličitán cesný a 1,1-dibromethan. Výtěžek 25 %. MS M+H vypočteno 385,1, nalezeno 385,1.

Sloučenina měla IC_{50} 0,7 μ M na hT2R8 receptoru hořkosti.

Příklad 4-95: N-(1-((3,5-dimethylizoxazol-4-yl)methyl)-1H-pyrazol-4-yl)-7-methoxy-2,3-dihydrobenzo[b][1,4]dioxin-6-karboxamid

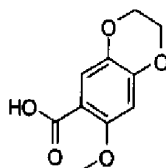


[00342] Připravený jak v Příkladu 4-73 z hydrochloridu 1-((3,5-dimethylizoxazol-4-yl)methyl)-1H-pyrazol-4-aminu (Příklad 4-1a) a kyseliny 7-methoxy-2,3-dihydrobenzo[b][1,4]dioxin-6-karboxylové (Příklad 4-95a). Výtěžek 50 %. MS M+H vypočteno 385,1,

nalezeno 385,1. ^1H NMR (400 MHz, DMSO): 2,136 (s, 3H), 2,410 (s, 3H), 3,851 (s, 3H), 4,214 (bs, 2H), 4,296 (bs, 2H), 5,120 (s, 2H), 6,688 (s, 1H), 7,290 (s, 1H), 7,6006 (s, 1H), 8,069 (s, 1H), 9,856 (s, 1H).

Sloučenina měla IC_{50} 0,7 μM na hT2R8 receptoru hořkosti.

Příklad 4-95a: kyselina 7-methoxy-2,3-dihydrobenzo[b][1,4]dioxin-6-karboxylová



4-95a

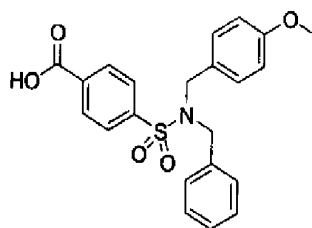
[00343] Methyl-(7-brom-2,3-dihydro-benzo[b][1,4]dioxin-6-karboxylát) (273 mg, 1 mmol) a CuBr (14,3 mg, 0,1 mmol) se rozpustily v suchém DMF ve 2 ml mikrovlnné zkumavce a umístily se do ledové lázně. Methoxid sodný (540 mg, 10 mmol) se přidal po kapkách do reakční směsi za současného míchání při 0 °C. Reakční směs se zahřála na teplotu místnosti a míchala se po dobu 45 minut. Reakční směs se pak umístila do mikrovlnného reaktoru po dobu 5 minut při 135 °C. Reakční směs se zředila vodou a promyla se ethylacetátem. Vodná vrstva se sebrala a okyselila na pH 4 pomocí 1M HCl. Produkt se extrahoval použitím ethylacetátu, pak se vysušil nad síranem sodným. Rozpouštědlo se odpařilo za vakua, což dalo požadovaný meziprodukt kyseliny 7-methoxy-2,3-dihydrobenzo[b][1,4]dioxin-6-karboxylové, jež se použila přímo bez dalšího přečištění. Výtěžek 57 %. MS M+H vypočteno 211,1, nalezeno 211,1.

Příklad 5

hT2R14 Antagonisté: Příprava sloučenin podle vynálezu

[00344] Následující příklady jsou uvedeny pouze pro ilustraci různých příkladných provedení podle vynálezu a nejsou zamýšleny, aby jakkoliv omezovaly.

Příklad 5-1: Kyselina 4-(N-benzyl-N-(4-methoxybenzyl)sulfamoyl)benzoová



5-1

[00345] Benzl-(4-(N-benzyl-N-(4-methoxybenzyl)sulfamoyl)benzoát) (Příklad 5-1a) (517 mg, 1 mmol) se míchal s 10/1/2 roztokem vodného 6N NaOH/THF/MeOH (27 ml) při teplotě okolí po dobu 6 hodin. Roztok se okyselil vodnou 3N HCl na pH ~3 (přibližně 50 ml) a vodná fáze se extrahovala ethylacetátem (3x, 75 ml). Spojené organické extrakty se vysušily nad síranem sodným a koncentrovaly se na rotační odparce. Zbytek se sebral do MeOH (15 ml) a přečistil se pomocí reverzní fázové HPLC (5-95% acetonitril ve H₂O gradientu: 25 minut) ve třech 5 ml podílech. Čisté frakce se spojily a koncentrovaly na bílou pevnou látku. Produkt se rozpustil v 15 ml absolutního ethanolu a odpařil se na rotační odparce (4x), což dalo čistou kyselinu 4-(N-benzyl-N-(4-methoxybenzyl)sulfamoyl)benzoovou (174 mg, 42%) jako bílou pevnou látku. T.t 161-163 °C. ¹H NMR (CDCl₃, 400 MHz): δ 3,78 (s, 3H), 4,32 (s, 2H), 4,36 (s, 2H), 6,78 (d, *J*=8,4 Hz, 2H), 6,99(d, *J*=8,8 Hz, 2H), 7,09-7,07 (m, 2H), 7,27-7,24 (m, 3H), 7,93 (d, *J*=8,8 Hz, 2H), 8,24 (d, *J*=8 Hz, 2H). MS 412 (MH⁺).

[00346] Sloučenina měla IC₅₀ 0,22 μM na hT2R14 receptoru hořkosti.

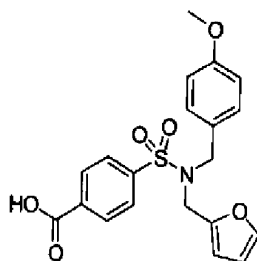
Příklad 5-1a: Benzl-(4-(N-benzyl-N-(4-methoxybenzyl)sulfamoyl)benzoát)

[00347] Kyselina 4-(N-(4-methoxybenzyl)sulfamoyl)benzoová (Příklad 5-1b) (450, mg, 1,4 mmol), benzylbromid (770 mg, 4,5 mmol) a uhličitan cesný (1,5g, 4,5 mmol) v DMF (10 ml) se míchaly při 80 °C po dobu 2 hodin. Roztok se ochladil na teplotu místnosti, zředil se H₂O (200 ml) a extrahoval se ethylacetátem (3x, 100 ml). Spojené organické vrstvy se vysušily nad síranem sodným, zfiltrovaly se a koncentrovaly se za vakua. Zbytek se přečistil chromatografií na silikagelu (10% ethylacetát v hexanech), což dalo benzl-(4-(N-benzyl-N-(4-methoxybenzyl)sulfamoyl)benzoát) (517 mg, 73 %) jako bílou pevnou látku. ¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ 3,76 (s, 3H), 4,28 (s, 2H), 4,32 (s, 2H), 5,40 (s, 2H), 6,79 (d, *J*=8 Hz, 2H), 6,96 (d, *J*=8 Hz, 2H), 7,04-7,07 (m, 2H), 7,21-7,23 (m, 3H), 7,35-7,47 (m, 5H), 7,85 (d, *J*=8 Hz, 2H), 8,17 (d, *J*=8,4 Hz, 2H).

Příklad 5-1b: Kyselina 4-(N-(4-methoxybenzyl)sulfamoyl)benzoová

[00348] Kyselina 4-(chlorsulfonyl)benzoová (5 g, 22,7 mmol) se přidávala ve třech částech jako pevná látka do míchaného roztoku 4-methoxybenzylaminu (6,1 g, 45 mmol) a triethylaminu (2,3 g, 22,7 mmol) v acetonu (100 ml) ochlazeného na 0 °C pomocí ledové lázně po dobu více než 10 minut. Ledová lázeň se odstranila a reakční směs se míchala po dobu dalších 4 hodin. Reakční směs se zředila roztokem 5% kyseliny octové ve H₂O (150 ml) a extrahovala se ethylacetátem (3x, 100 ml). Spojené organické extrakty se vysušily nad síranem sodným, zfiltróvaly se a koncentrovaly se na rotační odparce. Výsledná bílá pevná látka se třela s hexany/ethylacetátem (9/1), což dalo kyselinu 4-(N-(4-methoxybenzyl)sulfamoyl)benzoovou (5,1 g, 70 %) jako bílou pevnou látku. ¹H NMR (400 MHz, DMSO d₆) δ 3,68 (s, 3H), 3,91 (s, 2H), 6,79 (d, *J*=8,4 Hz, 2H), 7,10 (d, *J*=8,8 Hz, 2H), 7,80 (d, *J*=8,8 Hz, 2H), 8,02 (d, *J*=8,4 Hz, 2H).

Příklad 5-2 : Kyselina 4-(N-(furan-2-ylmethyl)-N-(4-methoxybenzyl)sulfamoyl)-benzoová



5-2

[00349] 4-Methoxybenzyl-(4-(N-(furan-2-ylmethyl)-N-(4-methoxybenzyl)sulfamoyl)-benzoát) (Příklad 5-2a) (750 mg, 1,4 mmol) se míchal se směsí 2/2/1 vodného 2N LiOH/THF/MeOH (45 ml) při teplotě okolí po dobu 3 hodin. Roztok se okyselil vodným 1N HCl na pH ~3 (přibližně 100 ml) a extrahoval se ethylacetátem (3x, 100 ml). Spojené organické extrakty se vysušily nad síranem sodným a koncentrovaly se na rotační odparce. Zbytek se sebral do MeOH (9 ml) a přečistil se pomocí reverzní fázové HPLC (5-95% ACN v H₂O gradient: 40 minut) ve třech 3 ml podílech. Čisté frakce se spojily a koncentrovaly se na bílou pevnou látku. Produkt se rozpustil v absolutním ethanolu a odpařil se (4x, 20 ml), což dalo čistou kyselinu 4-(N-(furan-2-ylmethyl)-N-(4-methoxybenzyl)sulfamoyl)benzoovou (205 mg, 36 %) jako bílou pevnou látku. T.t. 151 -152 °C. ¹H NMR (DMSO-d₆, 400 MHz): δ 3,71 (s, 3H), 4,24 (s, 2H), 4,27 (s, 2H), 6,14 (d, 1H, *J*=3,2 Hz), 6,26 (m, 1H), 6,87 (d, 2H,

$J=9,2$ Hz), 7,14 (d, 2H, $J=8,8$ Hz), 7,41 (s, 1H), 7,89 (d, 2H, $J=8$ Hz), 8,06 (d, 2H, $J=8,4$ Hz), 13,48 (bs, 1H). MS 400 (M-H).

[00350] Sloučenina měla IC_{50} 0,59 μ M na hT2R14 receptoru hořkosti.

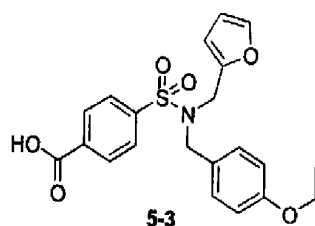
Příklad 5-2a: 4-methoxybenzyl-(4-(N-(furan-2-ylmethyl)-N-(4-methoxybenzyl)-sulfamoyl)benzoát):

[00351] Kyselina 4-(N-(furan-2-ylmethyl)sulfamoyl)benzoová (Příklad 5-2b) (500 mg, 1,8 mmol), p-methoxybenzylchlorid (624 mg, 4,0 mmol) a uhličitán cesný (1,3 g, 4,0 mmol) se rozpustily v DMF (10 ml) a míchaly se při 80 °C po dobu 1 hodiny. Směs se ochladila na teplotu okolí, zředila se H_2O (200 ml) a extrahovala se ethylacetátem (3 x 100 ml). Spojené organické vrstvy se vysušily nad síranem sodným a koncentrovaly se na rotační odparce. Produkt se přečistil chromatografií na silikagelu (15% ethylacetát v hexanech), což dalo 4-methoxybenzyl-(4-(N-(furan-2-ylmethyl)-N-(4-methoxybenzyl)-sulfamoyl)benzoát) (753 mg, 80%) jako čirý olej. ^1H NMR (DMSO- d_6 , 400 MHz): δ 3,70 (s, 3H), 3,75 (s, 3H), 4,22 (s, 2H), 4,26 (s, 2H), 5,39 (s, 2H), 6,14 (d, 1H, $J=3,2$ Hz), 6,25 (m, 1H), 6,87 (d, 2H, $J=8,8$ Hz), 6,97 (d, 2H, $J=8,8$ Hz), 7,13 (d, 2H, $J=8,4$ Hz), 7,39 (m, 1H), 7,43 (d, 2H, $J=8,4$ Hz), 7,91 (d, 2H, $J=8,4$ Hz), 8,07 (d, 2H, $J=8,4$ Hz).

Příklad 5-2b: Kyselina 4-(N-(furan-2-ylmethyl)sulfamoyl)benzoová:

[00352] Kyselina 4-(chlorsulfonyl)benzoová (5,0 g, 22,7 mmol) se přidávala ve třech částech po dobu více než 10 minut do míchaného roztoku furfurylaminu (6,6 g, 68 mmol) v acetonu (200 ml) ochlazeného na 0 °C pomocí ledové lázně. Po přidavku sulfonylchloridu se reakce ukončila, ledová lázeň se odstranila a roztok se míchal po dobu 1 hodiny při teplotě okolí. Směs se koncentrovala a podrobila se chromatografii na silikagelu (90% ethylacetát, 8% hexany a 2% kyselina octová), což dalo 4,4 kyselinu 4-(N-(furan-2-ylmethyl)sulfamoyl)benzoovou (4,4 g, 68%) jako bílou pevnou látku. ^1H NMR (DMSO- d_6 , 400 MHz): δ 4,04 (d, 2H, $J=6$ Hz), 6,13 (d, 1H, $J=3,2$ Hz), 6,25 (m, 1H), 7,43 (m, 1H), 7,83 (d, 2H, $J=8,4$ Hz), 8,05 (d, 2H, $J=8,4$ Hz), 8,36 (t, 1H, $J=6$ Hz), 13,4 (bs, 1H).

Příklad 5-3: Kyselina 4-(N-(4-ethoxybenzyl)-N-(furan-2-ylmethyl)sulfamoyl)benzoová



[00353] 4-Kyano-N-(4-ethoxybenzyl)-N-(furan-2-ylmethyl)benzensulfonamid (Příklad 5-3a) (300 mg, 0,8 mmol) se míchal ve směsi 1/1 dioxanu/1,5 N vodného NaOH (100 ml) při 80 °C po dobu 16 hodin. Směs se ochladila, okyselila 1N vodnou HCl (100 ml) a extrahovala se ethylacetátem (3x, 75 ml). Spojené organické extrakty se vysušily se nad síranem sodným, zfiltrovaly se a koncentrovaly se na rotační odparce. Pevná látka se třela s ethylacetátem/hexany (~1/9) a sebrala se filtrací, což dalo kyselinu 4-(N-(4-ethoxybenzyl)-N-(furan-2-ylmethyl)sulfamoyl)benzoovou (250 mg, 69 %) jako bílou pevnou látku. NMR (DMSO- d_6 , 400 MHz): δ 1,29 (t, $J=6,8$ Hz, 3H), 3,97 (q, $J=6,4$ Hz, 2H), 4,23 (s, 2H), 4,27 (s, 2H), 6,15 (d, $J=3,2$ Hz, 1H), 6,27 (m, 1H), 6,84 (d, $J=8,8$ Hz, 2H), 7,11 (d, $J=8,8$ Hz, 2H), 7,39 (m, 1H), 7,87 (d, $J=8,4$ Hz, 2H), 8,00 (d, $J=8,4$ Hz, 2H).

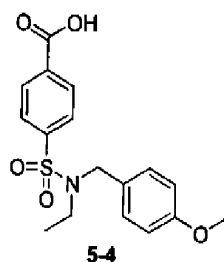
[00354] Sloučenina měla IC_{50} 3,0 μ M na hT2R14 receptoru hořkosti.

Příklad 5-3a : 4-kyano-N-(4-ethoxybenzyl)-N-(furan-2-ylmethyl)benzen-sulfonamid:

[00355] 4-Kyanobenzen-1-sulfonylchlorid (600 mg, 2,9 mmol) se přidal do míchaného roztoku N-(4-ethoxybenzyl)-1-(furan-2-yl)methanaminu (Příklad 5-3b) (685 mg, 2,9 mmol) a triethylaminu (455 mg, 4,5 mmol) v DCM (100 ml) a reakční směs se míchala po dobu 2 hodin. Reakční směs se zředila H_2O (200ml) a extrahovala se DCM (3x, 75 ml). Spojené organické extrakty se vysušily nad síranem sodným, zfiltrovaly se a koncentrovaly se na rotační odparce. Zbytek se přečistil chromatografií na silikagelu (10% ethylacetát v hexanech), což dalo 4-kyano-N-(4-ethoxybenzyl)-N-(furan-2-ylmethyl)benzensulfonamid (665 mg, 68 %) jako ne zcela bílou pevnou látku. NMR (DMSO- d_6 , 400 MHz): δ 1,29 (t, $J=7,2$ Hz, 3H), 3,97 (q, $J=6,8$ Hz, 2H), 4,23 (s, 2H), 4,27 (s, 2H), 6,15 (d, $J=3,2$ Hz, 1H), 6,27 (m, 1H), 6,84 (d, $J=8,8$ Hz, 2H), 7,11 (d, $J=8,8$ Hz, 2H), 7,39 (m, 1H), 7,92 (d, $J=8,4$ Hz, 2H), 8,03(d, $J=8,4$ Hz, 2H).

Příklad 5-3b : 4 N-(4-ethoxybenzyl)-1-(furan-2-yl)methanamin:

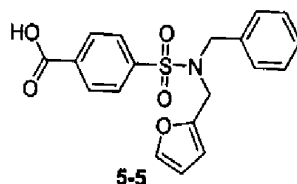
[00356] 4-Ethoxybenzaldehyd (5 g, 33 mmol) a furfurylamin (4,2 g, 43 mmol) ve směsi methanolu (50 ml), trimethylorthoformiát (10 ml) a AcOH (1 ml) se smíchaly při teplotě místnosti pod atmosférou dusíku po dobu 16 hodin. Borhydrid sodný (1,4 g, 35 mmol) se přidával ve 4 dílech po dobu více než 30 minut (exotermická reakce). Reakční směs se míchala po dobu dalších 2 hodin při teplotě místnosti. Rozpouštědlo se odstranilo za vakua a zbytek se sebral do ethylacetátu (150 ml). Organická fáze se promyla H₂O (200 ml) a vodná fáze se zpět extrahovala ethylacetátem (2x, 100 ml). Spojené organické vrstvy se koncentrovaly a zbytek se přečistil na silikagelu (70% ethylacetát v hexanech s ~0,5 % triethylaminem), což dalo N-(4-ethoxybenzyl)-1-(furan-2-yl)methanamin (6,1 g, 80 %) jako čirý olej. NMR (CDCl₃, 400 MHz): δ 1,40 (t, $J=7,2$ Hz, 3H), 3,71 (s, 2H), 3,76 (s, 2H), 4,02 (q, $J=7,2$ Hz, 2H), 6,17 (d, $J=4$ Hz, 1H), 6,31 (m, 1H), 6,84 (d, $J=8,8$ Hz, 2H), 7,23 (d, $J=8,8$ Hz, 2H), 7,36 (m, 1H).

Příklad 5-4: Kyselina 4-(N-ethyl-N-(4-methoxybenzyl)sulfamoyl)benzoová

[00357] Kyselina 4-(N-(4-methoxybenzyl)sulfamoyl)benzoová (Příklad 5-1b) (160 mg, 0,5 mmol) a uhličitán cesný (325 mg, 1 mmol) se umístily do mikrovlnné zkumavky a rozpustily se v 2 ml DMF. Do reakční směsi se přidal ethyljodid (155 mg, 1 mmol). Reakční směs se umístila do mikrovlnného reaktoru a zahřívala se při 165 °C po dobu 5 minut. Reakční směs se rozpustila v ethylacetátu a promyla se vodou. Organická vrstva se vysušila nad síranem sodným a odpařila se za vakua. Surový produkt se rozpustil ve směsi 4/1 vodného roztoku 6N NaOH/tetrahydrofuranu (3 ml) a míchal se při teplotě okolí po dobu 6 hodin. Roztok se okyselil vodnou 3N HCl na pH ~3 a produkt se extrahoval ethylacetátem (3x, 75 ml). Spojené organické extrakty se vysušily nad síranem sodným a koncentrovaly se za vakua. Zbytek se sebral do methanolu (3 ml) a přečistil se pomocí reverzní fázové HPLC (5-95 % acetonitril v H₂O gradient: 25 minut). U sloučeniny bylo známo, že inhibuje hT2R14 s IC₅₀ 20 μM. Výtěžek 35%. MS M+H vypočteno 350,11, nalezeno 350,0.

[00358] Sloučenina měla IC_{50} 10 μ M na hT2R14 receptoru hořkosti.

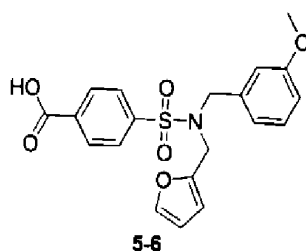
Příklad 5-5: Kyselina 4-(N-benzyl-N-(furan-2-ylmethyl)sulfamoyl)benzoová



[00359] Kyselina 4-(N-(furan-2-ylmethyl)sulfamoyl)benzoová (Příklad 5-2b) (140 mg, 0,5 mmol) a uhličitán cesný (325 mg, 1 mmol) se umístily do mikrovlnné zkumavky a rozpustily se v 2 ml DMF. (Brommethyl)benzen (170 mg, 1 mmol) se přidal do reakční směsi. Reakční směs se umístila do mikrovlnného reaktoru a zahřívala se při 165 °C po dobu 5 minut. Reakční směs se rozpustila v ethylacetátu a promyla se vodou. Organická vrstva se vysušila nad síranem sodným a odpařila se za vakua. Surový produkt se rozpustil ve směsi 4/1 vodného roztoku 6N NaOH/tetrahydrofuran (3 ml) a míchal se při teplotě okolí po dobu 6 hodin. Roztok se okyselil vodnou 3N HCl na pH ~3 a produkt se extrahoval ethylacetátem (3x, 75 ml). Spojené organické extrakty se vysušily nad síranem sodným a koncentrovaly se za vakua. Zbytek se sebral do methanolu (3 ml) a přečistil se pomocí reverzní fázové HPLC (5-95 % acetonitril v H₂O gradient: 25 minut). Výtěžek 35 %. MS M+H vypočteno 372,4, nalezeno 372,0.

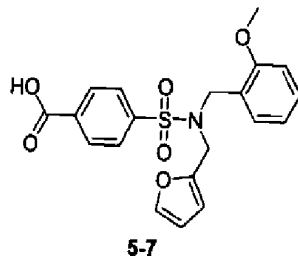
[00360] Sloučenina měla IC_{50} 4,6 μ M na hT2R14 receptoru hořkosti.

Příklad 5-6: Kyselina 4-(N-(furan-2-ylmethyl)-N-(3-methoxybenzyl)sulfamoyl)benzoová



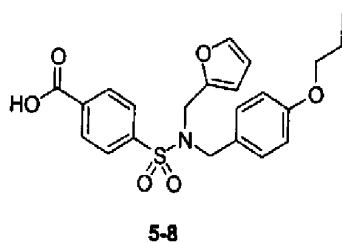
[00361] Připravená jak v Příkladu 5-5 z 1-(brommethyl)-3-methoxybenzenu a kyseliny 4-(N-(furan-2-ylmethyl)sulfamoyl)benzoové (Příklad 5-2b). Výtěžek 35 %. MS M+H vypočteno 402,3, nalezeno 402,0.

[00362] Sloučenina měla IC_{50} 10 μ M na hT2R14 receptoru hořkosti.

Příklad 5-7: Kyselina 4-(N-(furan-2-ylmethyl)-N-(2-methoxybenzyl)sulfamoyl)benzoová

[00363] Připravená jak v Příkladu 5-5 z 1-(brommethyl)-2-methoxybenzenu a kyseliny 4-(N-(furan-2-ylmethyl)sulfamoyl)benzoové (Příklad 5-2b). Výtěžek 35%. MS M+H vypočteno 402,3, nalezeno 402,0.

[00364] Sloučenina měla IC_{50} 12 μ M na hT2R14 receptoru hořkosti.

Příklad 5-8: Kyselina 4-(N-(4-propoxybenzyl)-N-(furan-2-ylmethyl)sulfamoyl)benzoová

[00365] 4-Kyano-N-(4-propoxybenzyl)-N-(furan-2-ylmethyl)benzensulfonamid (Příklad 5--8a) (300 mg, 0,8 mmol) se míchal ve 1/1 směsi dioxanu/1,5 N vodného NaOH (100 ml) při 80 °C po dobu 16 hodin. Směs se ochladila, okyselila 1N vodnou HCl (100 ml) a extrahovala se ethylacetátem (3x, 75 ml). Spojené organické extrakty se vysušily nad síranem sodným, zfiltrovaly se a koncentrovaly se na rotační odparce. Pevná látka se třela s ethylacetátem/hexany (~1/9) a sebrala se filtrací, což dalo kyselinu 4-(N-(4-propoxybenzyl)-N-(furan-2-ylmethyl)sulfamoyl)benzoovou (165 mg, 63 %) jako bílou pevnou látku. NMR (DMSO- d_6 , 400 MHz): δ 0,94 (t, $J=7,6$ Hz, 3H), 1,70 (m, $J=6,8$ Hz, 2H), 3,87 (t, $J=6,4$ Hz, 2H), 4,23 (s, 2H), 4,27 (s, 2H), 6,13 (d, $J=2,8$ Hz, 1H), 6,27 (m, 1H), 6,84 (d, $J=6,8$ Hz, 2H), 7,11 (d, $J=8,8$ Hz, 2H), 7,39 (m, 1H), 7,87 (d, $J=6,8$ Hz, 2H), 8,05 (d, $J=6,8$ Hz, 2H), 13,45 (bs, 1H).

[00366] Sloučenina měla IC_{50} 2,5 μ M na hT2R14 receptoru hořkosti.

Příklad 5-8a : 4-kyano-N-(4-propoxybenzyl)-N-(furan-2-ylmethyl)-benzen-

sulfonamid:

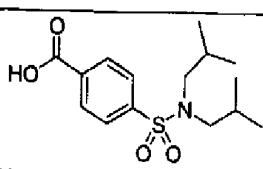
[00367] 4-Kyanobenzen-1-sulfonylchlorid (600 mg, 2,9 mmol) se přidal do míchaného roztoku N-(4-propoxybenzyl)-1-(furan-2-yl)methanaminu (Příklad 5-8b) (685 mg, 2,9 mmol) a triethylaminu (455 mg, 4,5 mmol) v DCM (100 ml) a reakční směs se míchala po dobu 2 hodin. Reakční směs se zředila H₂O (200 ml) a extrahovala se DCM (3x, 75 ml). Spojené organické extrakty se vysušily nad síranem sodným, zfiltrovaly se a koncentrovaly se na rotační odparce. Zbytek se přečistil chromatografií na silikagelu (10% ethylacetátem v hexanech), což dalo 4-kyano-N-(4-propoxybenzyl)-N-(furan-2-ylmethyl)-benzensulfonamid (500 mg, 50 %) jako ne zcela bílou pevnou látku. NMR (DMSO-d₆, 400 MHz): δ 0,95 (t, J=7,2 Hz, 3H), 1,70 (m, J=6,4 Hz, 2H), 3,88 (t, J=6,4 Hz, 2H), 4,25 (s, 2H), 4,28 (s, 2H), 6,15 (d, J=3,2 Hz, 1H), 6,27 (m, 1H), 6,84 (d, J=6,8 Hz, 2H), 7,11 (d, J=8,8 Hz, 2H), 7,39 (m, 1H), 7,93 (d, J=6,4 Hz, 2H), 8,01 (d, J=6,4 Hz, 2H).

Příklad 5-8b : 4 N-(4-propoxybenzyl)-1-(furan-2-yl)methanamin:

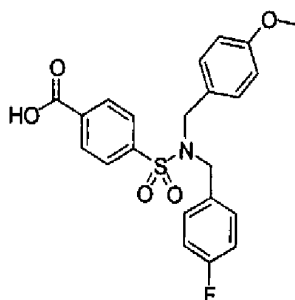
[00368] 4-Propoxybenzaldehyd (5 g, 31 mmol) a furfurylamin (3,9 g, 40 mmol) ve směsi methanolu (50 ml), trimethylorthoformiátu (10 ml) a AcOH (~1 ml) se míchaly při teplotě místnosti pod atmosférou dusíku po dobu 16 hodin. Borhydrid sodný (1,4 g, 35 mmol) se přidával ve 4 dílech po dobu více než 30 minut (exotermická reakce). Reakční směs se míchala po dobu dalších 2 hodin při teplotě místnosti. Rozpouštědlo se odstranilo na rotační odparce a zbytek se sebral do ethylacetátu (150 ml). Organická fáze se promyla H₂O (200 ml) a vodná fáze se zpětně extrahovala ethylacetátem (2x, 100 ml). Spojené organické vrstvy se koncentrovaly a zbytek se přečistil na silikagelu (70 % ethylacetát v hexanech s ~2% triethylaminem), což dalo N-(4-propoxybenzyl)-1-(furan-2-yl)methanamin (5,3 g, 75 %) jako žlutý olej. NMR (CDCl₃, 400 MHz): δ 1,03 (t, J=7,2 Hz, 3H), 1,79 (m, J=6,4 Hz, 2H), 3,71 (s, 2H), 3,76 (s, 2H), 3,90 (t, J=6,8 Hz, 2H), 6,17 (d, J=3,2 Hz, 1H), 6,32 (m, 1H), 6,85 (d, J=8,4 Hz, 2H), 7,22 (d, J=8,8 Hz, 2H), 7,37 (m, 1H).

[00369] Další sloučeniny se testovaly v pokusech a zjistilo se, že mají relativně velkou míru účinnosti jako inhibitory hT2R14 receptoru hořkosti. Výsledky těchto testů jsou ukázány v Tabulce B.

Tabulka B

Sloučenina č.	Sloučenina	hT2R14 IC ₅₀ (μM)
5-9	 4-(N,N-diizobutylsulfamoyl)benzoová	15

Příklad 5-10: Kyselina 4-(N-(4-fluorbenzyl)-N-(4-methoxybenzyl)sulfamoyl)benzoová



[00370] Methyl-(4-(N-(4-fluorbenzyl)-N-(4-methoxybenzyl)sulfamoyl)benzoát) (Příklad 5-10a) (3,7 g, 8,3 mmol) se rozpustil v MeOH/THF (1:1,5, 30 ml) a nechal reagovat s vodným NaOH (3 N, 15 ml). Směs se míchala při teplotě okolí přes noc, pak se ve *vakuu* odstranily MeOH a THF. Výsledný vodný roztok se okyselil vodnou 6 N HCl na pH ~3 a extrahoval se EtOAc (3 x 40 ml). Spojené organické vrstvy se promyly se vodou a solankou, vysušily se nad Na₂SO₄ a koncentrovaly se. Surový produkt se přečistil překrystalováním z EtOH, což dalo čistou kyselinu 4-(N-(4-fluorbenzyl)-N-(4-methoxybenzyl)-sulfamoyl)benzoovou jako bílou krystalickou pevnou látku (2,1 g, 58,6%). MS (M-H, 428,1); ¹H NMR (400MHz, DMSO-d₆): δ, ppm: 3,66 (s, 3H), 4,23 (s, 2H), 4,26 (s, 2H), 6,72 (d, 2H, J=8 Hz), 6,95 (m, 6H), 7,92 (d, 2H J=8 Hz), 8,07(d, 2H, J=8 Hz). Sloučenina měla IC₅₀ 1,97 μM na hT2R14 receptoru hořkosti.

Příklad 5-10a: Methyl-(4-(N-(4-fluorbenzyl)-N-(4-methoxybenzyl)-sulfamoyl)-benzoát)

[00371] Methyl-(4-(N-(4-methoxybenzyl)sulfamoyl)benzoát) (Příklad 5-10b) (4,3 g, 12,8 mmol) se rozpustil v acetonu (70 ml). Přidal se uhličitán cesný (8,57g, 25,6 mmol) a (4-fluorbenzyl)bromid (1,76 ml, 14,08 mmol) a směs se míchala při teplotě místnosti přes noc. Anorganické soli se odfiltrovaly a aceton se odstranil *ve vakuu*. Zbytek se znovu rozpustil v ethylacetátu, promylu se vodou a solankou, pak se organická vrstva vysušila nad síranem hořečnatým a koncentrovala se. Surový produkt se přečistil překrystalováním s ethylacetátem/hexany, což dalo čistý methyl-(4-(N-(4-fluorbenzyl)-N-(4-methoxybenzyl)-sulfamoyl)benzoát (3,7 g, 65 %) jako bílou pevnou látku. ¹H NMR (400MHz, CDCl₃): δ, ppm: 3,77 (s, 3H), 3,98 (s, 3H), 4,27 (s, 2H), 4,28(s, 2H), 6,74 (d, 2H, J=8 Hz), 6,92 (m, 4H), 7,03(m, 2H), 7,88 (d, 2H J=8 Hz), 8,16(d, 2H, J=8 Hz).

Příklad 5-10b: Methyl-(4-(N-(4-methoxybenzyl)sulfamoyl)benzoát).

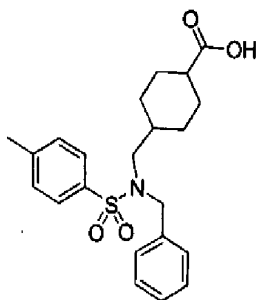
[00372] Do roztoku methyl-(4-(chlorsulfonyl)benzoátu) (Příklad 5-10c) (4 g, 17,09 mmol) v dichlormethanu (40 ml) při 0 °C v ledové lázni se přidal (4-methoxyfenyl)methanamin (2,56 ml, 19,65 mmol) a triethylamin (2,38 ml, 17,1 mmol). Ledová lázeň se pak odstranila a směs se ponechala ohřát na teplotu okolí za současného míchání po dobu dalších 2 hodin. Po dokončení (monitorováno pomocí TLC 40 % ethylacetát/hexany) se *ve vakuu* odstranilo rozpouštědlo. Zbytek se znovu rozpustil v ethylacetátu (200 ml), promyl se vodnou 1N HCl (20 ml), vodou (20 ml) a solankou (20 ml), pak se vysušil nad síranem hořečnatým. Roztok se koncentroval a produkt se přečistil pomocí překrystalování s horkým ethylacetátem/hexanech, což dalo čistý methyl-(4-(N-(4-methoxybenzyl)sulfamoyl)benzoát) (4,3 g, 74,8 %) jako bílou pevnou látku. ¹H NMR (400MHz, DMSO-d₆): δ, ppm: 3,67 (s, 3H), 3,78 (s, 3H), 3,93 (s, 2H), 6,78 (m, 2H), 7,09 (m, 2H), 7,87(m, 2H), 8,08 (m, 2H), 8,25(br, s, 1H).

Příklad 5-10c: Methyl-(4-(chlorsulfonyl)benzoát)

[00373] Kyselina 4-chlorsulfonylbenzoová (5 g, 23 mmol) a thionylchlorid (20 ml) v dichlorethanu (10 ml) se zahřívaly na 80 °C po dobu 2 hodin. Reakční směs se koncentrovala pomocí rotační odparky, což dalo nahnědlou pevnou látku. Tato pevná látka se chladila na ledu po dobu 5 minut a za stálého míchání se přidával ledově studený methanol (40 ml) při 0 °C po dobu 5 minut. Reakční směs se ponechala ohřát na teplotu okolí a míchala se dalších 10 min. Přídavek ledové vody (40 ml) dal vzniku bílé pevné látky, která se odfiltrovala a

vysušila se za vakua, což dalo čistý methyl-(4-(chlorsulfonyl)benzoát) (4,5 g, 84 %). ^1H NMR (400MHz, DMSO- d_6): δ , ppm: 3,84 (s, 3H), 7,70 (d, 2H, $J=8,4\text{Hz}$), 7,93 (d, 2H, $J=8,4\text{Hz}$).

Příklad 5-11: Kyselina 4-((N-benzyl-4-methylfenylsulfonamido)methyl)cyklohexan-
karboxylová



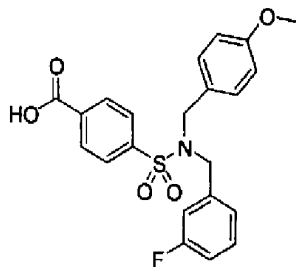
[00374] Do suspenze kyseliny 4-(aminomethyl)cyklohexankarboxylové (1,57 g, 10 mmol) v 100 ml 2,2-dimethoxypropanu se přidala HCl (10 ml, 36% vodný roztok). Směs se míchala při teplotě okolí po dobu 18 hod. a pak se koncentrovala. Zbytek se rozpustil v minimálním objemu MeOH a přidal se diethylether, aby se vysrážela HCl sůl methyl-(4-(aminomethyl)-cyklohexankarboxylátu) jako ne zcela bílá pevná látka. Tento materiál se použil bez dalšího přečištění nebo charakterizace.

[00375] Do směsi HCl soli methyl-(4-(aminomethyl)cyklohexankarboxylátu) (208 mg, 1 mmol) v 5 ml dichlormethanu při 0 °C v ledové lázni se přidal triethylamin (360 μl , 2,58 mmol) a 4-methylbenzen-1-sulfonylchlorid (190 mg, 1 mmol). Ledová lázeň se ponechala pomalu ohřívat přes noc na teplotu okolí za stálého míchání. Rozpouštědlo se odstranilo *ve vakuu*. Zbytek se znovu rozpustil v ethylacetátu (20 ml), promyl se 1N HCl (5 ml), vodou (5 ml) a solankou (5 ml), pak se vysušil nad síranem hořečnatým a koncentroval se. Tento surový produkt (162mg, 0,5mmol) ze znovu rozpustil v acetonu (5ml) a ponechal se reagovat s uhličitanem draselným (110 mg, 0,79 mmol) a (4-fluorfenyl)methanaminem (1,76 ml, 14,08 mmol). Směs se míchala v tlakové nádobě při 80 °C přes noc, pak se ochladila a anorganická sůl se odfiltrovala. Aceton se odstranil *ve vakuu* a zbytek se znovu rozpustil v ethylacetátu a promylu se vodou a následně solankou. Organická vrstva se vysušila nad síranem hořečnatým a koncentrovala se. Surový produkt (162 mg, 0,4 mmol) se rozpustil v MeOH/THF (1:1,5, 10 ml) a ponechal se reagovat s vodným NaOH (10N, 400 μl). Směs se míchala při 100 °C po dobu 20 min. v mikrovlnné

troubě a pak se *ve vakuu* odstranily MeOH a THF. Zbytek se okyselil 6 N vodnou HCl na pH ~3 a extrahoval se EtOAc; spojené organické vrstvy se promyly vodou a solankou, vysušily se nad Na₂SO₄ a koncentrovaly se. Surový produkt se přečistil překrystalováním z EtOH, což dalo čistou kyselinu 4-((N-benzyl-4-methylfenyl-sulfonamido)methyl)cyklohexan-karboxylovou jako bílou pevnou látku (120 mg, 74%). MS (M+H, 402); ¹H NMR (400MHz, DMSO-d₆): δ, ppm: 0,68 (m, 2H), 0,91 (m, 2H), 1,06 (br, s, 1H), 1,50 (d, 2H), 1,72(d, 2H), 2,0(1H), 2,41 (s, 3H), 2,86 (m, 2H), 4,21(s, 2H), 7,30(m, 5H), 7,43(m, 2H), 7,73(m, 2H), 11,97(br, s, 1H).

[00376] Sloučenina měla IC₅₀ 0,014 μM na hT2R14 receptoru hořkosti.

Příklad 5-12: Kyselina 4-(N-(3-fluorbenzyl)-N-(4-methoxybenzyl)sulfamoyl)benzoová



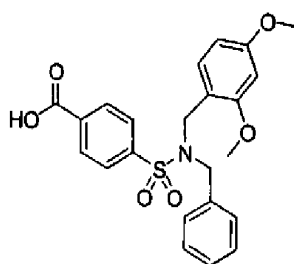
[00377] Methyl-4-(N-(4-methoxybenzyl)sulfamoyl)benzoát (Příklad 5-10b) (500 mg, 1,49 mmol), 3-fluorbenzylbromid (280 mg, 2,98 mmol) a uhličitan cesný (971 mg, 2,98 mmol) se daly do DMF (12 ml) a míchaly se při 90 °C po dobu 4 hodin. Roztok, ochlazený na teplotu okolí, se zředil H₂O (200 ml) a extrahoval se ethylacetátem (3x, 100 ml). Spojené organické vrstvy se vysušily nad MgSO₄, zfiltrovaly se a koncentrovaly se za vakua. Zbytek se přečistil chromatografií na silikagelu (10-20 % ethylacetát v hexanu), což dalo methyl-4-(N-(3-fluorbenzyl)-N-(4-methoxybenzyl)sulfamoyl)benzoát (528 mg, 80 %) jako bílou pevnou látku.

[00378] Methyl-4-(N-(3-fluorbenzyl)-N-(4-methoxybenzyl)sulfamoyl)benzoát (500 mg, 1,12 mmol) se rozpustil v MeOH/THF (1:1, 40 ml) a nechal se působit vodný roztok NaOH (10 N, 8 ml). Směs se míchala při teplotě okolí přes noc, pak se pomocí rotační odparky odstranily MeOH a THF. Výsledný vodný roztok se promylu EtOAc (10 ml) a okyselil se vodnou 6 N HCl (~15 ml) na pH ~4. Vodný roztok se extrahoval EtOAc (3x, 40 ml) a spojené organické vrstvy se promyly, solankou, vysušily se nad MgSO₄ a koncentrovaly se. Surový produkt se přečistil překrystalováním z EtOH, což dalo titulní sloučeninu kyselinu 4-(N-(3-

-fluorbenzyl)-N-(4-methoxybenzyl)sulfamoyl)benzoovou jako bílou krystalickou pevnou látku (150 mg) v 30% výtěžku.

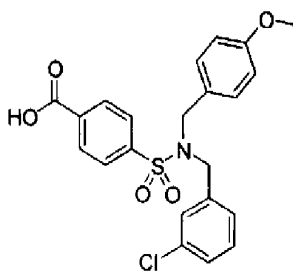
[00379] MS (M-H, 428.1); ¹H NMR (400MHz, DMSO-d₆): δ, ppm: 3,65 (s, 3H), 4,27 (s, 2H), 4,29 (s, 2H), 6,75-7,00 (m, 7H), 7,20 (m, 1H), 7,95 (d, 2H, J = 8 Hz); 8,10 (d, 2H, J = 8 Hz).

Příklad 5-13: Kyselina 4-(N-benzyl-N-(2,4-dimethoxybenzyl)sulfamoyl)benzoová



[00380] Připravená jak v Příkladu 5-10 z (2,4-dimethoxyfenyl)methanaminu, methyl-(4-(chlorosulfonyl)benzoátu) (Příklad 5-10c) a benzylbromidu. MS (M - H, 440,10); ¹H NMR (400MHz, DMSO-d₆): δ, ppm: 3,50(s, 63H), 3,66(s, 3H), 4,20(s, 2H), 4,34(s, 2H), 6,29(s, 1H), 6,33(d, J=8,0Hz, 1H), 6,91(d, J=8,8Hz, 1H), 7,12-7,23 (m, 5H), 7,80(d, J = 8,0 Hz, 2H), 8,01 (d, J=8,4Hz, 2H), 13,49(s, 1H).

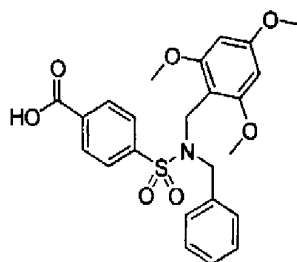
Příklad 5-14: Kyselina 4-(N-(3-chlorbenzyl)-N-(4-methoxybenzyl)sulfamoyl)benzoová



[00381] Připravená jak v Příkladu 5-10 z methyl-(4-(N-(4-methoxy-benzyl)sulfamoyl)-benzoátu) (Příklad 5-10b) a 1-(brommethyl)-3-chlorbenzenu. MS (M-H, 444,1); ¹H NMR (400MHz, DMSO-d₆): δ, ppm: 3,69 (s, 3H), 4,30 (m, 4H), 6,76-7,24 (m, 8H), 7,99 (m, 2H), 8,13 (m, 2H).

[00382] Sloučenina měla IC_{50} 1,88 μ M na hT2R14 receptoru hořkosti.

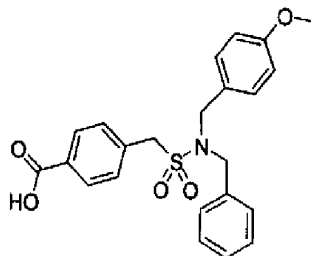
Příklad 5-15: Kyselina 4-(N-benzyl-N-(2,4,6-trimethoxybenzyl)sulfamoyl)benzoová



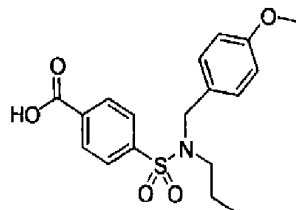
[00383] Připravená jak v Příkladu 5-10 z (2,4,6-trimethoxyfenyl)-methanaminu, methyl-(4-(chlorsulfonyl)benzoátu) (Příklad 5-10c) a benzylbromidu. MS (M - H, 470,10); ^1H NMR (400MHz, DMSO- d_6): δ , ppm: 3,45(s, 6H), 3,69(s, 3H), 4,26(s, 2H), 4,28(s, 2H), 5,98(s, 2H), 7,11-7,26(m, 5H), 7,82(d, $J=8,0\text{Hz}$, 2H), 8,07(d, $J = 8\text{ Hz}$, 2H), 13,49(s, 1H), Elementární analýza (nalezeno, %): C 61,05; H 5,49; N 2,98; (vypočteno, %): C61,13; H 5,34 a N 2,97

[00384] Sloučenina měla IC_{50} 10,76 μ M na hT2R14 receptoru hořkosti.

Příklad 5-16: Kyselina 4-((N-benzyl-N-(4-methoxybenzyl)sulfamoyl)methyl)benzoová

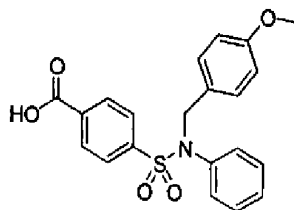


[00385] Připravená jak v Příkladu 5-10 z methyl-(4-(N-(4-methoxybenzyl)sulfamoyl)-benzoát) (Příklad 5-10b) a benzylbromid. MS (M-H, 424,1); ^1H NMR (400MHz, DMSO- d_6): δ , ppm: 3,72 (s, 3H), 4,18 (d, 2H), 4,55 (s, 2H), 6,83 (m, 2H), 7,12 (m, 2H), 7,21 (m, 2H), 7,28 (m, 3H), 7,43 (m, 2H), 7,93 (m, 2H).

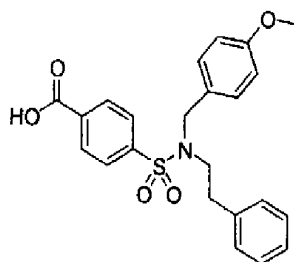
Příklad 5-17: Kyselina 4-(N-(4-methoxybenzyl)-N-propylsulfamoyl)benzoová

[00386] Připravená jak v Příkladu 5-10 z methyl-(4-(N-(4-methoxybenzyl)sulfamoyl)-benzoátu) (Příklad 5-10b) a *n*-propylbromidu. MS (M-H, 362,1); ¹H NMR (400MHz, CDCl₃): δ, ppm: 0,70 (m, 3H), 1,35 (m, 3H), 3,08 (m, 2H), 3,73 (s, 3H), 4,31 (s, 2H), 6,83 (m, 2H), 7,17 (m, 2H), 7,93 (m, 2H), 8,23 (m, 2H).

[00387] Sloučenina měla IC₅₀ 3,75 μM na hT2R14 receptoru hořkosti.

Příklad 5-18: Kyselina 4-(N-(4-methoxybenzyl)-N-fenylsulfamoyl)benzoová

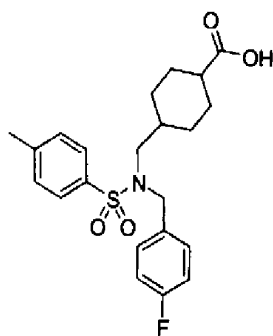
[00388] Připravená jak v Příkladu 5-10 z anilinu, methyl-(4-(chlorsulfonyl)benzoátu) (Příklad 5-10c) a 1-(chlormethyl)-4-methoxybenzenu. MS (M - H, 396,1); ¹H NMR (400MHz, DMSO-d₆): δ, ppm: 3,66(s, 3H), 4,73(s, 2H), 6,78(d, J=8,4Hz, 2H), 7,00(d, J=7,6Hz, 2H), 7,12(d, J=8,0Hz, 2H), 7,24(d, J=8,0Hz, 2H), 8,11(d, J=8,4Hz, 2H), 13,49(s, 1H).

Příklad 5-19: Kyselina 4-(N-(4-methoxybenzyl)-N-fenethylsulfamoyl)benzoová

[00389] Připravená jak v Příkladu 5-10 z 2-fenylethanaminu, methyl-(4-(chlor-sulfonyl)benzoátu) (Příklad 5-10c) a 1-(chlormethyl)-4-methoxybenzenu. MS (M-H, 424,1); ¹H NMR (400MHz, DMSO-d₆): δ, ppm: 2,51 (m, 2H), 3,23 (m, 2H), 3,74 (s, 3H), 4,31 (s, 2H), 4,31 (s, 2H), 6,92 (m, 2H), 6,98 (m, 2H), 7,20-7,27 (m, 5H), 7,85 (m, 2H), 8,06 (m, 2H).

[00390] Sloučenina měla IC₅₀ 4,58 μM na hT2R14 receptoru hořkosti.

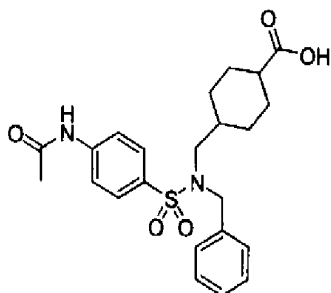
Příklad 5-20: Kyselina 4-((N-(4-fluorbenzyl)-4-methylfenylsulfonamido)methyl)cyklohexankarboxylová



[00391] Připravená jak v Příkladu 5-11 z 1-(brommethyl)-4-fluorbenzenu, kyseliny 4-(aminomethyl)cyklohexankarboxylové a 4-methylbenzen-1-sulfonylchloridu. MS (M+H, 420); ¹H NMR (400MHz, DMSO-d₆): δ, ppm: 0,71 (m, 2H), 0,95 (m, 2H), 1,15 (br, s, 1H), 1,51 (d, 2H), 1,76(d, 2H), 2,0(1H), 2,40 (s, 3H), 2,85 (m, 2H), 4,22(s, 2H), 7,14(m, 2H), 7,32(m, 2H), 7,40(m, 2H), 7,69(m, 2H), 11,93(br, s, 1H).

[00392] Sloučenina měla IC₅₀ 0,083 μM na hT2R14 receptoru hořkosti.

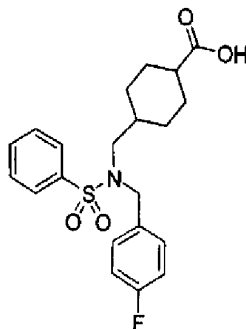
Příklad 5-21: Kyselina 4-((4-acetamido-N-benzylfenylsulfonamido)methyl)-cyklohexankarboxylová



[00393] Připravená jak v Příkladu 5-11 z acetamidobenzen-1-sulfonylchloridu, kyseliny 4-(aminomethyl)cyklohexankarboxylové a benzylbromidu. MS (M+H, 445,2); ¹H NMR (400MHz, DMSO-d₆): δ, ppm: 0,65 (m, 2H), 0,68 (m, 2H), 1,05 (m, 1H), 1,48 (m, 2H), 1,70 (m, 2H), 1,92 (m, 1H), 2,00 (s, 3H), 2,82 (s, 2H), 4,21 (s, 2H), 7,27 (m, 5H), 7,76(m, 4H), 7,62(m, 2H), 10,1(s, 1H), 11,93(br, s, 1H).

[00394] Sloučenina měla IC₅₀ 1,619 μM na hT2R14 receptoru hořkosti.

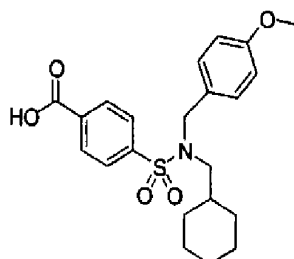
Příklad 5-22: Kyselina 4-((N-(4-fluorbenzyl)fenylsulfonamido)methyl)cyklohexankarboxylová



[00395] Připravená jak v Příkladu 5-11 z benzensulfonylchloridu, kyseliny 4-(aminomethyl)cyklohexankarboxylové a 1-(brommethyl)-4-fluorbenzenu. MS (M+H, 406); ¹H NMR (400MHz, DMSO-d₆): δ, ppm: 0,77 (m, 2H), 0,94 (m, 2H), 0,98 (m, 2H), 1,50 (m, 2H), 1,75 (m, 2H), 1,77 (m, 1H), 2,80 (d, 2H), 4,28 (s, 2H), 7,20 (m, 2H), 7,38(m, 2H), 7,62(m, 2H), 7,70(m, 1H), 7,88(m, 2H), 11,93(br, s, 1H).

[00396] Sloučenina měla IC_{50} 0,240 μ M na hT2R14 receptoru hořkosti.

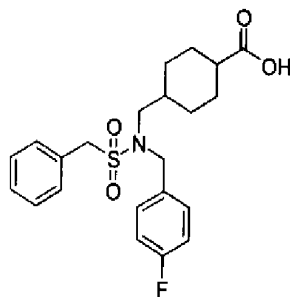
Příklad 5-23: Kyselina 4-(N-(cyklohexylmethyl)-N-(4-methoxybenzyl)sulfamoyl)-benzoová



[00397] Připravená jak v Příkladu 5-10 z methyl-(4-(N-(4-methoxybenzyl)sulfamoyl)-benzoátu) (Příklad 5-10b) a cyklohexylmethanaminu. MS (M-H, 416,1); ^1H NMR (400MHz, DMSO- d_6): δ , ppm: 0,63 (m, 2H), 0,87 (m, 3H), 0,94 (m, 1H), 1,25-1,52 (m, 5H), 1,70 (m, 2H), 2,86 (m, 2H), 3,70 (s, 3H), 4,22 (s, 2H), 6,84 (m, 2H), 7,16 (m, 2H), 7,91 (m, 2H), 7,62 (m, 2H), 8,09 (m, 2H).

[00398] Sloučenina měla IC_{50} 3,47 μ M na hT2R14 receptoru hořkosti.

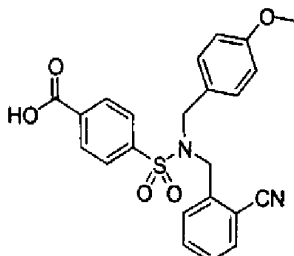
Příklad 5-24: Kyselina 4-((N-(4-fluorbenzyl)-1-fenylmethylsulfonamido)methyl)cyklohexankarboxylová



[00399] Připravená jak v Příkladu 5-10 z fenylmethanesulfonylchloridu a methyl-(4-(aminomethyl)cyklohexankarboxylátu) a 1-(brommethyl)-4-fluor-benzenu. MS(M-H, 418); ^1H NMR (400MHz, DMSO- d_6): δ , ppm: 0,639 (m, 2H), 0,897 (m, 2H), 1,034 (m, 1H), 1,467 (d, široký, 2H, $J=11,2$ Hz), 1,709 (d, široký, 2H, $J=11,2$ Hz), 1,961 (m, 1H), 2,828 (d, 2H, $J=7,6$ Hz), 4,207 (s, 2H), 4,449 (s, 2H), 7,155 (t, 2H, $J=9,2$ Hz), 7,377 (m, 7H), 12 (s, široký, 1H)

[00400] Sloučenina měla IC_{50} 9,57 μ M na hT2R14 receptoru hořkosti.

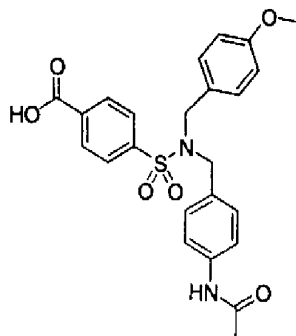
Příklad 5-25: Kyselina 4-(N-(2-kyanobenzyl)-N-(4-methoxybenzyl)sulfamoyl) benzoová



[00401] Připravená jak v Příkladu 5-10 z methyl-(4-(N-(4-methoxybenzyl)-sulfamoyl)-benzoátu) (Příklad 5-10b) a α -brom-*o*-tolunitrilu. MS(M-H, 435,1); ^1H NMR (400MHz, DMSO- d_6): δ , ppm: 3,664 (s, 2H), 4,348 (s, 2H), 4,498 (s, 2H), 6,728 (d, 2H, $J=8,4$ Hz), 7,036 (d, 2H, $J=8,4$ Hz), 7,352 (t, 2H, $J=9,2$ Hz), 7,548 (t, 1H, $J=7,6$ Hz), 7,640 (d, 1H, $J=7,6$ Hz), 8,003 (d, 2H, $J=8$ Hz), 8,139 (d, 2H, $J=8,4$ Hz), 13,559 (s, široký, 1H).

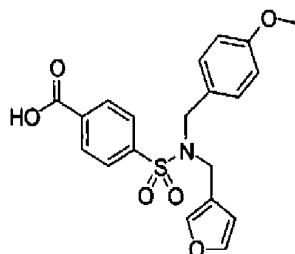
[00402] Sloučenina měla IC_{50} 4,61 μ M na hT2R14 receptoru hořkosti.

Příklad 5-26: Kyselina 4-(N-(4-acetamidobenzyl)-N-(4-methoxybenzyl)sulfamoyl)-benzoová



[00403] Připravená jak v Příkladu 5-10 z methyl-(4-(N-(4-methoxy-benzyl)sulfamoyl)-benzoátu) (Příklad 5-10b) a N-(4-(chlormethyl)fenyl-)acetamidu. MS (M-H, 467,1); ^1H NMR (400MHz, DMSO- d_6): δ , ppm: 2,0(s, 3H), 3,69s, 3H), 4,23(s, 4H), 6,78(d, 2H, $J=7,6$ Hz), 6,98(m, 4H), 7,41(d, 2H, $J=8$ Hz), 7,94(d, 2H, $J=8$ Hz), 8,09(d, 2H, $J=8$ Hz), 9,90(s, 1H).

Příklad 5-27: Kyselina 4-(N-(furan-3-ylmethyl)-N-(4-methoxybenzyl)sulfamoyl)-benzoová

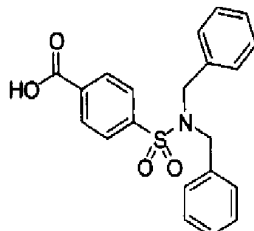


[00404] 110 mg 1-(furan-3-yl)-N-(4-methoxybenzyl)methanaminu (Příklad 5-27a) se smíchalo s methyl-(4-(chlorsulfonyl)benzoátem) (Příklad 5-10c) (117 mg, 0,5 mmol) a triethylaminem (100 μ l) v DCM (5 ml). Směs se míchala přes noc při teplotě okolí a koncentrovala se. Zbytek se znovu rozpustil v ethylacetátu (20 ml), promyl se 1N HCl (vodnou, 2 ml), následována vodou (5 ml) a solankou (5 ml), pak se vysušila nad síranem hořečnatým. Surový produkt se přečistil preparativní TLC (40 % ethylacetát/hexany), což dalo methyl-(4-(N-(furan-3-ylmethyl)-N-(4-methoxybenzyl)sulfamoyl)benzoát) jako bílou pevnou látku. Saponifikace jako v Příkladu 5-10 dala kyselinu 4-(N-(furan-3-ylmethyl)-N-(4-methoxybenzyl)sulfamoyl)benzoovou jako bílou krystalickou pevnou látku (68 mg, 64% výtěžek). MS (M-H, 400,1); ^1H NMR (400MHz, DMSO- d_6): δ , ppm: 3,72(s, 3H), 4,13(s, 2H), 4,26(s, 2H), 5,99 (s, 1H), 6,87 (m, 4H), 6,87 (d, 2H, J=8,8Hz), 7,13 (d, 2H, J=8,8Hz), 7,39 (s, 1H), 7,49 (s, 1H), 7,95 (d, 2H, J=8,4Hz), 8,09 (d, 2H, J=8,8Hz).

Příklad 5-27a: 1-(furan-3-yl)-N-(4-methoxybenzyl)methanamin

[00405] Směs 3-furaldehydu (5 mmol, 437 μ l) a (4-methoxyfenyl)methan-aminu v MeOH (20 ml) se míchala při teplotě okolí přes noc, pak se pomalu přidával borhydrid sodný (300 mg, 7,89 mmol). Výsledná směs se míchala při teplotě místnosti po dobu 15 minut a ukončila pomocí NaOH (1 N, vodný). Methanol se odstranil *ve vakuu* a výsledná suspenze se znovu rozpustila v ethylacetátu, pak se promyla se vodou, solankou, vysušila se nad síranem sodným a koncentrovala se. Přečištění chromatografií na silikagelu (ethylacetát: hexany 7:3) dalo 1-(furan-3-yl)-N-(4-methoxybenzyl)methanamin jako olej. MS (M+H, 218,10); ^1H NMR (400MHz, CDCl_3): δ , ppm: 3,64(s, 2H), 3,74(s, 2H), 3,80(s, 3H), 6,39(m, 1H), 6,86(m, 1H), 6,88(m, 1H), 7,23(m, 1H), 7,25(m, 1H), 7,35(m, 1H), 7,38(m, 1H).

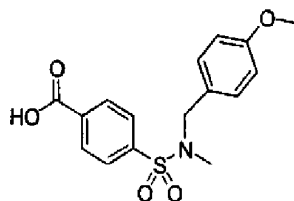
Příklad 5-28: Kyselina 4-(N,N-dibenzylsulfamoyl)benzoová



[00406] Připravená jak v Příkladu 5-27 z dibenzylaminu a methyl-(4-(chlorsulfonyl)-benzoátu) (Příklad 5-10c). MS (M-H, 380,1); ¹H NMR (400MHz, DMSO-d₆): δ, ppm: 4,52 (s, 4H), 7,10 (m, 4H), 7,25 (m, 6H), 8,00 (d, 2H, J=8,4 Hz), 8,15 (d, 2H J=8,4 Hz), 13,5 (s, široký, 1H).

[00407] Sloučenina měla IC₅₀ 7,74 μM na hT2R14 receptoru hořkosti.

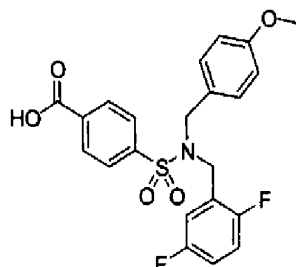
Příklad 5-29: Kyselina 4-(N-(4-methoxybenzyl)-N-methylsulfamoyl)benzoová



[00408] Připravená jak v Příkladu 5-27 z 1-(4-methoxyfenyl)-N-methyl-methanaminu a methyl-(4-(chlorsulfonyl)benzoátu) (Příklad 5-10c). MS (M-H, 335,1); ¹H NMR (400MHz, DMSO-d₆): δ, ppm: 2,51 (s, 3H), 3,71 (s, 3H), 4,05 (s, 2H), 6,88 (d, 2H), 7,18 (d, 2H), 7,91 (d, 2H); 8,13 (d, 2H). Elementární analýza: (nalezeno): C 57,47%, H 4,77% a N 4,31%; (theoretical): C 57,30%, H 5,11% a N 4,18%

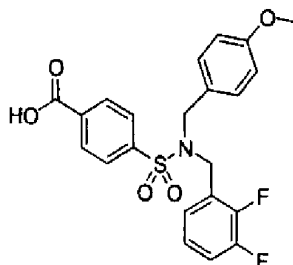
141

Příklad 5-32: Kyselina 4-(N-(2,5-difluorbenzyl)-N-(4-methoxybenzyl)sulfamoyl)-benzoová



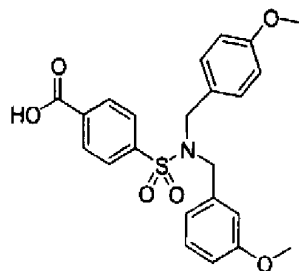
[00412] Připravená jak v Příkladu 5-10 z methyl-(4-(N-(4-methoxybenzyl)-sulfamoyl)benzoátu) (Příklad 5-10b) a 2-(brommethyl)-1,4-difluorbenzenu. ¹H NMR (400MHz, DMSO-d₆): δ, ppm: 3,66 (s, 3H), 4,31 (s, 2H), 4,33 (s, 2H), 6,74-7,06 (m, 7H), 7,95 (d, 2H, J=8 Hz), 8,09 (d, 2H, J=8Hz).

Příklad 5-33: Kyselina 4-(N-(2,3-difluorbenzyl)-N-(4-methoxybenzyl)sulfamoyl)-benzoová



[00413] Připravená jak v Příkladu 5-10 z methyl-(4-(N-(4-methoxybenzyl)-sulfamoyl)-benzoátu) (Příklad 5-10b) a 1-(brommethyl)-2,3-difluorbenzenu. ¹H NMR (400MHz, DMSO-d₆): δ, ppm: 3,30 (s, 3H), 4,29 (s, 2H), 4,32(s, 2H), , 6,87 (d, 2H, J=8Hz), 7,02-7,20 (m, 5H), 7,95 (d, 2H, J=8Hz), 8,05 (d, 2H, J=8Hz).

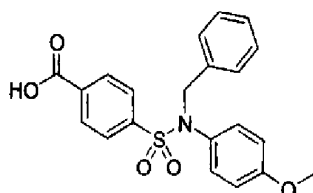
Příklad 5-34: Kyselina 4-(N-(3-methoxybenzyl)-N-(4-methoxybenzyl)sulfamoyl)-benzoová



[00414] Připravená jak v Příkladu 5-10 z methyl-(4-(N-(4-methoxybenzyl)sulfamoyl)-benzoátu (Příklad 5-10b) a 3-methoxybenzylbromidu. MS (M - H, 440,50); ¹H NMR (400MHz, DMSO-d₆): δ, ppm: 3,58(s, 3H), 3,68(s, 3H), 4,24(s, 2H), 4,25(s, 2H), 6,50(s, 1H), 6,64(d, J = 4 Hz, 1H), 6,73(m, 1H), 6,77(d, J = 8 Hz, 2H), 7,00(d, J = 8 Hz, 2H), 7,12(t, J=8 Hz, 1H), 7,94(d, J=8 Hz, 2H), 8,09(d, J=8 Hz, 2H), 13,49(s, 1H).

[00415] Sloučenina měla IC₅₀ 2,46 μM na hT2R14 receptoru hořkosti.

Příklad 5-35: Kyselina 4-(N-benzyl-N-(4-methoxyfenyl)sulfamoyl)benzoová



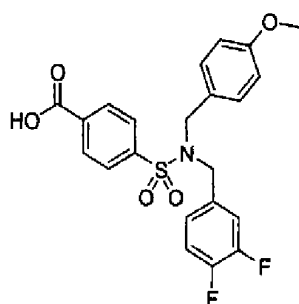
[00416] Připravený jak v Příkladu 5-10 z methyl-(4-(N-(4-methoxyfenyl)-sulfamoyl)-benzoátu (Příklad 5-35a) a benzylbromidu MS (M - H, 396); ¹H NMR (400MHz, DMSO-d₆): δ, ppm: 3,66(s, 3H), 4,75(s, 2H), 6,76(d, J = 8 Hz, 2H), 6,90(d, J = 8 Hz, 2H), 7,23(m, 5H), 7,74(d, J = 8 Hz, 2H), 8,11(d, J = 8 Hz, 2H), 13,51(s, 1H).

Příklad 5-35a: methyl-(4-(N-(4-methoxyfenyl)sulfamoyl)benzoát)

[00417] Do 4-methoxybenzenaminu (580 mg, 4,71 mmol) a triethylaminu (1,48 ml, 10,7 mmol) v dichlormethanu (10 ml) se přidal methyl-(4-(chlor-sulfonyl)benzoát (1,00 g, 4,28 mmol). Tato směs se míchala po dobu 16 hodin při teplotě místnosti. Reakční směs se

zředila dichlormethanem (50 ml) a promývala se vodou, 10% kyselinou citronovou a solankou, v tomto pořadí. Organické vrstvy se vysušily nad síranem sodným a koncentrovaly se pomocí rotační odparky. Výsledný surový materiál se podrobil chromatografii na silikagelu za použití 100% dichlormethanu jako elučního činidla, což dalo methyl-(4-(N-(4-methoxyfenyl)sulfamoyl)benzoát) jako bílou krystalickou pevnou látku (400 mg, 30% výtěžek)

Příklad 5-36: Kyselina 4-(N-(3,4-difluorbenzyl)-N-(4-methoxybenzyl)sulfamoyl)-benzoová



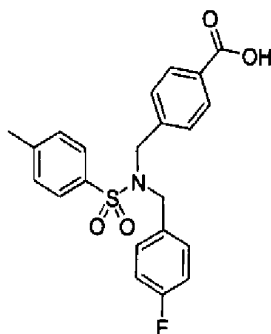
[00418] Připravená jak v Příkladu 5-10 z N-(3,4-difluorbenzyl)(4-methoxyfenyl)-methanaminu (Příklad 5-36a) a methyl-(4-(chlorsulfonyl)benzoátu) (Příklad 5-10c). MS (M + H, 446); ¹H NMR (400MHz, DMSO-d₆): δ ppm: 3,69 (s, 3H), 4,20 (s, 4H), 6,73 (d, J = 8,8 Hz, 2H), 6,93 (m, 2H), 6,98 (d, J = 8,8 Hz, 2H), 7,22 (m, 1H), 7,74(d, J = 8,4 Hz, 2H), 7,99 (d, J = 8,4 Hz, 2H).

Příklad 5-36a: N-(3,4-difluorbenzyl)(4-methoxyfenyl)methanamin

[00419] Do (4-methoxyfenyl)methanaminu (1,77 ml, 13,6 mmol) a kyseliny octové (2,7 ml, 45 mmol) v dichlormethanu (15 ml) se přidal 3,4-difluorbenzaldehyd (1,0 g, 9,08 mmol). Tato směs se zahřívala v mikrovlnné troubě při 100 °C po dobu 15 min. Reakční směs se ochladila na teplotu místnosti a přidala se po částech mikroporézní kyanoborhydridová pryskyřice (9,8 g, 22,7 mmol). Tato směs se míchala při teplotě místnosti po dobu 16 hodin. Pryskyřice se odfiltrovala a promyla dichlormethanem a organické vrstvy se promyly nasyceným hydrogenuhlíčitanem sodným, dokud neskončilo bublání. Organické vrstvy se vysušily nad síranem sodným a koncentrovaly se pomocí rotační odparky. Výsledný surový materiál se přečistil chromatografií na silikagelu použitím gradientu methanol dichlormethanu jako elučního činidla, což dalo N-(3,4-difluorbenzyl)(4-methoxyfenyl)methanamin jako nažloutlý olej (1,9 g, 80 % Výtěžek), MS (M + H, 264); ¹H

NMR (400MHz, DMSO-d₆): δ , ppm: 2,63 (br s, 1H), 3,56 (s, 2H), 3,61 (s, 2H), 3,71 (s, 3H), 6,84 (d, $J = 8,8$ Hz, 2 H), 7,14 (m, 1H), 7,21 (d, $J = 8,4$ Hz, 2H), 7,34 (m, 2H).

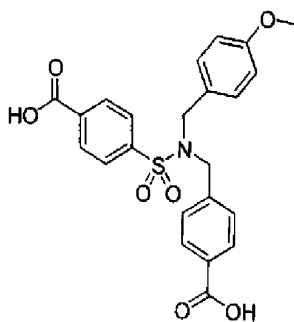
Příklad 5-37: Kyselina 4-((N-(4-fluorbenzyl)-4-methylfenylsulfonamido)methyl)-benzoová



[00420] Připravená jak v Příkladu 5-11 z 4-(aminomethyl)fenylkarboxylové, 4-methylbenzen-1-sulfonylchloridu a 4-fluorbenzylbromidu. ¹H NMR (400MHz, DMSO-d₆): δ , ppm: 3.11 (s, 3H), 4.21 (s, 2H), 4.24(s, 2H), 6.94-7.08 (m, 6H), 7.40-7.42 (d, 2H, $J = 8$ Hz), 7.63 (d, 2H, $J = 8$ Hz), 7.73 (d, 2H, $J = 8$ Hz)

[00421] Sloučenina měla IC₅₀ 0,054 μ M na hT2R14 receptoru hořkosti.

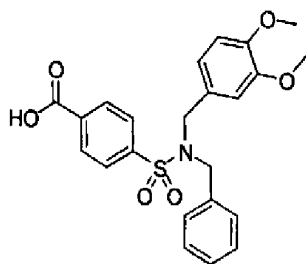
Příklad 5-38: Kyselina 4-((4-karboxy-N-(4-methoxybenzyl)fenylsulfonamido)methyl)-benzoová



[00422] Připravená jak v Příkladu 5-10 z methyl-(4-(brommethyl)benzoátu) a methyl-(4-(N-(4-methoxybenzyl)sulfamoyl)benzoátu) (Příklad 5-10b). ¹H NMR (400MHz, DMSO-

d6): δ , ppm: 3,65 (s, 3H), 4,24 (s, 2H), 4,33(s, 2H), 6,71 (d, 2H, $J=8\text{Hz}$), 6,95 (d, 2H, $J=8\text{Hz}$), 7,14 (d, 2H, $J=8\text{Hz}$), 7,73 (d, 2H, $J=8\text{Hz}$), 7,89(d, 2H, $J=8\text{Hz}$), 8,06(d, 2H, $J=8\text{Hz}$).

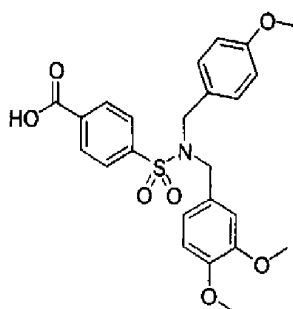
Příklad 5-39: Kyselina 4-(N-benzyl-N-(3,4-dimethoxybenzyl)sulfamoyl)benzoová



[00423] Připravená jak v Příkladu 5-10 z (3,4-dimethoxyfenyl)methanaminu, methyl-(4-(chlorosulfonyl)benzoátu) (Příklad 5-10c) a benzylchloridu. MS ($M - H$, 440,10); ^1H NMR (400MHz, CD_3OD): δ , ppm: 3,59 (s, 3H), 3,76 (s, 3H), 4,30 (s, 2H), 4,36 (s, 2H), 6,51 (d, 1H, $J=1,7\text{ Hz}$), 6,60 (m, 1H), 6,76 (d, 1H, $J=8,2\text{ Hz}$), 7,12 (m, 2H), 7,21 (m, 3H), 7,95 (d, 2H, $J=8,6\text{ Hz}$), 8,18 (d, 2H, $J=8,6\text{ Hz}$).

[00424] Sloučenina měla IC_{50} 0,678 μM na hT2R14 receptoru hořkosti.

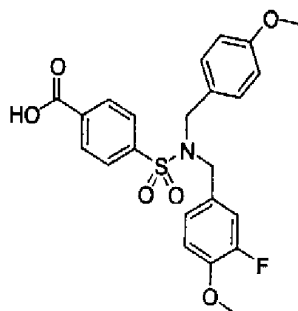
Příklad 5-40: Kyselina 4-(N-(3,4-dimethoxybenzyl)-N-(4-methoxybenzyl)sulfamoyl)benzoová



[00425] Připravená jak v Příkladu 5-10 z (3,4-dimethoxyfenyl)methanaminu, methyl-(4-(chlorosulfonyl)benzoátu) (Příklad 5-10c) a 4-methoxybenzylbromidu. MS ($M - H$, 470,10); ^1H NMR (400MHz, $\text{DMSO}-d_6$): δ , ppm: 3,49 (s, 3H), 3,67 (s, 3H), 3,68 (s, 3H), 4,20 (s, 2H), 4,22 (s, 2H), 6,41 (d, 1H, $J=1,4\text{ Hz}$), 6,58 (dd, 1H, $J_1=8,2\text{ Hz}$, $J_2=1,4\text{ Hz}$), 6,78 (m, 3H), 7,02 (d, 2H, $J=8,6\text{ Hz}$), 7,94 (d, 2H, $J=8,4\text{ Hz}$), 8,09 (d, 2H, $J=8,4\text{ Hz}$).

[00426] Sloučenina měla IC_{50} 1,47 μM na hT2R14 receptoru hořkosti.

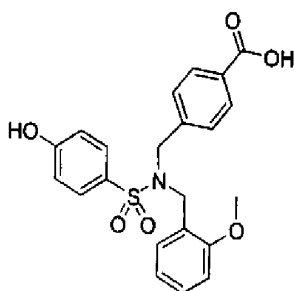
Příklad 5-41: Kyselina 4-(N-(3-fluor-4-methoxybenzyl)-N-(4-methoxybenzyl)sulfamoyl)-benzoová



[00427] Připravená jak v Příkladu 5-10 z 4-(brommethyl)-2-fluor-1-methoxybenzenu a methyl-(4-(N-(4-methoxybenzyl)sulfamoyl)benzoátu) (Příklad 5-10b). MS (M - H, 458,10); ¹H NMR (400MHz, CD₃OD): δ, ppm: 3,73 (s, 3H), 3,80 (s, 3H), 4,24 (s, 2H), 4,28 (s, 2H), 6,75 (m, 4H), 6,88 (m, 1H), 6,97 (d, 2H, J= 8,6 Hz), 7,88 (d, 2H, J= 8,3 Hz), 8,14 (d, 2H, J= 8,3 Hz).

[00428] Sloučenina měla IC₅₀ 1,11 μM na hT2R14 receptoru hořkosti.

Příklad 5-42: Kyselina 4-((4-hydroxy-N-(2-methoxybenzyl)fenylsulfonamido)methyl)-benzoová



[00429] 4-(N-(2-methoxybenzyl)sulfamoyl)fenylacetát (Příklad 5-42a) (50 mg, 0,15 mmol) se rozpustil v acetonu (1,0 ml) následován přidavkem uhličitanu cesného (97 mg, 0,30 mmol) a methyl-(4-(brommethyl)benzoátu) (38 mg, 0,17 mmol). Směs se míchala při teplotě místnosti přes noc a pak se anorganické soli odfiltrovaly. Aceton se odstranil ve vakuu a zbytek se znovu rozpustil v ethylacetátu a promylu se vodou a pak solankou. Organická vrstva se vysušila nad síranem hořečnatým a koncentrovala se. Surový produkt se přečistil

kolonovou chromatografií ethylacetátem/hexany jako elučního činidla, což dalo methyl-(4-((4-acetoxy-N-(2-methoxybenzyl)fenylsulfonamido)methyl)benzoát).

[00430] Methyl-(4-((4-acetoxy-N-(2-methoxybenzyl)fenylsulfonamido)methyl)benzoát) (surový) se rozpustil v THF (1,0 ml) a nechal se na něj působit vodný NaOH (1N, 2,0 ml, 2,0 mmol). Směs se refluxovala po dobu jedné hodiny. Po ukončení se odstranil THF *ve vakuu* a výsledný vodný roztok se okyselil 6N vodnou HCl na pH ~3. Vodná fáze se extrahovala EtOAc (2 x 15 ml) a spojené organické vrstvy se promyly vodou, solankou, vysušily se nad Na₂SO₄ a koncentrovaly se. Surový produkt se přečistil reverzní fázovou HPLC, což dalo 10,8 mg titulní sloučeniny (15% výtěžek po dvou krocích). MS (M-H, 426,1); ¹H NMR (400MHz, aceton-d₆): δ, ppm: 3,65 (s, 3H), 4,37 (s, 2H), 4,43 (s, 2H), 6,79 (m, 2H), 7,01 (d, 2H, J = 8,0 Hz), 7,17 (m, 2H), 7,28 (d, 2H, J = 7,9 Hz), 7,73 (d, 2H, J = 8,0 Hz), 7,87 (d, 2H, J = 7,9 Hz).

[00431] Sloučenina měla IC₅₀ 2,56 μM na hT2R14 receptoru hořkosti.

Příklad 5-42a: 4-(N-(2-methoxybenzyl)sulfamoyl)fenylacetát

[00432] Roztok 4-(chlorsulfonyl)fenylacetátu (Příklad 5-42b) (531 mg, 2,265 mmol) v 5,0 ml dichlormethanu se ochladil na 0 °C v ledové lázni. Přidal se (2-methoxyfenyl)-methanamin (325 μl, 2,492 mmol) a triethylamin (347 μl, 2,492 mmol). Ledová lázeň se pak odstranila a směs se ohřála na teplotu okolí a míchala se po dobu 2 hodin. Reakční směs se koncentrovala a surový produkt se přečistil kolonovou chromatografií (hexany/ethylacetát = 90/10 až 30/70), což dalo čistý 4-(N-(2-methoxybenzyl)sulfamoyl)fenylacetát (743 mg, 89 %) jako bílou pevnou látku. MS (M+H, 336,1) ¹H NMR (400MHz, CDCl₃): δ, ppm: 2,32 (s, 3H), 3,71 (s, 3H), 4,18 (d, 2H, J = 5,8 Hz), 5,15 (t, 1H, J = 5,8 Hz), 6,71 (d, 1H, J = 8,2 Hz), 6,82 (br t, 1H, J = 7,4 Hz), 7,07 (br d, 1H, J = 7,4 Hz), 7,10 (d, 2H, J = 8,7 Hz), 7,19 (br t, 1H, J = 7,8 Hz), 7,74 (d, 2H, J = 8,7 Hz).

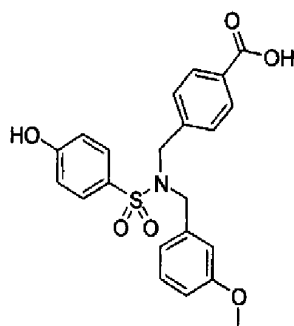
Příklad 5-42b: 4-(chlorsulfonyl)fenylacetát

[00433] 6,285 g (36,08 mmol) kyseliny 4-hydroxybenzensulfonové se rozpustilo ve směsi 30 ml anhydridu kyseliny octové a 15 ml kyseliny octové a refluxovaly se po dobu 6 hodin. Těkavé látky se odpařily a umístily se pod vysoké vakuum přes noc. Výsledný surový produkt se rozpustil v 100 ml DCM a nechal se na něj působit 4,72 ml oxalylchloridu (54,12 mmol) a 139 μl DMF (1,804 mmol) při 0 °C. Míchání pokračovalo, dokud se nezastavil vývoj plynu, pak se reakční směs koncentrovala a znovu se rozpustila v EtOAc. Organická vrstva se

dvakrát promyla 2 N H_2SO_4 a vysušila se solankou a MgSO_4 . Zakoncentrování dalo 7,067 g 4-(chlorsulfonyl)fenylacetátu jako tmavého hustého oleje, který se případně nechal ztuhnout (83 % výtěžek po dvou krocích).

[00434] $^1\text{H-NMR}$ (400MHz, CDCl_3): δ , ppm: 2,35 (s, 3H), 7,37 (d, 2H, $J = 8,9$ Hz), 8,06 (d, 2H, $J = 8,9$ Hz), $^{13}\text{C-NMR}$ (100 MHz, CDCl_3): δ , ppm: 21,13, 123,05, 128,91, 141,15, 155,80, 168,29.

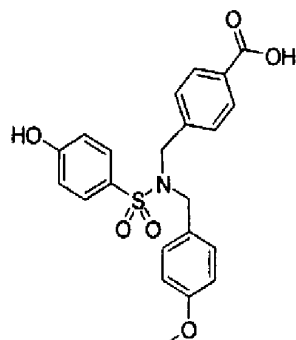
Příklad 5-43: Kyselina 4-((4-hydroxy-N-(3-methoxybenzyl)fenylsulfonamido)methyl)-benzoová



[00435] Přípravená jak v Příkladu 5-42 z (3-methoxyfenyl)methanaminu a methyl-(4-(brommethyl)benzoátu). MS (M - H, 426.10); $^1\text{H NMR}$ (400MHz, aceton- d_6): δ , ppm: 3,66 (s, 3H), 4,32 (s, 2H), 4,40 (s, 2H), 6,65 (br s, 1H), 6,73 (m, 2H), 7,05 (d, 2H, $J = 8,5$ Hz), 7,12 (t, 1H, $J = 8,0$ Hz), 7,27 (d, 2H, $J = 8,0$ Hz), 7,82 (d, 2H, $J = 8,5$ Hz), 7,88 (d, 2H, $J = 8,0$ Hz).

[00436] Sloučenina měla IC_{50} 0,188 μM na hT2R14 receptoru hořkosti.

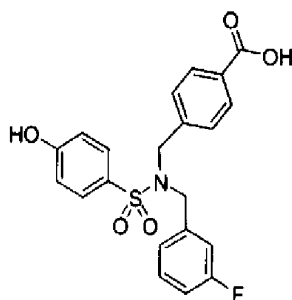
Příklad 5-44: Kyselina 4-((4-hydroxy-N-(4-methoxybenzyl)fenylsulfonamido)methyl)-benzoová



[00437] Připravená jak v Příkladu 5-42 z (4-methoxyfenyl)methanaminu a methyl-(4-(brommethyl)benzoátu). MS (M - H, 426,10); ¹H NMR (400MHz, aceton-d₆): δ, ppm: 3,73 (s, 3H), 4,27 (s, 2H), 4,35 (s, 2H), 6,76 (d, 2H, J = 8,0 Hz), 7,04 (d, 4H), 7,24 (d, 2H, J = 7,8 Hz), 7,79 (d, 2H, J = 8,2 Hz), 7,88 (d, 2H, J = 7,8 Hz).

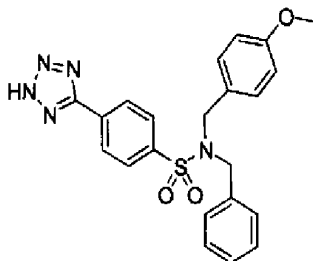
[00438] Sloučenina měla IC₅₀ 3,43 μM na hT2R14 receptoru hořkosti.

Příklad 5-45: Kyselina 4-((N-(3-fluorbenzyl)-4-hydroxyfenylsulfonamido)methyl)-benzoová



[00439] Připravená jak v Příkladu 5-42 z (3-fluorfenyl)methanaminu a methyl-(4-(brommethyl)benzoátu). MS (M - H, 414,1), ¹H NMR (400MHz, aceton-d₆): δ, ppm: 4,37 (s, 2H), 4,42 (s, 2H), 6,94 (m, 3H), 7,06 (d, 2H, J = 8,3 Hz), 7,21 (m, 1H), 7,28 (d, 2H, J = 7,6 Hz), 7,81 (d, 2H, J = 8,3 Hz), 7,87 (d, 2H, J = 7,6 Hz).

[00440] Sloučenina měla IC₅₀ 0,459 μM na hT2R14 receptoru hořkosti.

Příklad 5-46: N-benzyl-N-(4-methoxybenzyl)-4-(1H-tetrazol-5-yl)benzensulfonamid

[00441] N-benzyl-4-kyano-N-(4-methoxybenzyl)benzensulfonamid (Příklad 5-46a, 400 mg, 1 mmol) a trimethylcínazid (400 mg, 2 mmol) se rozpustily v toluenu (10 ml) a vystavily se působení mikrovln při 150 °C po dobu 3 hodin. Přidaly se další 2 ekvivalenty trimethylcínazidu a reakční směs se vystavila působení mikrovln při 150 °C po dobu dalších 3 hodin. Směs se ochladila a zfiltrovala, což dalo surový tetrazol cínčitý, který se hydrolyzuje v MEOH/konc. HCl (50 ml : 20 ml). Přidala se voda a výsledná sraženina se odfiltrovala. Produkt se překrystaloval absolutním ethanolem a vodou za vzniku N-benzyl-N-(4-methoxybenzyl)-4-(1H-tetrazol-5-yl)benzen-sulfonamidu jako bílé pevné látky. MS (M + H, 436,10); ¹H NMR (400MHz, DMSO-d₆): δ, ppm: 3,65(s, 3H), 4,27(s, 2H), 4,30(s, 2H), 6,75(d, J = 8,4 Hz, 2H), 6,98(d, J = 8,4 Hz, 2H), 7,08(m, 2H), 7,20(m, 3H), 8,05(d, J = 8,4 Hz, 2H), 8,22(d, J = 9,2 Hz, 2H).

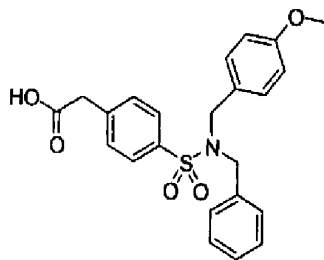
[00442] Sloučenina měla IC₅₀ 3,67 μM na hT2R14 receptoru bořkosti.

Příklad 5-46a: N-benzyl-4-kyano-N-(4-methoxybenzyl)benzensulfonamid.

[00443] 4-Kyanobenzen-1-sulfonylchlorid (600 mg, 3 mmol) se přidal do roztoku N-benzyl-N-(4-methoxyfenyl)methanaminu (Příklad 5-46b, 750 mg, 3,3 mmol) a triethylaminu (500 mg, 3,6 mmol) v dichlormethanu (15 ml). Reakční směs se míchala při teplotě okolí po dobu 4 hodin, pak se koncentrovala na rotační odparce. Surový produkt se přečistil na silikagelu, což dalo N-benzyl-4-kyano-N-(4-methoxybenzyl)benzensulfonamid jako bílou pevnou látku. ¹H NMR (400MHz, DMSO-d₆): δ, ppm: 3,68(s, 3H), 4,26(s, 2H), 4,31(s, 2H), 6,75 (d, J = 8,4 Hz, 2H), 6,97(d, J = 9,2 Hz, 2H), 7,07(m, 2H), 7,21(m, 3H), 7,98(d, J = 8,4 Hz, 2H), 8,04 (d, J = 8,8 Hz, 2H).

Příklad 5-46b: N-benzyl-1-(4-methoxyfenyl)methanamin.

[00444] 4-Methoxybenzaldehyd (5 g, 35 mmol) a benzylamin (3,8 g, 35 mmol) se přidaly do triacetoxyborohydridu sodného (10,4 g, 49 mmol) v dichlorethanu (125 ml). Reakční směs se míchala při teplotě okolí 2 hodiny, pak se koncentrovala. Směs se se zředila dichlormethanem (200 ml), promyla se nasyceným vodným hydrogenuhličitanem sodným (200 ml), solankou (200 ml) a vysušila se nad síranem hořečnatým. Surový amin se koncentroval a přečistil chromatografií na silikagelu (70% ethylacetát v hexanech), což dalo N-benzyl-1-(4-methoxyfenyl)methanamin jako olej. ^1H NMR (400MHz, DMSO- d_6): δ , ppm: 3,59(s, 2H), 3,64(s, 2H), 3,71(s, 3H), 6,86(d, J = 8,8 Hz, 2H), 7,28(m, 7H).

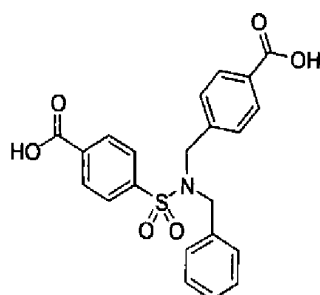
Příklad 5-47: Kyselina 2-(4-(N-benzyl-N-(4-methoxybenzyl)sulfamoyl)fenyl) octová.

[00445] Připravená jak v Příkladu 5-27 z methyl-(2-(4-(chlorsulfonyl)fenyl)acetátu (Příklad 5-47a), 4-methoxybenzaldehydu a benzylaminu. MS (M - H, 424.10); ^1H NMR (400MHz, DMSO- d_6): δ , ppm: 3,66(s, 3H), 3,72(s, 2H), 4,18(s, 2H), 4,22(s, 2H), 6,73(d, J = 8,4 Hz, 2H), 6,91(d, J = 8,4 Hz, 2H), 7,02(m, 2H), 7,19(m, 3H), 7,49(d, J = 8,4 Hz, 2H), 7,80(d, J = 8 Hz, 2H).

Příklad 5-47a: Methyl-(2-(4-(chlorsulfonyl)fenyl)acetát).

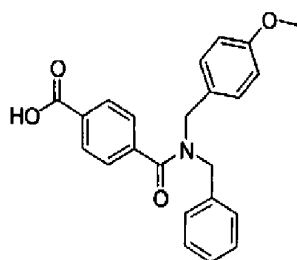
[00446] Kyselina 2-(4-(chlorsulfonyl)fenyl)octová (600 mg, 2,6 mmol) se přidala do thionylchloridu (3 ml) a zahřívala se při 80 °C po dobu 1 hodiny. Reakční směs se koncentrovala, ochladila na 0 °C v ledové lázni a se přidal ledový methanol. Směs se míchala po dobu 30 minut a koncentrovala se, což dalo methyl-(2-(4-(chlorsulfonyl)fenyl)acetát) jak olej. ^1H NMR (400MHz, DMSO- d_6): δ , ppm: 3,57(s, 3H), 3,65(s, 2H), 7,21(d, J = 8 Hz, 2H), 7,55(d, J = 8 Hz, 2H).

Příklad 5-48: Kyselina 4-((N-benzyl-4-karboxyfenylsulfonamido)methyl)benzoová.



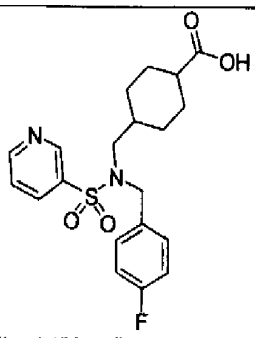
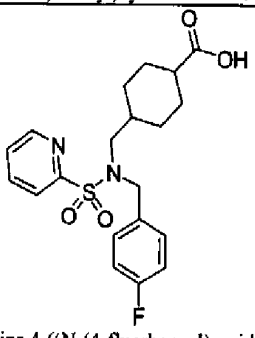
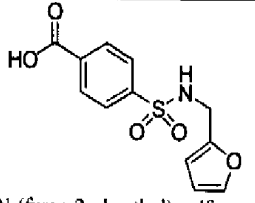
[00447] Připravená jako v Příkladu 5-10 z methyl-(4-(chlorsulfonyl)benzoátu) (Příklad 5-10c), benzylaminu a methyl-(4-(brommethyl)benzoátu). MS ($M + H$, 426,10); ^1H NMR (400MHz, DMSO- d_6): δ , ppm: 4,29(s, 2H), 4,34(s, 2H), 7,03(m, 2H), 7,12(m, 2H), 7,68(d, $J = 8$ Hz, 2H), 7,94(d, $J = 8,8$ Hz, 2H), 8,06(d, $J = 8,8$ Hz, 2H), 13,03(s, 2H).

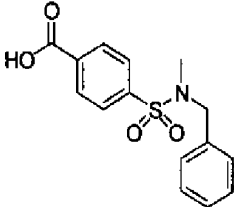
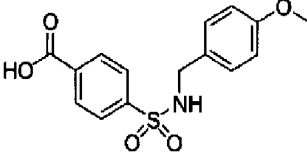
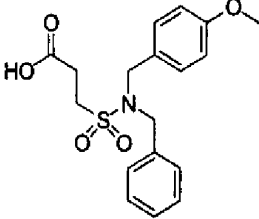
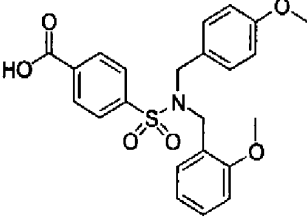
Příklad 5-49: Kyselina 4-(benzyl(4-methoxybenzyl)karbamoyl)benzoová

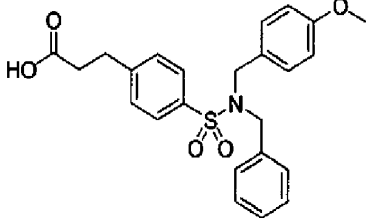
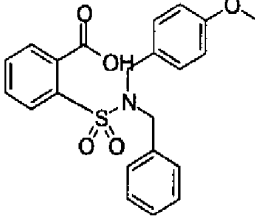
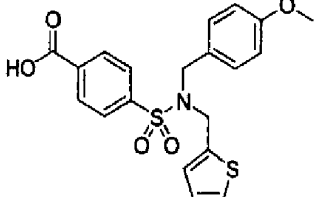
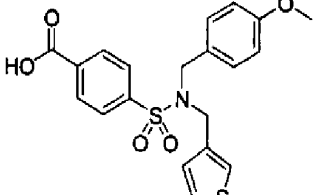


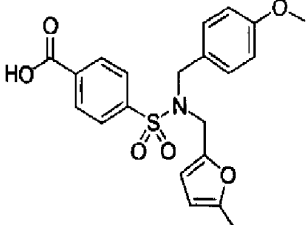
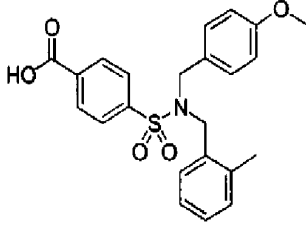
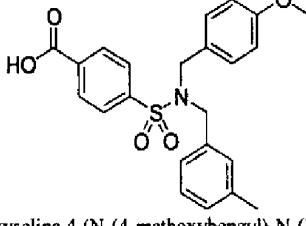
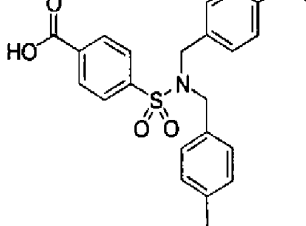
[00448] Připravená jako v Příkladu 5-27 z 4-(chlorkarbonyl)benzoátu a N-benzyl-1-(4-methoxyfenyl)methanaminu. ^1H NMR (400MHz, DMSO- d_6): δ , ppm: 3,72(d, $J = 7,6$ Hz, 3H), 4,26(s, 1H), 4,30(s, 1H), 4,50(s, 1H), 4,55(s, 1H), 6,89(m, 2H), 7,02(m, 1H), 7,10(m, 1H), 7,10(m, 1H), 7,20(m, 1H), 7,28(m, 4H), 7,55(m, 2H), 7,96(m, 2H), 13,13(s, 1H).

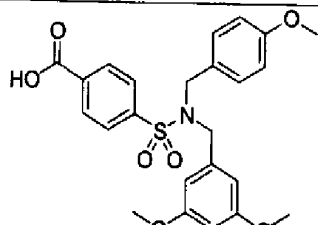
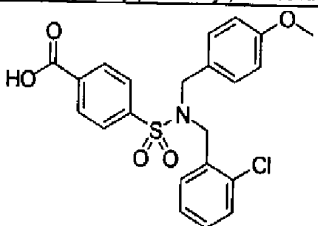
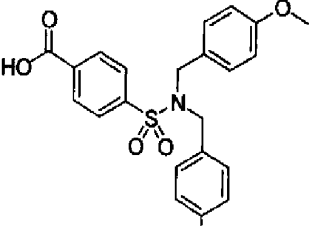
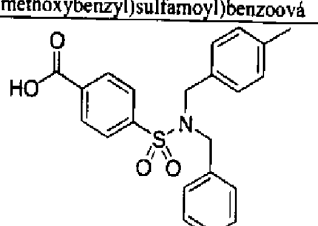
Příklad 5-50: Kyselina 4-(N-(4-fluor-3-methoxybenzyl)-N-(4-methoxybenzyl)-sulfamoyl)benzoová

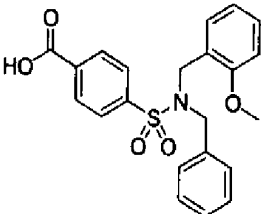
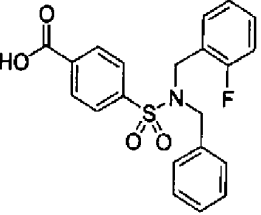
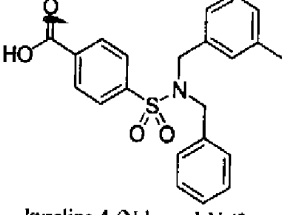
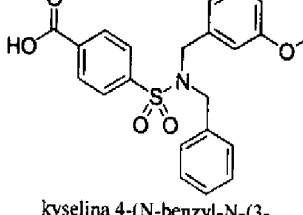
Sloučenina č.	Sloučenina	hT2R14 IC ₅₀ (μM)
5-52	 kyselina 4-((N-(4-fluorobenzyl)pyridin-3-sulfonamido)methyl)cyklohexankarboxylová	8,434
5-53	 kyselina 4-((N-(4-fluorobenzyl)pyridin-2-sulfonamido)methyl)cyklohexankarboxylová	
5-54	 kyselina 4-(N-(furan-2-ylmethyl)-sulfamoyl)benzoová	

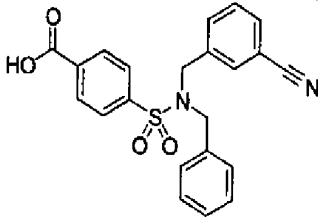
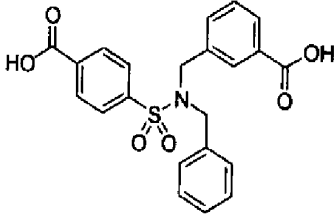
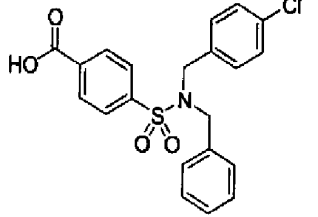
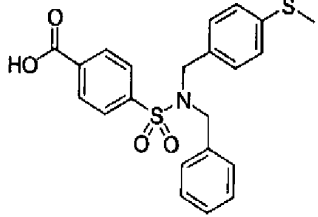
Sloučenina č.	Sloučenina	hT2R14 IC ₅₀ (μM)
5-55	 kyselina 4-(N-benzyl-N-methylsulfamoyl)benzoová	
5-56	 kyselina 4-(N-(4-methoxybenzyl)sulfamoyl)benzoová	
5-57	 kyselina 3-(N-benzyl-N-(4-methoxybenzyl)sulfamoyl)propanová	
5-58	 kyselina 4-(N-(2-methoxybenzyl)-N-(4-methoxybenzyl)sulfamoyl)benzoová	2,943

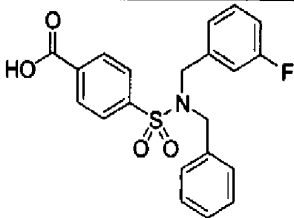
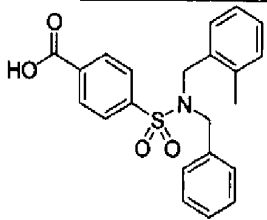
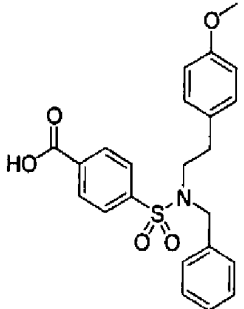
Sloučenina č.	Sloučenina	hT2R14 IC ₅₀ (μM)
5-59	 kyselina 3-(4-(N-benzyl-N-(4-methoxybenzyl)sulfamoyl)fenyl)propanová	
5-60	 kyselina 2-(N-benzyl-N-(4-methoxybenzyl)sulfamoyl)benzoová	
5-61	 kyselina 4-(N-(4-methoxybenzyl)-N-(thiophen-2-ylmethyl)sulfamoyl)benzoová	
5-62	 kyselina 4-(N-(4-methoxybenzyl)-N-(thiophen-3-ylmethyl)sulfamoyl)benzoová	

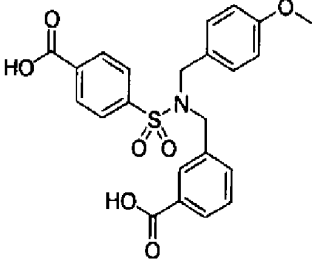
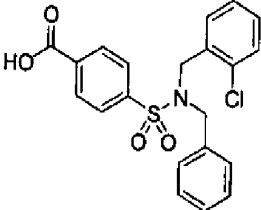
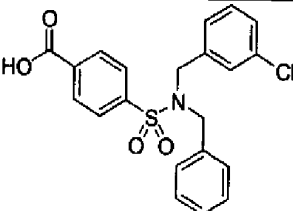
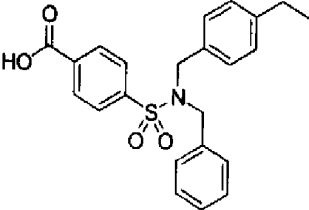
Sloučenina č.	Sloučenina	hT2R14 IC ₅₀ (μM)
5-63	 kyselina 4-(N-(4-methoxybenzyl)-N-((5-methylfuran-2-yl)methyl)-sulfamoyl)benzoová	
5-64	 kyselina 4-(N-(4-methoxybenzyl)-N-(2-methylbenzyl)sulfamoyl)benzoová	
5-65	 kyselina 4-(N-(4-methoxybenzyl)-N-(3-methylbenzyl)sulfamoyl)benzoová	
5-66	 kyselina 4-(N-(4-methoxybenzyl)-N-(4-methylbenzyl)sulfamoyl)benzoová	

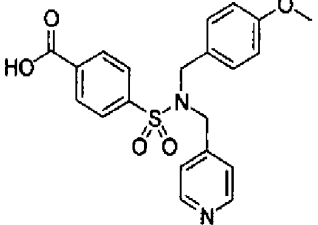
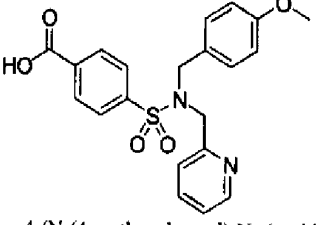
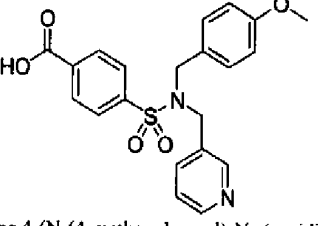
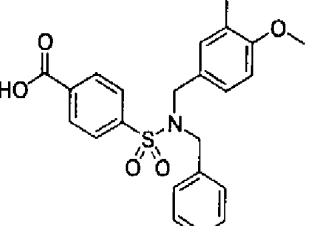
Sloučenina č.	Sloučenina	hT2R14 IC ₅₀ (μM)
5-67	 kyselina 4-(N-(3,5-dimethoxybenzyl)-N-(4-methoxybenzyl)sulfamoyl)benzoová	12,141
5-68	 kyselina 4-(N-(2-chlorobenzyl)-N-(4-methoxybenzyl)sulfamoyl)benzoová	7,044
5-69	 kyselina 4-(N-(4-fluorobenzyl)-N-(4-methoxybenzyl)sulfamoyl)benzoová	8,283
5-70	 kyselina 4-(N-benzyl-N-(4-methylbenzyl)sulfamoyl)benzoová	5,394

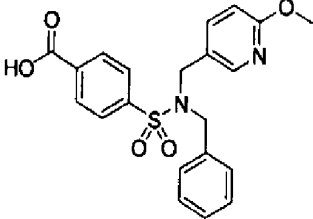
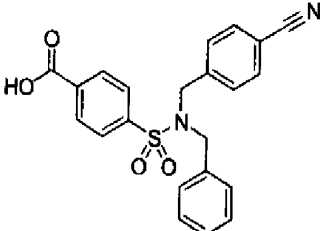
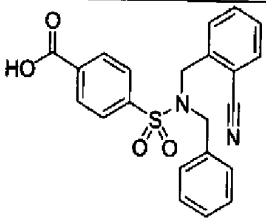
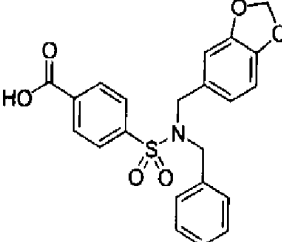
Sloučenina č.	Sloučenina	hT2R14 IC ₅₀ (μM)
5-71	 kyselina 4-(N-benzyl-N-(2-methoxybenzyl)sulfamoyl)benzoová	5,061
5-72	 kyselina 4-(N-benzyl-N-(2-fluorbenzyl)sulfamoyl)benzoová	6,164
5-73	 kyselina 4-(N-benzyl-N-(3-methylbenzyl)sulfamoyl)benzoová	2,290
5-74	 kyselina 4-(N-benzyl-N-(3-methoxybenzyl)sulfamoyl)benzoová	5,991

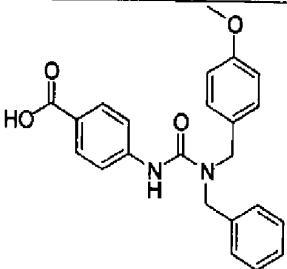
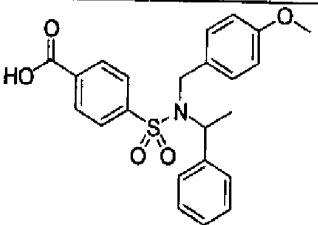
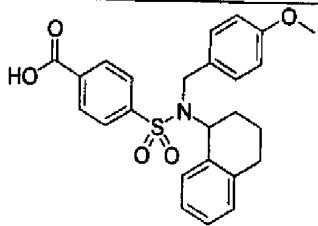
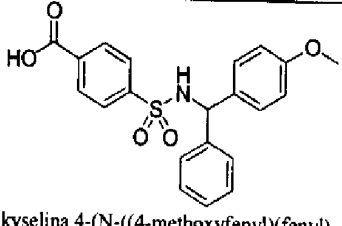
Sloučenina č.	Sloučenina	hT2R14 IC ₅₀ (μM)
5-75	 kyselina 4-(N-benzyl-N-(3- -kyanobenzyl)sulfamoyl)benzoová	
5-76	 kyselina 3-((N-benzyl-4- -karboxyfenylsulfonamido)methyl)benzoová	
5-77	 kyselina 4-(N-benzyl-N-(4- -chlorbenzyl)sulfamoyl)benzoová	3,977
5-78	 kyselina 4-(N-benzyl-N-(4- -(methylthio)benzyl)sulfamoyl)benzoová	2,458

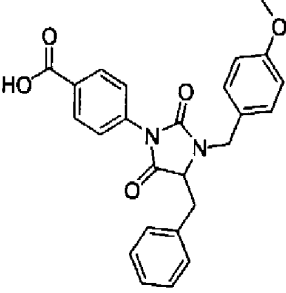
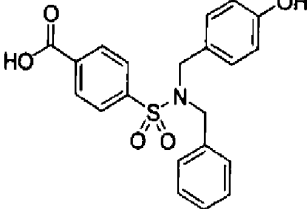
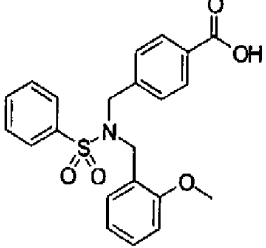
Sloučenina č.	Sloučenina	hT2R14 IC ₅₀ (μM)
5-79	 kyselina 4-(N-benzyl-N-(3-fluorbenzyl)sulfamoyl)benzoová	2,310
5-80	 kyselina 4-(N-benzyl-N-(2-methylbenzyl)sulfamoyl)benzoová	2,926
5-81	 kyselina 4-(N-benzyl-N-(4-methoxyfenethyl)sulfamoyl)benzoová	

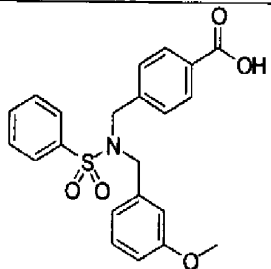
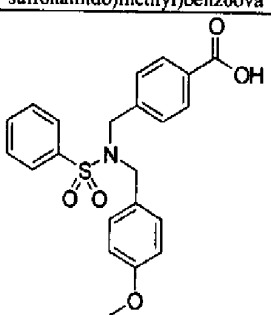
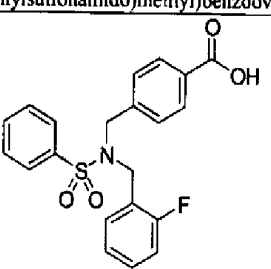
Sloučenina č.	Sloučenina	hT2R14 IC ₅₀ (μM)
5-82	 kyselina 3-((4-karboxy-N-(4-methoxybenzyl)fenylsulfonamido)methyl)-benzoová	
5-83	 kyselina 4-(N-benzyl-N-(2-chlorobenzyl)sulfamoyl)benzoová	4,486
5-84	 kyselina 4-(N-benzyl-N-(3-chlorobenzyl)sulfamoyl)benzoová	4,286
5-85	 kyselina 4-(N-benzyl-N-(4-ethylbenzyl)sulfamoyl)benzoová	8,580

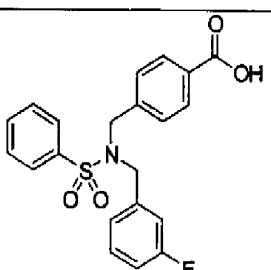
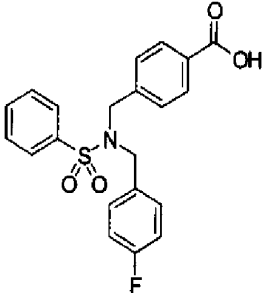
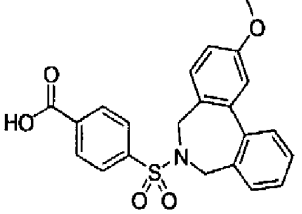
Sloučenina č.	Sloučenina	hT2R14 IC ₅₀ (μM)
5-86	 kyselina 4-(N-(4-methoxybenzyl)-N-(pyridin-4-ylmethyl)sulfamoyl)benzoová	
5-87	 kyselina 4-(N-(4-methoxybenzyl)-N-(pyridin-2-ylmethyl)sulfamoyl)benzoová	
5-88	 kyselina 4-(N-(4-methoxybenzyl)-N-(pyridin-3-ylmethyl)sulfamoyl)benzoová	
5-89	 kyselina 4-(N-benzyl-N-(4-methoxy-3-methylbenzyl)sulfamoyl)benzoová	1.995

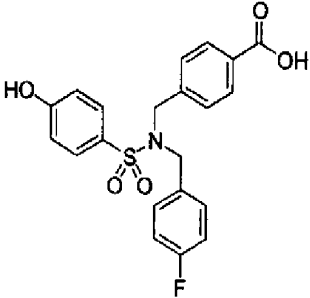
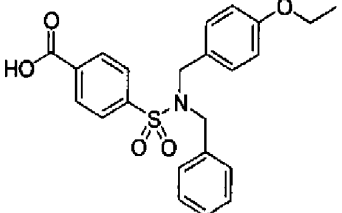
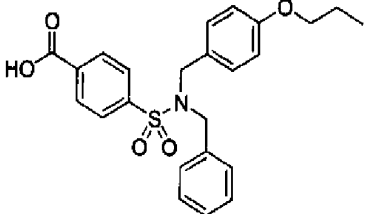
Sloučenina č.	Sloučenina	hT2R14 IC ₅₀ (μM)
5-90	 kyselina 4-(N-benzyl-N-((6-methoxypyridin-3-yl)methyl)sulfamoyl)benzoová	3,258
5-91	 kyselina 4-(N-benzyl-N-(4- -kyanobenzyl)sulfamoyl)benzoová	1,848
5-92	 kyselina 4-(N-benzyl-N-(2- -kyanobenzyl)sulfamoyl)benzoová	4,627
5-93	 kyselina 4-(N-(benzo[d][1,3]dioxol-5-ylmethyl)-N-benzylsulfamoyl)benzoová	2,167

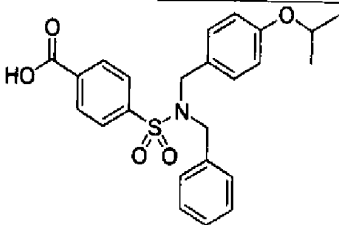
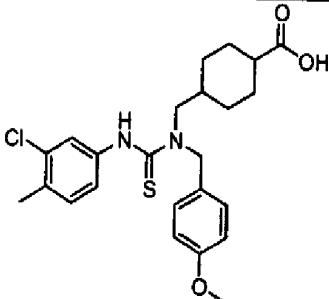
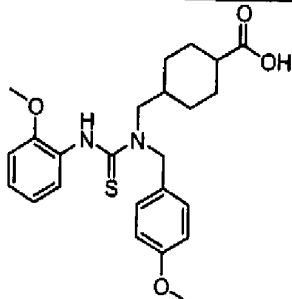
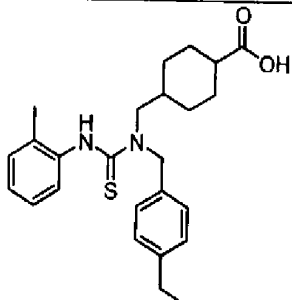
Sloučenina č.	Sloučenina	hT2R14 IC ₅₀ (μM)
5-94	 kyselina 4-(3-benzyl-3-(4-methoxybenzyl)ureido)benzoová	
5-95	 kyselina 4-(N-(4-methoxybenzyl)-N-(1-phenylethyl)sulfonyl)benzoová	1,397
5-96	 kyselina 4-(N-(4-methoxybenzyl)-N-(1,2,3,4-tetrahydronaftalen-1-yl)sulfonyl)benzoová	2,415
5-97	 kyselina 4-(N-((4-methoxyfenyl)(fenyl)methyl)sulfonyl)benzoová	

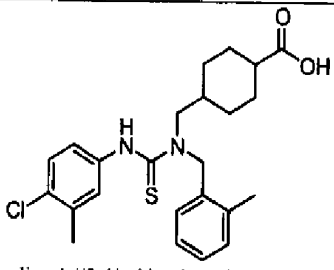
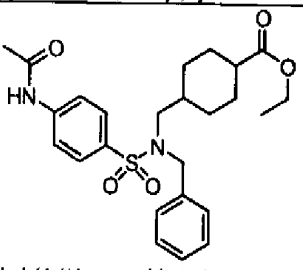
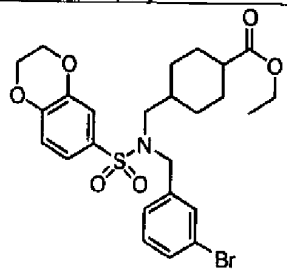
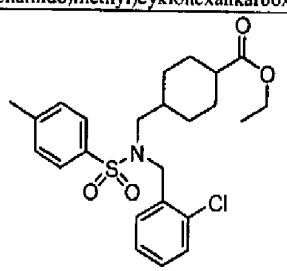
Sloučenina č.	Sloučenina	hT2R14 IC ₅₀ (μM)
5-98	 kyselina 4-(4-benzyl-3-(4-methoxybenzyl)-2,5-dioxoimidazolidin-1-yl)benzoová	
5-99	 kyselina 4-(N-benzyl-N-(4-hydroxybenzyl)sulfamoyl)benzoová	5,207
5-100	 kyselina 4-((N-(2-methoxybenzyl)fenyl-sulfonamido)methyl)benzoová	1,294

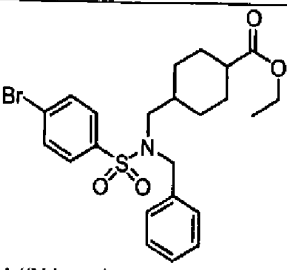
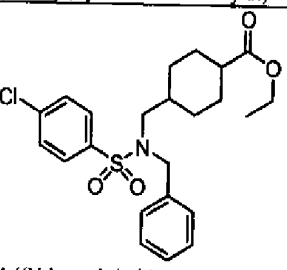
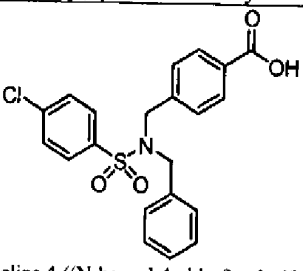
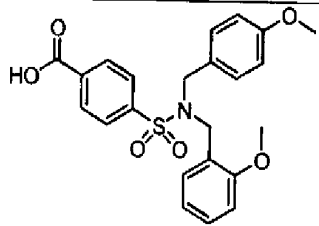
Sloučenina č.	Sloučenina	hT2R14 IC ₅₀ (μM)
5-101	 kyselina 4-((N-(3-methoxybenzyl)fenyl- sulfonamido)methyl)benzoová	0,345
5-102	 kyselina 4-((N-(4-methoxybenzyl)- fenylsulfonamido)methyl)benzoová	2,219
5-103	 kyselina 4-((N-(2-fluorbenzyl)fenyl- sulfonamido)methyl)benzoová	0,429

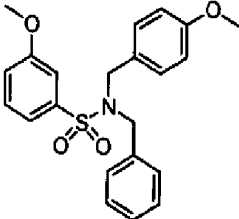
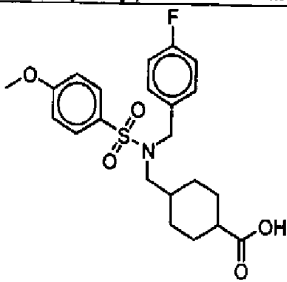
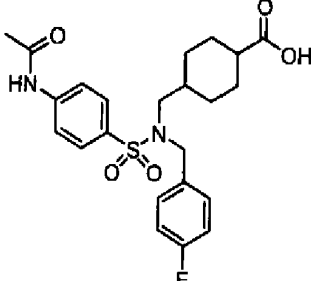
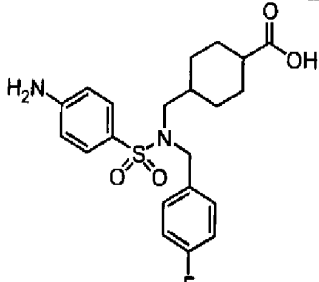
Sloučenina č.	Sloučenina	hT2R14 IC ₅₀ (μM)
5-104	 kyselina 4-((N-(3-fluorobenzyl)fenyl- sulfonamido)methyl)-benzoová	0,406
5-105	 kyselina 4-((N-(4-fluorobenzyl)fenyl- sulfonamido)methyl)-benzoová	0,935
5-106	 kyselina 4-(2-methoxy-5H-dibenzo[c,e]-azepin- 6(7H)-ylsulfonyl)benzoová	

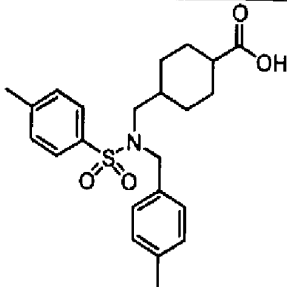
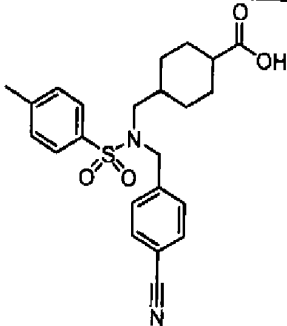
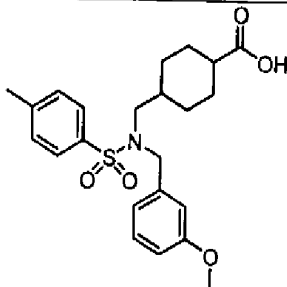
Sloučenina č.	Sloučenina	hT2R14 IC ₅₀ (μM)
5-107	 kyselina 4-((N-(4-fluorobenzyl)-4-hydroxy- fenylsulfonamido)methyl)benzoová	4,086
5-108	 kyselina 4-(N-benzyl-N-(4- -ethoxybenzyl)sulfamoyl)benzoová	
5-109	 kyselina 4-(N-benzyl-N-(4-propoxy- benzyl)sulfamoyl)benzoová	

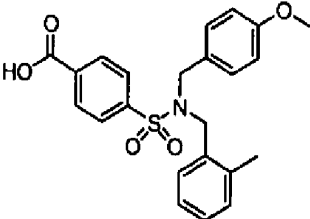
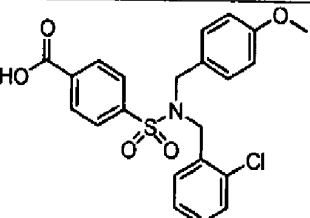
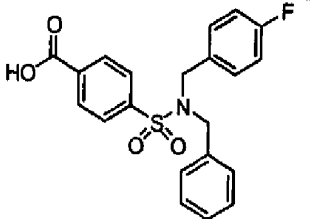
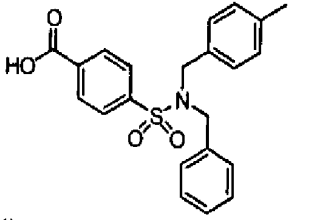
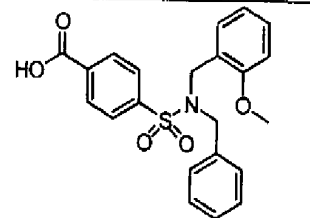
Sloučenina č.	Sloučenina	hT2R14 IC ₅₀ (μM)
5-110	 kyselina 4-((N-benzyl-N-(4-izopropoxybenzyl)sulfamoyl)benzoová	
5-111	 kyselina 4-((3-(3-chlor-4-methylfenyl)-1-(4-methoxybenzyl)thioureido)methyl)cyklo-hexankarboxylová	6,136
5-112	 kyselina 4-((1-(4-methoxybenzyl)-3-(2-methoxyfenyl)thioureido)methyl)cyklo-hexankarboxylová	8,852
5-113	 kyselina 4-((1-(4-ethylbenzyl)-3-o-tolylthioureido)methyl)cyklohexankarboxylová	5,018

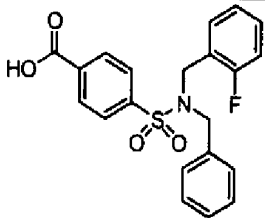
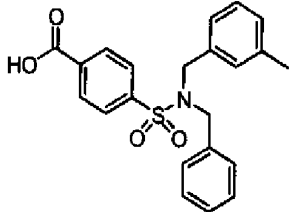
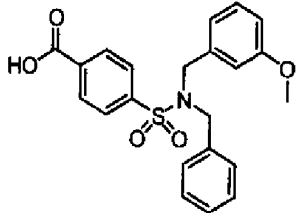
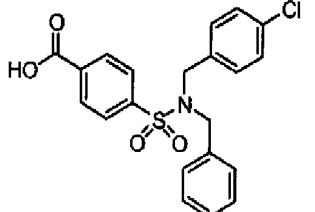
Sloučenina č.	Sloučenina	hT2R14 IC ₅₀ (μM)
5-114	 kyselina 4-((3-(4-chlor-3-methylfenyl)-1-(2-methylbenzyl)thioureido)methyl)cyklohexan-karboxylová	4,872
5-115	 ethyl-(4-((4-acetamido-N-benzylfenyl-sulfonamido)methyl)cyklohexan-karboxylát)	0,334
5-116	 ethyl-(4-((N-(3-brombenzyl)-2,3-dihydrobenzo[b][1,4]dioxin-6-sulfonamido)methyl)cyklohexan-karboxylát)	2,567
5-117	 ethyl-(4-((N-(2-chlorbenzyl)-4-methylfenyl-sulfonamido)methyl)cyklohexan-karboxylát)	2,816

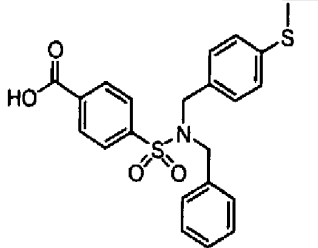
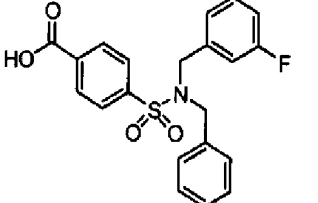
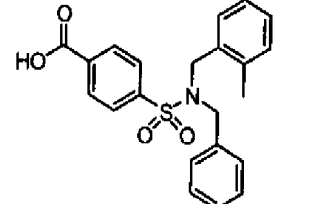
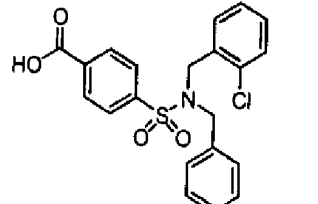
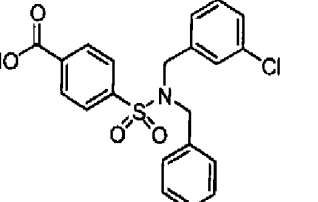
Sloučenina č.	Sloučenina	hT2R14 IC ₅₀ (μM)
5-118	 ethyl-(4-((N-benzyl-4-bromfenylsulfonamido)-methyl)cyklohexankarboxylát)	2,344
5-119	 ethyl-(4-((N-benzyl-4-chlorfenylsulfonamido)-methyl)cyklohexankarboxylát)	0,672
5-120	 kyselina 4-((N-benzyl-4-chlorfenylsulfonamido)methyl)benzoová	0,394
5-121	 kyselina 4-(N-(2-methoxybenzyl)-N-(4-methoxybenzyl)sulfamoyl)benzoová	2,943

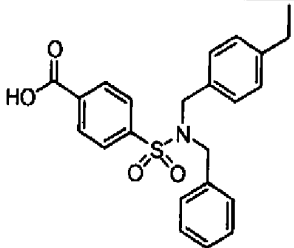
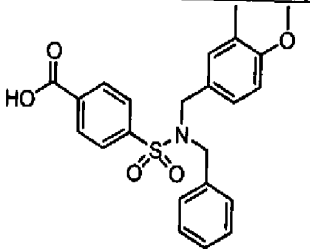
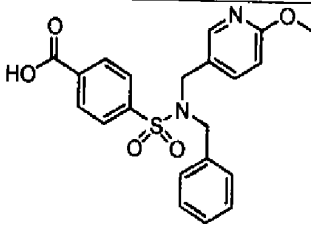
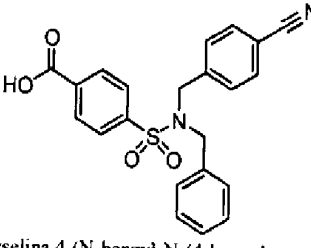
Sloučenina č.	Sloučenina	hT2R14 IC ₅₀ (μM)
5-122	 N-benzyl-3-methoxy-N-(4-methoxybenzyl)benzensulfonamid	2,219
5-123	 kyselina 4-((N-(4-fluorbenzyl)-4-methoxy-fenylsulfonamido)methyl)cyklohexankarboxylová	0,092
Sloučenina č.	Sloučenina	hT2R14 IC ₅₀ (μM)
5-124	 kyselina 4-((4-acetamido-N-(4-fluorbenzyl)-fenylsulfonamido)methyl)cyklohexankarboxylová	0,842
5-125	 kyselina 4-((4-amino-N-(4-fluorbenzyl)fenyl-sulfonamido)methyl)cyklohexankarboxylová	1,651

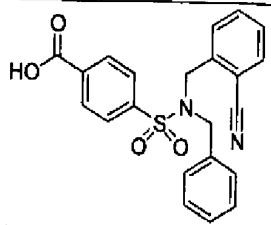
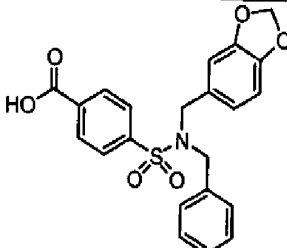
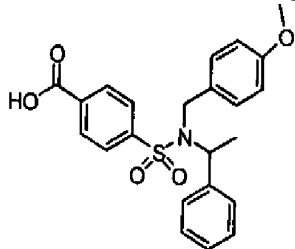
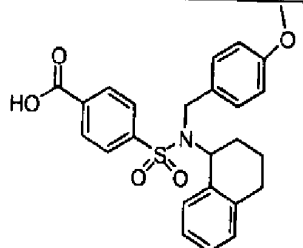
Sloučenina č.	Sloučenina	hT2R14 IC ₅₀ (μM)
5-126	 kyselina 4-((4-methyl-N-(4-methylbenzyl)fenylsulfonamido)methyl)cyclohexanocarboxylová	0,109
5-127	 kyselina 4-((N-(4-kyanobenzyl)-4-methylfenylsulfonamido)methyl)cyclohexanocarboxylová	0,499
5-128	 kyselina 4-((N-(3-methoxybenzyl)-4-methylfenylsulfonamido)methyl)cyclohexanocarboxylová	0,036

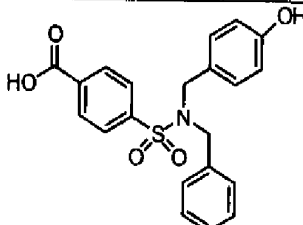
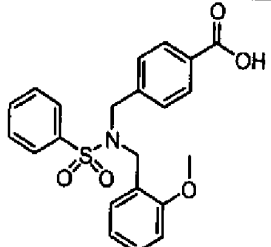
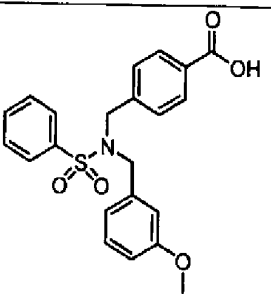
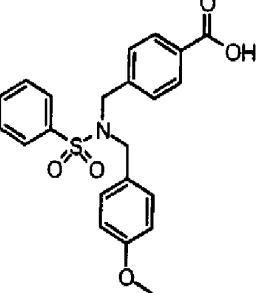
Sloučenina č.	Sloučenina	hT2R14 IC ₅₀ (μM)
5-129	 kyselina 4-(N-(4-methoxybenzyl)-N-(2-methylbenzyl)sulfamoyl)benzoová	5,316
5-130	 kyselina 4-(N-(2-chlorobenzyl)-N-(4-methoxybenzyl)sulfamoyl)benzoová	7,044
5-131	 kyselina 4-(N-benzyl-N-(4-fluorobenzyl)sulfamoyl)benzoová	8,283
5-132	 kyselina 4-(N-benzyl-N-(4-methylbenzyl)sulfamoyl)benzoová	5,394
5-133	 kyselina 4-(N-benzyl-N-(2-methoxybenzyl)sulfamoyl)benzoová	5,061

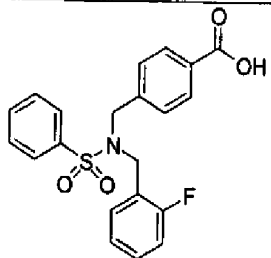
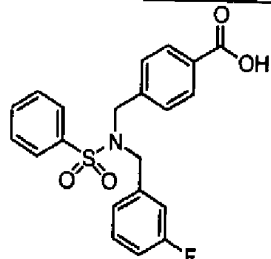
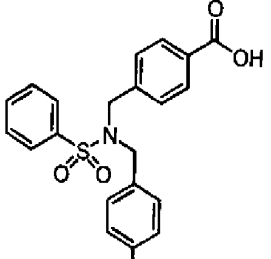
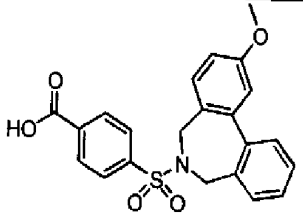
Sloučenina č.	Sloučenina	hT2R14 IC ₅₀ (μM)
Sloučenina č.	Sloučenina	hT2R14 IC ₅₀ (μM)
5-134	 kyselina 4-(N-benzyl-N-(2-fluorbenzyl)sulfamoyl)-benzoová	6,164
5-135	 kyselina 4-(N-benzyl-N-(3-methylbenzyl)-sulfamoyl)benzoová	2,290
5-136	 kyselina 4-(N-benzyl-N-(3-methoxybenzyl)-sulfamoyl)benzoová	5,991
5-137	 kyselina 4-(N-benzyl-N-(4-chlorobenzyl)-sulfamoyl)benzoová	3,977
Sloučenina č.	Sloučenina	hT2R14 IC ₅₀ (μM)

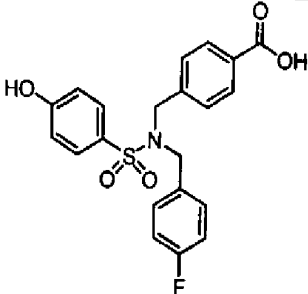
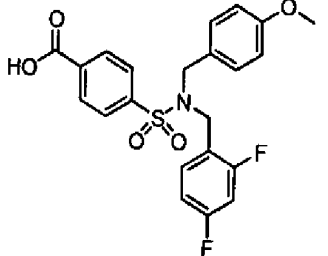
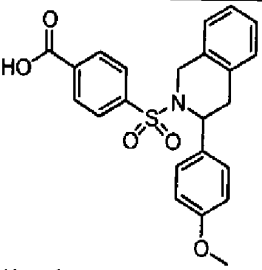
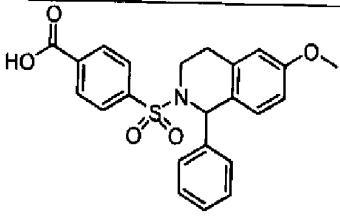
Sloučenina č.	Sloučenina	hT2R14 IC ₅₀ (μM)
5-138	 kyselina 4-(N-benzyl-N-(4-(methylthio)-benzyl)sulfamoyl)benzoová	2,458
5-139	 kyselina 4-(N-benzyl-N-(3-fluorobenzyl)-sulfamoyl)benzoová	2,310
5-140	 kyselina 4-(N-benzyl-N-(2-methylbenzyl)-sulfamoyl)benzoová	2,926
5-141	 kyselina 4-(N-benzyl-N-(2-chlorobenzyl)-sulfamoyl)benzoová	4,486
Sloučenina č.	Sloučenina	hT2R14 IC ₅₀ (μM)
5-142	 kyselina 4-(N-benzyl-N-(3-chlorobenzyl)-sulfamoyl)benzoová	4,286

Sloučenina č.	Sloučenina	hT2R14 IC ₅₀ (μM)
5-143	 kyselina 4-(N-benzyl-N-(4-ethylbenzyl)-sulfamoyl)benzoová	8,580
5-144	 kyselina 4-(N-benzyl-N-(4-methoxy-3-methylbenzyl)sulfamoyl)benzoová	1,995
5-145	 kyselina 4-(N-benzyl-N-((6-methoxypyridin-3-yl)methyl)sulfamoyl)benzoová	3,258
Sloučenina č.	Sloučenina	hT2R14 IC ₅₀ (μM)
5-146	 kyselina 4-(N-benzyl-N-(4-kyanobenzyl)-sulfamoyl)benzoová	1,848

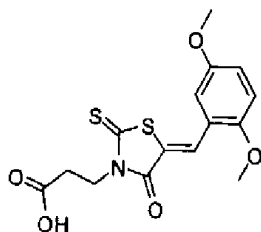
Sloučenina č.	Sloučenina	hT2R14 IC ₅₀ (μM)
5-147	 kyselina 4-(N-benzyl-N-(2-kyanobenzyl)-sulfamoyl)benzoová	4,627
5-148	 kyselina 4-(N-(benzo[d][1,3]dioxol-5-ylmethyl)-N-benzylsulfamoyl)benzoová	2,167
5-149	 kyselina 4-(N-(4-methoxybenzyl)-N-(1-fenylethyl)sulfamoyl)benzoová	1,397
Sloučenina č.	Sloučenina	hT2R14 IC ₅₀ (μM)
5-150	 kyselina 4-(N-(4-methoxybenzyl)-N-(1,2,3,4-tetrahydronaftalen-1-yl)sulfamoyl)benzoová	2,415

Sloučenina č.	Sloučenina	hT2R14 IC ₅₀ (μM)
5-151	 kyselina 4-((N-benzyl-N-(4-hydroxybenzyl)sulfamoyl)benzoová	5,207
5-152	 kyselina 4-((N-(2-methoxybenzyl)fenyl-sulfonamido)methyl)benzoová	1,294
Sloučenina č.	Sloučenina	hT2R14 IC ₅₀ (μM)
5-153	 kyselina 4-((N-(3-methoxybenzyl)fenyl-sulfonamido)methyl)benzoová	0,345
5-154	 kyselina 4-((N-(4-methoxybenzyl)fenyl-sulfonamido)methyl)benzoová	2,219

Sloučenina č.	Sloučenina	hT2R14 IC ₅₀ (μM)
5-155	 kyselina 4-((N-(2-fluorbenzyl)fenylsulfon- amido)methyl)benzoová	0,429
5-156	 kyselina 4-((N-(3-fluorbenzyl)fenylsulfon- amido)methyl)benzoová	0,406
5-157	 kyselina 4-((N-(4-fluorbenzyl)fenylsulfon- amido)methyl)benzoová	0,935
5-158	 kyselina 4-(2-methoxy-5H-dibenzo[c,e]azepin--6(7H)- ylsulfonyl)benzoová	3,571
Sloučenina č.	Sloučenina	hT2R14 IC ₅₀ (μM)

Sloučenina č.	Sloučenina	hT2R14 IC ₅₀ (μM)
5-159	 kyselina 4-((N-(4-fluorobenzyl)-4-hydroxy-fenylsulfonamido)methyl)benzoová	4,086
5-160	 kyselina 4-((N-(2,4-difluorobenzyl)-N-(4-methoxybenzyl)sulfamoyl)benzoová	1,255
5-161	 kyselina 4-(3-(4-methoxyfenyl)-3, 4-dihydroizochinolin-2(1H)-ylsulfonyl)benzoová	6,267
Sloučenina č.	Sloučenina	hT2R14 IC ₅₀ (μM)
5-162	 kyselina 4-(6-methoxy-1-fenyl-3, 4-dihydroizochinolin-2(1H)-ylsulfonyl)benzoová	9,616

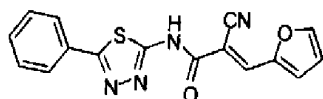
Příklad 6-1: Kyselina (Z)-3-(5-(2,5-dimethoxybenzyliden)-4-oxo-2-thioxothiazolidin-3-yl)propanová



[00452] Kyselina 3-(4-oxo-2-thioxothiazolidin-3-yl)propanová (200 mg, 1 mmol), 2,5-dimethoxybenzaldehyd (168 mg, 1 mmol) a piperidin (0,3 ml) se spojily v ethanolu (3 ml) a ozařovaly se v mikrovlnné troubě při 100 °C po dobu 10 minut. Reakční směs se ochladila, pevná látka se sebrala filtrací, promyla se ethylacetátem/hexany (1/1) a překrystalizovala se z ethanolu, což dalo 85% výtěžek titulní sloučeniny (309 mg, hnědo-oranžová pevná látka). MS (M+H, 284); ¹H NMR (400MHz, DMSO-d₆): δ, ppm: 2,57 (t, 2H), 3,74 (s, J=6,8Hz, 3H), 3,84 (s, 3H), 4,19 (t, 2H), 6,90 (s, 1H), 7,10 (s, 2H), 7,86 (s, 1H).

[00453] Sloučenina měla IC₅₀ 2,75 μM na hT2R14 receptoru hořkosti.

Příklad 6-2: (E)-2-kyano-3-(furan-2-yl)-N-(5-fenyl-1,3,4-thiadiazol-2-yl)akrylamid



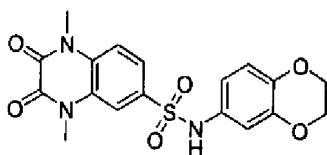
[00454] 5-Fenyl-1,3,4-thiadiazol-2-amin (600 mg, 3,3 mmol), kyselina kyanoctová (300 mg, 3,6 mmol) a EDC-HCl (861 mg, 4,5 mmol) se míchaly v acetonitrilu (15 ml) při teplotě místnosti po dobu 2 hodin. Směs se zředila vodnou 1N HCl a vodná fáze se extrahovala ethylacetátem. Spojené organické extrakty se vysušily nad síranem sodným, zfiltrovaly se koncentrovaly se *ve vakuu*. Zbytek se třel s ethylacetátem/hexany (1/9), což dalo 2-kyano-N-(5-fenyl-1,3,4-thiadiazol-2-yl)acetamid jako bílou pevnou látku, která se dále použije bez dalšího přečištění.

[00455] 312 mg 2-kyano-N-(5-fenyl-1,3,4-thiadiazol-2-yl)acetamidu a 150 μl furan-2-karbaldehydu se mixovalo v 2,5 ml DMF a zahřívalo se v mikrovlnné troubě při 150 °C po dobu 15 min.. Přidalo se 5 ml H₂O a sebrala se výsledná sraženina a promyla se vodou (4 x), což dalo surový produkt. Překrystalováním z ethanolu se získalo 180 mg čistého produktu

jako hnědé pevné látky. MS (M+H, 323); ¹H NMR (400MHz, DMSO-d₆): δ, ppm: 6,82 (m, 1H), 7,43 (d, 1H), 7,49 (m, 4H), 7,87 (m, 2H), 8,15 (s, 1H), 8,22 (br, s, 1H).

[00456] Sloučenina měla IC₅₀ 0,499 μM na hT2R14 receptoru hořkosti.

Příklad 6-3: N-(2,3-dihydrobenzo[b][1,4]dioxin-6-yl)-1,4-dimethyl-2,3-dioxo-1,2,3,4-tetrahydrochinoxalin-6-sulfonamid



[00457] 1,4-Dimethyl-2,3-dioxo-1,2,3,4-tetrahydrochinoxalin-6-sulfonylchlorid (Příklad 6-3a, 450 mg, 1,6 mmol) se přidal do míchaného roztoku 2,3-dihydrobenzo[b][1,4]dioxin-6-amin (215 mg, 1,4 mmol) a triethylaminu (170 mg, 1,7 mmol) v dichlormethanu (10 ml). Reakční směs se míchala při teplotě okolí přes noc, pak se koncentrovala. Surový produkt se přečistil chromatografií na silikagelu (0-30 % ethylacetát v hexanech), což dalo N-(2,3-dihydrobenzo[b][1,4]dioxin-6-yl)-1,4-dimethyl-2,3-dioxo-1,2,3,4-tetrahydrochinoxalin-6-sulfonamidu jako bílé pevné látky. MS (M + H, 404,10); ¹H NMR (400MHz, DMSO-d₆): δ, ppm: 3,47(s, 3H), 3,49(s, 3H), 4,12(m, 4H), 6,55(m, 1H), 6,61(d, J = 2,4 Hz, 1H), 6,69(d, J = 8,4 Hz, 1H), 7,53(m, 1H), 7,59(d, J = 2 Hz, 1H), 10,00(s, 1H).

[00458] Sloučenina měla IC₅₀ 7,71 μM na hT2R14 receptoru hořkosti.

Příklad 6-3a: 1,4-dimethyl-2,3-dioxo-1,2,3,4-tetrahydrochinoxalin-6-sulfonylchlorid

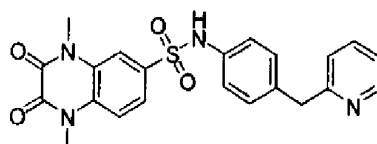
[00459] Kyselina chlorsulfonová (3 ml) se zahřála na 65 °C a po částech se přidával 1,4-dimethylchinoxalin-2,3(1H,4H)-dion (Příklad 6-3b, 1 g, 5,5 mmol) více než 0,5 hodiny. Reakční směs se míchala po dobu 4 hodin, pak se ochladila na teplotu okolí a pomalu se vlila na led. Výsledná sraženina se zfiltrovala a promyla se vodou, což dalo 1,4-dimethyl-2,3-dioxo-1,2,3,4-tetrahydrochinoxalin-6-sulfonylchlorid jako bílou pevnou látku. ¹H NMR (400MHz, DMSO-d₆): δ, ppm: 3,50(s, 6H), 7,25(m, 2H), 7,38(m, 4H).

Příklad 6-3b: 1,4-dimethylchinoxalin-2,3(1H,4H)-dion

[00460] Do roztoku NaH (2,5 g) v DMF (200 ml) se přidal po částech chinoxalin-2,3(1H,4H)-dion (5 g), následován pomalým přidávkem methyljodidu (3,8 ml). Reakční směs se míchala při teplotě okolí po dobu 4 hodin, pak se přidala voda (200 ml). Výsledná

sraženina se odfiltrovala a promyla se vodou, což dalo 1,4-dimethylchinoxalin-2,3(1H,4H)-dion jako bílou pevnou látku ve 95% výtěžku. ^1H NMR (400MHz, DMSO- d_6): δ , ppm: 3,50(s, 6H), 7,25(m, 2H), 7,38(m, 4H).

Příklad 6-4: 1,4-dimethyl-2,3-dioxo-N-(4-(pyridin-2-ylmethyl)fenyl)-1,2,3,4-tetrahydrochinoxalin-6-sulfonamid.



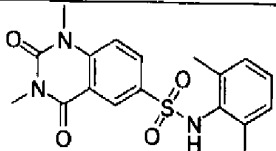
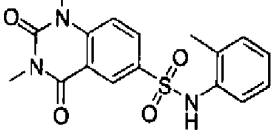
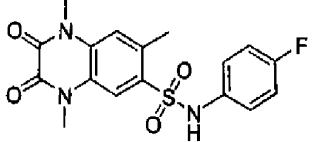
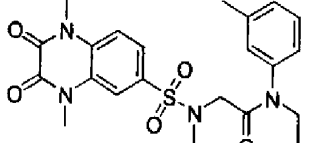
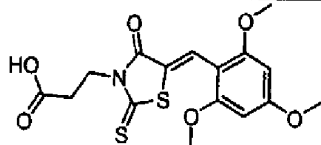
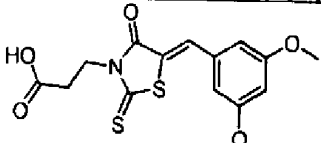
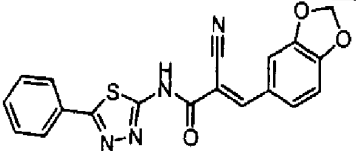
[00461] Sloučenina je komerčně dostupná a byla nakoupena přímo od Ryan Scientific.

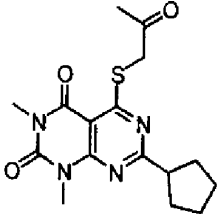
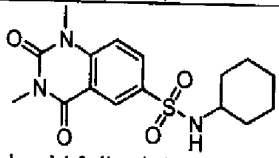
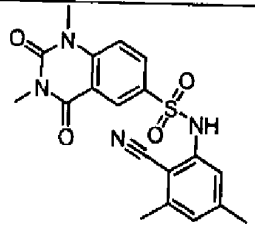
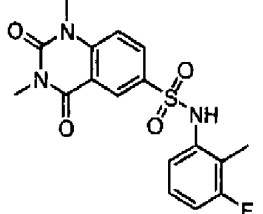
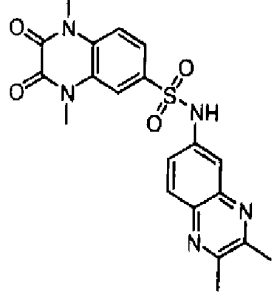
[00462] Sloučenina měla IC_{50} 6,14 μM na hT2R14 receptoru hořkosti.

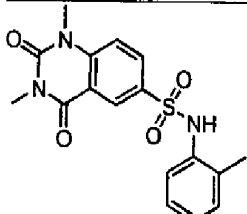
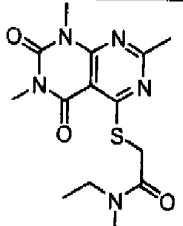
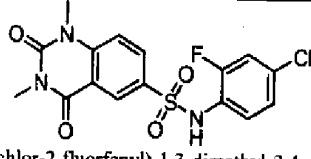
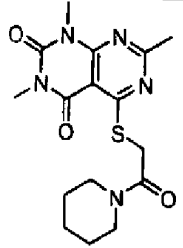
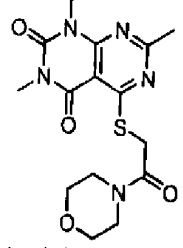
[00463] Další sloučeniny se testovaly v pokusech a zjistilo se, že mají relativně vysokou účinnost jako inhibitory hT2R14 receptoru hořkosti. Výsledky takového testování jsou ukázány v Tabulce D.

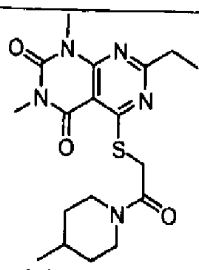
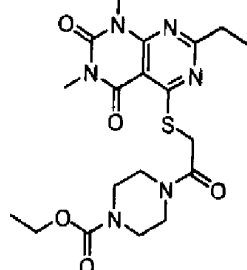
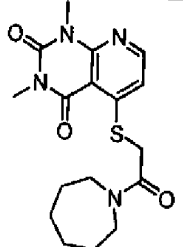
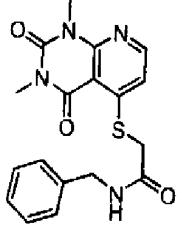
Tabulka D

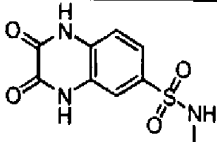
Sloučenina č.	Sloučenina	hT2R14 IC_{50} (μM)
6-5	N-(benzo[d][1,3]dioxol-5-yl)-1,3-dimethyl-2,4-dioxo-1,2,3,4-tetrahydrochinazolin-6-sulfonamid	0,264
6-6	N-(2,3-dihydrobenzo[b][1,4]dioxin-6-yl)-1,3-dimethyl-2,4-dioxo-1,2,3,4-tetrahydrochinazolin-6-sulfonamid	0,706
6-7	N-(3-fluor-2-methylphenyl)-1,3-dimethyl-2,4-dioxo-1,2,3,4-tetrahydrochinazolin-6-sulfonamid	0,935

Sloučenina č.	Sloučenina	hT2R14 IC ₅₀ (μM)
6-8	 N-(2,6-dimethylphenyl)-1,3-dimethyl-2,4-dioxo-1,2,3,4-tetrahydroquinazolin-6-sulfonamid	
6-9	 1,3-dimethyl-2,4-dioxo-N-o-tolyl-1,2,3,4-tetrahydroquinazolin-6-sulfonamid	1,726
6-10	 N-(4-fluorophenyl)-1,4,7-trimethyl-2,3-dioxo-1,2,3,4-tetrahydrochinoxalin-6-sulfonamid	12,623
6-11	 N-ethyl-N-m-tolyl-2-(N,1,4-trimethyl-2,3-dioxo-1,2,3,4-tetrahydrochinoxalin-6-sulfonamido)acetamid	14,926
6-12	 Kyselina (Z)-3-(4-oxo-2-thioxo-5-(2,4,6-trimethoxybenzyliden)thiazolidin-3-yl)propanová	9,371
6-13	 Kyselina (Z)-3-(5-(3,5-dimethoxybenzyliden)-4-oxo-2-thioxothiazolidin-3-yl)propanová	5,378
6-14	 (E)-3-(benzo[d][1,3]dioxol-5-yl)-2-kyano-N-(5-fenyl-1,3,4-thiadiazol-2-yl)akrylamid	2,906

Sloučenina č.	Sloučenina	hT2R14 IC ₅₀ (μM)
6-15	 7-cyklopentyl-1,3-dimethyl-5-(2-oxopropylthio)pyrimido[4,5-d]pyrimidin-2,4(1H,3H)-dion	5,428
6-16	 N-cyklohexyl-1,3-dimethyl-2,4-dioxo-1,2,3,4-tetrahydrochinazolin-6-sulfonamid	7,239
6-17	 N-(2-kyano-3,5-dimethylfenyl)-1,3-dimethyl-2,4-dioxo-1,2,3,4-tetrahydrochinazolin-6-sulfonamid	1,946
6-18	 N-(3-fluor-2-methylfenyl)-1,3-dimethyl-2,4-dioxo-1,2,3,4-tetrahydrochinazolin-6-sulfonamid	0,935
6-19	 N-(2,3-dimethylquinoxalin-6-yl)-1,4-dimethyl-2,3-dioxo-1,2,3,4-tetrahydroquinoxalin-6-sulfonamid	6,332

Sloučenina č.	Sloučenina	hT2R14 IC ₅₀ (μM)
6-20	 1,3-dimethyl-2,4-dioxo-N-o-tolyl-1,2,3,4-tetrahydrochinazolin-6-sulfonamid	1,726
6-22	 N-ethyl-N-methyl-2-(2,6,8-trimethyl-5,7-dioxo-5,6,7,8-tetrahydropyrimido[4,5-d]pyrimidin-4-ylthio)acetamid	0,861
6-23	 N-(4-chlor-2-fluorfenyl)-1,3-dimethyl-2,4-dioxo-1,2,3,4-tetrahydrochinazolin-6-sulfonamid	9,703
6-24	 1,3,7-trimethyl-5-(2-oxo-2-(piperidin-1-yl)ethylthio)pyrimido[4,5-d]pyrimidin-2,4(1H,3H)-dion	0,292
6-25	 1,3,7-trimethyl-5-(2-morpholino-2-oxoethylthio)pyrimido[4,5-d]pyrimidin-2,4(1H,3H)-dion	1,006

Sloučenina č.	Sloučenina	hT2R14 IC ₅₀ (μM)
6-26	 7-ethyl-1,3-dimethyl-5-(2-(4-methylpiperidin-1-yl)-2-oxoethylthio)pyrimido[4,5-d]pyrimidin-2,4(1H,3H)-dione	0,721
6-27	 Ethyl-(4-(2-(2-ethyl-6,8-dimethyl-5,7-dioxo-5,6,7,8-tetrahydropyrimido[4,5-d]pyrimidin-4-ylthio)acetyl)piperazin-1-yl)karboxylát	0,763
6-28	 5-(2-(azepan-1-yl)-2-oxoethylthio)-1,3-dimethylpyrido[2,3-d]pyrimidin-2,4(1H,3H)-dione	2,377
6-29	 N-benzyl-2-(1,3-dimethyl-2,4-dioxo-1,2,3,4-tetrahydropyrido[2,3-d]pyrimidin-5-ylthio)acetamid	0,710

Sloučenina č.	Sloučenina	hT2R14 IC ₅₀ (μM)
6-30	 N-methyl-2,3-dioxo-1,2,3,4-tetrahydrochinoxalin-6-sulfonamid	6,234

Tabulka 7: Reprezentativní výsledky screeningu proti 23 receptorům hořkosti.

[00464] U sloučenin z Příkladů 5 a 6 výše se provedl screening proti sadě 23 receptorů hořkosti. Receptory hořkosti se aktivovaly na EC₈₀ odpovídajícím agonistou, pak se na ně nechaly působit sloučeniny výše o koncentraci 25 μM. Výsledky jsou shrnuty v tabulce níže.

80% nebo vyšší inhibice = ++++

60% až 80% inhibice = +++

40% až 60% inhibice = ++

20% až 40% inhibice = +

Prilad	1	3	4	5	7	8	9	10	13	14	16	44	51	54	55	61	63	64	65	67	71	75
5-51		++	+		+					++++	+	++			+++	++++	+++	++	+		++	+
5-25			+							+++							+++	++				
5-53			+		+					++							++	+				
5-22		++	++		+					++++	+	++				+++	++++	+++	++			+
5-11		+++	+++	+	++			+	++	++++	++	+++				++++	++++	+++	++		+	+
5-24			+		+											++	++++	+++	++	+	+	+++
5-37			+++	+	+					++++	+	+				++++	+	+	+++			+
5-30	+	++	275	+	+			+	++	+	++++	+	+++		+	++++	+	+++				+
5-60																++	++++	++++	+	+	+++	+
5-46		+			+					++++	+	++			+	++++	+++	+		++	++	++
5-59																++	+++	++		++	++	++
5-47		+														++	+					+
5-28										+	++++	+	+	++	+	++++	++	++++			+	+
5-1		+++		++	++			+	+++	+	++++	+++	+++	+++	+	+++	++	++++	+++	+	++	+
5-54		+														+++	++++	++++	+++	+++	++	++
5-5		++		+	++				+	+	++++	++	++	+	+	++++	++++	++++	+++		+	+
5-56		+														+++	++++	++++	+++	+	+	+++
5-49		+														+++	+++	+	+			+
5-20		++++		+	+			+	++	+	++++	++	+++			++++	+++	++	++		+	+
5-21		+	+							+++	+	++				++++	++++	++	+++	+	++	++
5-3		++	+++					+	++	++++	+	++			+	+++	+++	+				+
5-8		+	++						++	++++	+	++	+	++	+	++++	++	+++	++++	+		+
5-4			+						++	++++	+	++	++	+	+	++++	+++	++	++++	++		+
5-29									++	++						++++	+	+++	++++			+
5-2		++	+	+	++			+++		++++	+++	+++	++	+	+	++++	+++	+++	++	+	+	+++
5-7		+	+		+			+		++		++		+	+	++++	++++	++++	+++	+	+	+++
5-9		+	+		+					++		++		+	+	++++	++++	++++	++++	+	++	+
5-35		+		+	+			++		++++	+	++	++	+	+	++++	++++	++++	++++	+	++	+
5-81		+						+		++++	+	++	+	+	+	+++	++++	+++	+		++	+
5-55		+		+						++++	+	++	+			+++	+++	+++	++	+	+	+
5-61				+						++++						++	+	++++	++			
5-63		+		+												+	++	++++	+			+
5-62		+		+	+	+										+++	+++	+++	++	+	+	+
5-76		+		+												+++	++	++++	++		+	+
5-77		++		+	+	+		+								++	++	++	++	+	+	+
5-78		+		+				+		++++	+	+	++	++	++	++	+++	+++	++	++	+	+
5-80		++		+	+			+		++++	+	+	+	+	+	+++	+++	+++	++	+++	+	+
5-79		++		+				+		++++	+	++	+++	+	+	+++	+++	+++	+++	++	+	+++
5-69		+		+	+	+		+		++++	+	++	+++	+	+	+++	+++	+++	+++	++	+	+++
5-70		++		++	+	+		++		+++	++	+	++	++	++	+++	+++	+++	++		+	+
5-48										+++	++	+	++	++	++	+++	++	+++	++	++	+	+
5-75				+												++++	+++					+
5-72		+		++				+	+	++++	+	+	+	+	++	+++	+++	+	+	+	+	++
5-71		+		+	+			+		++++	+	+	+	+	++	+++	+++	+	+	+	+	++
5-73		++		+	+			++		++++	+		++	+++	++	+++	+++	+	++	+	+	+
5-74		+		+	+			++		++++	+		++	+++	++	+++	+++	+	++	+	++	+
5-1		+++		++	++			+++	+	++++	++	++	++	++	+++	++++	++++	+	++	+	+++	+
5-1		+++		++	++	+	+	+++	+	++++	++	++	+++	+	+++	++++	++++	+	+++	+	+++	+
5-65		+						+		++++	+	++	+	+	+	++++	+++	++++	+++	+++	++	++
5-68		+		++	+			+		++++	+	++	+	+	+	++++	+++	++++	+++	+	+	+++
5-64		+			+	+		+		++++	+	+	+	+	+	++++	+++	++++	+++	+	+	+++
5-34			734	++	+			++		++++	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
5-67		++		+				++		+++	+	++		++	+++	+++	+++	+++	+++	++	+	+++
5-31		+						+								++	+++	++	++++	+++	+	++
5-66		+																				
5-14	+	++++		+++	+++	+	+	++++	+	++++	+++	+++	+++	+++	+++	++++	++++	+++	+++	+++	+++	+++
5-23		+++		+	++		+	++++	+	++++	++	+++	+++	+++	+++	++++	++++	+++	+++	+++	+++	+++
5-18								+++								+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++
5-19								+		++++	++	+++		++	+++	+++	+++	+++	+++	+		++
5-25		+++		++	++			+	+++	++++	++	+++	+	+++	+++	+++	+++	+++	+++	++	+	+++
5-38	+															+++	+++	+++	+++	+++	++	+++
5-82																+++	+++	+++	+++	+++	+	+
5-10		+++	477		++		++	++++	++	++++	++++	++	++++	++++	++++	++++	++++	+++	++++	+++	+++	+
5-12		+++	371	++	++		++	++++	+	++++	+++	+++	+++	+++	+++	++++	++++	+++	++++	+++	+++	+
5-1		+++	201	++	++		+	+++	+	++++	+++	+	++++	+++	+++	++++	++++	+++	++++	+++	+++	+
5-83		++		+	+			++		++++	++	+	++	++	++	++++	+++	+	++++	++	+	+
5-84		++		+				+		++++	+	+	+++	++	++	++++	+++	+	++++	++	+	++
5-85		++		+	+			++	+	++++	++		+	+++	++	++++	+++	+	++++	++	+	+
5-87																++	+	+	++	++	+	+
5-88		+	345							+	+					++	+	+	++	++	+	+

Příklad	1	3	4	5	7	8	9	10	13	14	16	44	51	54	55	61	63	64	65	67	71	75
5-89	++			+	++		+	+++	+	++++	+	+++	++++	+	++++	++++	++++	++++	++++	+	+++	+
5-90	++			+	+++			++		++++	+	+++			+++	++++	++++	+++	++		+++	+
5-86										+												
5-88	+++			+	+++			+++		++++	+	+++	+	+++	+++	++++	++++	+++	++++	+	++++	+
5-17	+							+++		++++	+	+++		++	++++	++++	++++	++++	++		++	+
5-37	+									++++	+	+++			+++	+++	+++	+++	++		++	+
5-1	++++			+	++		+	++++	+	++++	++	+++	+++	++	++++	++++	++++	++++	++	+	++++	++
5-16	++			+				+		+					+++	+++	+++	+++	++	+	++++	++
5-92	+			+	+			+		++++	+	++++			++++	+++	++	++++			++	+
5-81	+++			+				++		++++	+	+++			++++	++++	++++	++++			++	
5-1	+++	+	++	++			++	+++	+	+++	++	+++	++	++	++++	++++	++++	++++	++	+	+++	+
5-13	++			+			+	+		++++	+	+++	+	+++	++++	++++	++++	++++	+	+	++	+
5-15	+			+	+		+	++		+++	+	+++	+	+++	++++	++++	++++	++++	++		++	
5-19	+			+				+		++++	+	++		+	++++	+++	++	++			++	
5-16	+++	+		+			+	+		+++	+	+++			++++	+++	++	++			++	
5-1	+++	++	+	++			++	+++	+	+++	++	+++	++	++	++++	++++	+++	+++	+		+++	++
5-17	+	+							+	+++					++	+++	+++	++	++	++	++	++
5-1	++			++	++			++	+	+++	+++	+++	+++	+++	++	+++	+++	+++	++	++	++	+
5-30	++	388	+	+				++	+	++++	++	+++	++	+++	++++	++++	++++	++++	++	++	+++	+
5-96	+							+	+	++++	+	+++			++++	++++	++++	++++	++	++	+++	
5-95	++			+	+			+		++++	++	+++	+		++++	++++	++++	++++	+++	+++	++	+
5-97										++++	++	+++	+		++++	++++	++++	++++	+++	+++	++	+
5-50	++	568	+	+				+	+	++++	++	+++	+		++++	++++	++++	++++	++	++	+++	
5-98	+	++								+++		+++			++++	++++	++++	++++	++	++	+++	
5-1	+++			+	++		+	+++	+	++++	++	+++	+++	++	++++	++++	++++	++++	+++	++	+++	+
5-48	++	410	+					+++		++++	+	+++		++	++++	++++	++++	++++	++	++	+++	+
5-57	+							+		+++		+++			+++	+++	+++	+++	++	++	+++	
5-1	+++			+	+		+	+++	+	++++	++	+++	+++	++	++++	++++	++++	++++	++	++	+++	+
5-94	+									+++		++				+	+++	+++			++	+
5-107										+++		+			+	+++	+++	+++			++	+
5-45	++									++++	+	++			++	++++	++++	+++	+		++	
5-44	+									++++		++			++	++++	++++	+++	+		++	
5-43	+	+								++++	+	++			+	++++	++++	++			++	
5-42	+									++++	+	++			+	++++	++++	+++			++	
5-40	+	+	+					++		++++	+	+++	+	+	++++	++++	++++	+++			++	+
5-41	++	332	+					++	+	++++	+	+++	+	+	++++	++++	++++	+++			++	
5-1	++	++	++	++			+	+++	+	++++	++	+++	+++	++	++++	++++	++++	+++			++	
5-33	++	++	++	++			+	+++	+	++++	++	+++	+++	++	++++	++++	++++	+++	+++	++	+++	+
5-23	+++	++	++	++	++		++	+++	+	++++	+++	+++	+++	+++	++++	++++	++++	++++	+++	+++	+++	++
5-27	++			+				+++	+	++++	+	+++	++	++	++++	++++	+++	+++	+++	+++	+++	++
5-26		++		+				+++	+	++++	+	+++	++	++	++++	++++	+++	+++	+++	+++	+++	++
5-83	+	++	+	+				++		++++	++	+++	+++	+++	++++	++++	++++	++++	++	++	+++	+
5-99		310	+							++++	+	+++			+	++++	++++	+++	++	++	+++	
5-105	+	+	+	+				+		++++	++	++		+	++++	++++	+++	++	++	+++	++	
5-104	++	++	++	++			+	++		++++	++	+++	+	+	++++	++++	+++	+++	+++	+++	++	+
5-1	++	++	++	++			+	+++		++++	++	+++	++	++	++++	++++	+++	+++	+++	+++	+++	++
5-103	++	++	+	+				+		++++	++	+++	++	++	++++	++++	+++	+++	+++	+++	+++	++
5-102	++	++	+	++				+		++++	+	+++	+	++	++++	++++	+++	+++	+++	+	+++	+
5-101	+++	++	++	+++			+	+++		++++	++	+++	++	++	++++	++++	+++	+++	+++	+++	+++	++
5-100	+	++	+	+			+	+		+++	+	+++	++	++	++++	+++	+	++++	+++	+++	+++	++
5-1	++	+	+	++			+	+++	+	++++	++	+++	+++	++	++++	+++	+	++++	+++	+++	+++	+
5-93	+++	++++	+	++			+	+++	+	++++	++	+++	+++	+++	++++	++++	++++	++++	+++	+++	+++	+
5-36	++			+				+		++++	+	+++	++	++	++++	++++	++++	++++	+++	+++	+++	++
5-106										++++	+	++		+	++++	+++	+++	+++	++		+++	
5-108	++	+++	+	+				++		++++	+	+++	++	+	++++	++++	+++	+++	+++	++	+++	+
5-109	++	++		+				++	+	++++	+	+++	++	+	++++	++++	+++	+++	+++	++	+++	++
5-110	++	+++	+	++	+	+	++	+		++++	+	+++	++	+	++++	++++	+++	+++	+++	++	+++	++
6-2			33							++++		++			+	++++	+++	+++	+++	++	+++	++
6-9				++						++++		+				+	+					
6-3									+	++++		+				+	+					
6-6										+						+						+
6-7				+						++												
6-11				+	+					++												
6-10	+			+	+					++	++										+	
6-4				+						++++	++++		+									
6-5			717							++++	++					+	++++	270	++		+++	
6-1	+		388		932			++++		++++	+	++			+	+	++++	++		+	+++	
6-6			892							++++		++			+	210		447	+		+	+

*

Příklad 7. Senzorická data Příkladu 10-10.

[00465] Aby se stanovila účinnost jednotlivého agonisty, provedly se chuťové testy se specifickým agonistou T2R8, sloučeninou, která nás zajímá, a referenčním blokátorem hořkosti. Již dříve jsme popsali dobrého antagonistu hT2R8, u kterého se potvrdilo, že působí na chuť, Příklad 4-8 z U.S. přechodné přihlášky ser. č. 60/957129, podané 21. srpna 2007: N-(1-((3,5-dimethylizoxazol-4-yl)methyl)-1H-pyrazol-4-yl)benzo[d][1,3]dioxol-5-karboxamid. Ukázalo se, že snižuje hořkost kávy sám o sobě a ve spojení se širokým spektrem blokátorů hořkosti. Jak je ukázáno v Tabulce 6, když se srovná s našim kontrolním antagonistou (Příklad 10-8), antagonistu hT2R8 z Příkladu 10-10 vykazuje vyšší schopnost blokovat vnímanou hořkost.

příklad číslo	HTS test IC ₅₀	vybraný jako více hořký		p hodnota	konc. antagonisty
	μM	10-8	+ jiné		μM
10-10	0,02-0,04	14	2	0,004	1

Tabulka 6. Výsledky chuťového testu porovnávající kontrolní blokátor hořkosti a silnější blokátor hořkosti 10-10.

[00466] Jak ukázaly chuťové testy tohoto příkladu, vnímání hořkosti může být sníženo nebo eliminováno včleněním antagonisty hT2R8, přičemž antagonistu z Příkladu 10-10 se zdá být silnějším analogem ve srovnání se známými antagonisty hořkosti jako je N-(1-((3,5-dimethylizoxazol-4-yl)methyl)-1H-pyrazol-4-yl)benzo[d][1,3]dioxol-5-karboxamid (7767). To vede k tomu, že vnímání hořkosti může být sníženo nebo eliminováno včleněním antagonistů hT2R8 do kompozic, jako jsou potraviny, nápoje a/nebo léky, kde je hořká chuť vyvolaná agonisty T2R8.

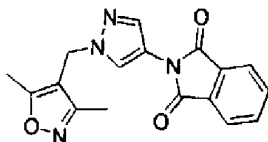
Příklad 8. Identifikace antagonistů hT2R8

[00467] K identifikaci antagonistů se vytvořily buněčné linie stabilně exprimující hT2R8 spolu s promiskuitním chimérickým Glg44 proteinem, jak bylo popsáno v dřívějších přihláškách vynálezu. Byl proveden vysokopropustný test (HT) za použití stabilních buněčných linií a FLIPR (čtečky desky zobrazující fluorescenci). Použil se agonista hT2R8 k

aktivaci receptorů nejvýše 70-80 % jejich příslušné maximální aktivity. Pro hT2R8 se použil agonista andrografolid (200 μ M). K identifikaci antagonistů se přidaly sloučeniny s rozličnou chemickou strukturou spolu s antagonistou. Sloučeniny, které způsobily statisticky nejvýznamnější snížení aktivity receptoru, se spojily a znovu ověřily inhibičními křivkami v závislosti na dávce. Scaffold A a scaffold B jsou identifikovány jako hT2R8 antagonisté (Obr. 1). Specifické příklady jsou uvedeny v Tabulce 1.

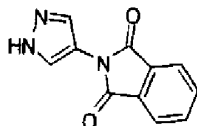
Příklad 9. Antagonisté hT2R8

Příklad 9-1: 2-(1-((3,5-dimethylizoxazol-4-yl)methyl)-1H-pyrazol-4-yl)izoindolin-1,3-dion.



[00468] 2-(1H-pyrazol-4-yl)izoindolin-1,3-dion (Příklad 9-1a) (1,5 g, 7 mmol), 4-(chloromethyl)-3,5-dimethylizoxazol (1,5 g, 10 mmol) a uhličitán cesný (3,3g, 10 mmol) se míchaly v DMF (20 ml) při 80 °C po dobu 3 hodin. Reakční směs se ochladila, zředila se H₂O (150 ml) a extrahovala se ethylacetátem (3x, 75 ml). Spojené organické extrakty se vysušily nad síranem sodným, zfiltrovaly se a koncentrovaly se na rotační odparce. Pevný produkt se třel s ethylacetátem/hexany (1/9) a překrystalizoval se z refluxujícího absolutního ethanolu (30 ml), což dalo 2-(1-((3,5-dimethylizoxazol-4-yl)methyl)-1H-pyrazol-4-yl)izoindolin-1,3-dion (900 mg, 38%) jako jasnou, světle žlutou pevnou látku. ¹H NMR (DMSO-d₆, 400 MHz) 1,36 (d, 3H, $J_{2,16}$ (s, 3H), 2,41 (s, 3H), $J_{2,16}$ =7,2 Hz), 5,22 (s, 2H), 7,81 (s, 1H), 7,91-7,83 (m, 4H), 8,21 (s, 1H). MS M+H vypočteno 323,11; nalezeno 323,1, teplota tání: 170-171 °C, ukázalo se, že titulní sloučenina inhibuje hT2R8 receptor hořkosti a měla IC₅₀ 0,18 μ M.

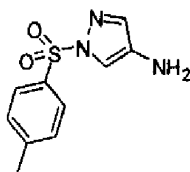
Příklad 9-1a: 1-tosyl-1H-pyrazol-4-amin.



[00469] 1-Tosyl-1H-pyrazol-4-amin (Příklad 9-1b) (3 g, 12,7 mmol) a izobenzofuran-1,3-dion (1,9 g, 13 mmol) se míchaly v DMF/acetonitrilu (1/1) (20 ml) při 100 °C po dobu 1

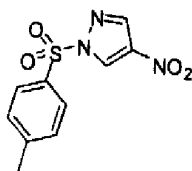
hodiny. Směs se ochladila a zředila se H_2O . Sraženina se sebrala filtrací, promyla se další vodou, následována ethylacetátem a hexany. Pevný produkt se vysušil za vysokého vakua, což dalo 2-(1H-pyrazol-4-yl)izoindolin-1,3-dion (2,5 g, 92%) jako žlutou pevnou látku. MS $\text{M}+\text{H}$ vypočteno 214,1; nalezeno 214,1. ^1H NMR (CDCl_3 , 400 MHz) δ 7,93-8,10 (m, 6H), 13,03 (bs, 1H).

Příklad 9-1b: 1-tosyl-1H-pyrazol-4-amin.



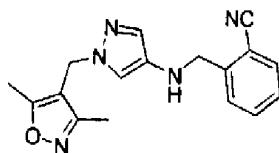
[00470] 4-Nitro-1-tosyl-1H-pyrazol (Příklad 9-1c) (3 g, 11,2 mmol) a 10 % paladium na uhlíku (800 mg) v MeOH (150 ml) se míchaly pod 202,65 kPa (2 atmosférami) vodíku v Parrově hydrogenátoru po dobu 3 hodin. Směs se zfiltrovala přes celit, koncentrovala se a přečistila se pomocí chromatografie na silikagelu (80% ethylacetát v hexanech), což dalo 1-tosyl-1H-pyrazol-4-amin (1,9 g, 71%) jako růžovou pevnou látku. ^1H NMR (CDCl_3 , 400 MHz) δ 2,40 (s, 3H), 3,01 (bs, 2H), 7,29 (d, 2H, $J=8$ Hz), 7,41 (d, 1H, $J=1,2$ Hz), 7,53 (d, 1H, $J=1,2$ Hz), 7,81 (d, 2H, $J=8$ Hz).

Příklad 9-1c: 4-nitro-1-tosyl-1H-pyrazol.



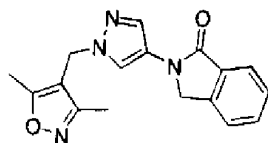
[00471] 4-Nitro-1H-pyrazol (500 mg, 4,4 mmol), 4-methylbenzen-1-sulfonylchlorid (840 mg, 4,4 mmol) a triethylamin (510 mg, 5 mmol) se míchaly v DMF (25 ml) při 80 °C po dobu 1 hodiny. Reakční směs se ochladila, zředila se H_2O (200 ml) a extrahovala se ethylacetátem (3x, 100 ml). Organická fáze se promyla vodným 1N HCl (200 ml) a H_2O (200 ml), vysušila se nad síranem sodným, zfiltrovala se a koncentrovala se na rotační odparce. Pevná látka se třela s hexany, což dalo 4-nitro-1-tosyl-1H-pyrazol (600 mg, 50%) jako ne zcela bílou pevnou látku. ^1H NMR ($\text{DMSO}-d_6$, 400 MHz) δ 2,40 (s, 3H), 7,52 (d, 2H, $J=8,4$ Hz), 7,98 (d, 2H, $J=8,8$ Hz), 8,57 (s, 1H), 9,58 (s, 1H).

Příklad 9-2: 2-((1-((3,5-dimethylizoxazol-4-yl)methyl)-1H-pyrazol-4-ylamino)methyl)-benzonitril



[00472] 1-((3,5-Dimethylisoxazol-4-yl)methyl)-1H-pyrazol-4-amin-hydrochlorid (100 mg, 0,44 mmol), 2-(bromomethyl)benzonitril (115 mg, 0,6 mmol) a triethylamin (0,5 ml, 3,5 mmol) v DMF (3 ml) se ozařovaly a míchaly v mikrovlnném reaktoru při 80 °C po dobu 10 minut. Reakční směs se ochladila, zředila se H₂O (50 ml) a extrahovala se ethylacetátem (3x, 30 ml). Spojené organické extrakty se vysušily nad síranem sodným a koncentrovaly se na rotační odparce. Zbytek se rozpustil v ethanolu (70 ml), H₂O (3 ml) a kyselině octové (1 ml) a směs se refluxovala po dobu 2 hodin. Roztok se koncentroval na rotační odparce, sebral se do methanolu (3 ml) a přečistil pomocí reverzní fázové HPLC ve třech 1 ml podílech (5 až 95% acetonitril v H₂O: 16 minutový gradient). Čistě frakce se spojily a koncentrovaly na rotační odparce. Zbytek se třel s ethylacetátem/hexany (1/9), což dalo 2-((1-((3,5-dimethylisoxazol-4-yl)methyl)-1H-pyrazol-4-yl)izindolin-1-on (85 mg, 61%) jako čistou bílou pevnou látkou. ¹H NMR (DMSO-d₆, 400 MHz); δ: 1,8 (s, 3H), 2,43 (s, 3H), 4,97 (s, 2H), 5,18 (s, 2H), 7,58-7,68 (m, 3H), 7,77 (s, 1H), 8,10 (d, J= 8 Hz, 1H), 8,27 (s, 1H), 9,19 (bs, 1H). Titulní sloučenina vykazovala inhibici hT2R08 receptoru hořkosti a měla hodnotu IC₅₀ vyšší 30 μM.

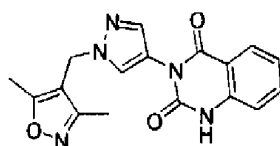
Příklad 9-3: 2-((1-((3,5-dimethylizoxazol-4-yl)methyl)-1H-pyrazol-4-yl)izindolin-1-on



[00473] 2-((1-((3,5-Dimethylisoxazol-4-yl)methyl)-1H-pyrazol-4-ylamino)methyl)benzonitril (Příklad 9-2) (30 mg, 0,14 mmol) se míchal ve směsi MeOH/ 2N vodného NaOH (5 ml) při 100 °C po dobu 30 minut v mikrovlnném reaktoru. Reakční směs se okyselila 1N vodnou HCl (100 ml) a extrahovala se ethylacetátem (3x, 70 ml). Spojené organické extrakty se vysušily nad síranem sodným a koncentrovaly. Zbytek se rozpustil v MeOH (3 ml) a přečistil pomocí reverzní fázové HPLC ve dvou 1,5 ml podílech (5 až 95% acetonitril v H₂O: 16

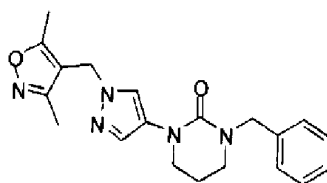
minutový gradient). Čisté frakce se spojily a koncentrovaly se, což dalo 2-(1-((3,5-dimethylizoxazol-4-yl)methyl)-1H-pyrazol-4-yl)izoindolin-1-on (21 mg, 50%) jako čistou bílou pevnou látku. ^1H NMR (DMSO- d_6 , 400 MHz): δ 2,15 (s, 3H), 2,41 (s, 3H), 4,81 (s, 2H), 5,17 (s, 2H), 7,48-7,50 (m, 1H), 7,51-7,52 (m, 2H), 7,72 (d, J = 7,2 Hz, 1H), 7,75 (s, 1H), 8,20 (s, 1H). Titulní sloučenina vykazovala inhibici hT2R08 receptoru hořkosti a měla IC_{50} 11 μM .

Příklad 9-4: 3-(1-((3,5-dimethylizoxazol-4-yl)methyl)-1H-pyrazol-4-yl)chinazolin-2,4(1H,3H)-dion



[00474] Hydrochlorid 1-((3,5-dimethylizoxazol-4-yl)methyl)-1H-pyrazol-4-aminu (75 mg, 0,33 mmol), methyl-(2-izocyanatobenzoát) a triethylamin (200 mg, 2 mmol) v acetonitrilu (3 ml) se ozařovaly v mikrovlnném reaktoru při 100 °C po dobu 30 minut. Reakční směs se ochladila, zředila se H_2O (75 ml) a extrahovala se ethylacetátem (3x, 50 ml). Spojené organické extrakty se vysušily nad síranem sodným, zfiltrovaly se a koncentrovaly se na rotační odparce. Zbytek se přečistil chromatografií na silikagelu (75% ethylacetát v hexanech), což dalo 3-(1-((3,5-dimethylizoxazol-4-yl)methyl)-1H-pyrazol-4-yl)chinazolin-2,4(1H,3H)-dion (20 mg, 18%) jako světle růžovou pevnou látku. ^1H NMR (DMSO- d_6 , 400 MHz): δ 2,16 (s, 3H), 2,40 (s, 3H), 5,17 (s, 2H), 7,17-7,22 (m, 2H), 7,50 (s, 1H), 7,66 (dt, J = 8, 1,2 Hz, 1H), 7,92 (d, J = 6,8 Hz, 1H), 7,95 (s, 1H), 11,52 (bs, 1H). Titulní sloučenina vykazovala inhibici hT2R08 receptoru hořkosti a měla IC_{50} 1,5 μM .

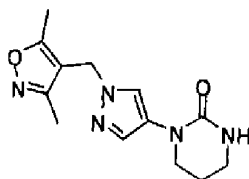
Příklad 9-5: 1-benzyl-3-(1-((3,5-dimethylizoxazol-4-yl)methyl)-1H-pyrazol-4-yl)tetrahydropyrimidin-2(1H)-on



[00475] 1-(1-((3,5-Dimethylizoxazol-4-yl)methyl)-1H-pyrazol-4-yl)tetrahydropyrimidin-2(1H)-on (Příklad 9-5a) (50 mg, 0,18 mmol) a 60% hydrid sodný (8 mg, 0,20 mmol) v DMF (3 ml) se míchaly při teplotě místnosti po dobu 15 minut, pak se ochladily na 0 °C. Do

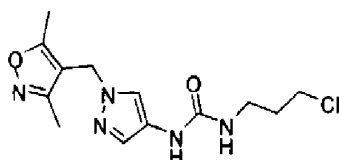
směsi se přidal benzylbromid (31 mg, 0,18 mmol) a nechal se ohřát, pak se míchal po dobu 2 hodin. Reakce se ukončila methanolem a koncentrovala se. Reakční směs se zředila solankou (50 ml) a extrahovala se dichlormethanem (2x, 50 ml). Spojené organické extrakty se vysušily nad síranem hořečnatým, zfiltrovaly se a koncentrovaly se na rotační odparce. Zbytek se sebral do dichlormethanu (5 ml) a přečistil se pomocí chromatografie na silikagelové koloně (100% až 90% dichlormethan v methanolu: 30 minutový gradient), což dalo 1-benzyl-3-(1-((3,5-dimethylizoxazol-4-yl)methyl)-1*H*-pyrazol-4-yl)tetrahydro-pyrimidin-2(1*H*)-on (20 mg, 30%) jako bílou pevnou látku. ¹H NMR (DMSO-*d*₆, 400 MHz): δ 1,85–1,91 (m, 2H), 2,10 (s, 3H), 2,37 (s, 3H), 3,12 (m, 2H), 3,55 (t, *J* = 5,8 Hz, 2H), 4,48 (s, 2H), 5,05 (s, 2H), 7,22–7,31 (m, 5H), 7,49 (s, 1H), 7,84 (s, 1H). LC/MS; [M+H] vypočteno pro C₂₀H₂₃N₅O₂; očekáváno 366,19; nalezeno 366,15. Titulní sloučenina vykazala inhibici hT2R08 receptoru hořkosti a měla IC₅₀ 1,65 μM.

Příklad 9-5a: 1-(1-((3,5-dimethylizoxazol-4-yl)methyl)-1*H*-pyrazol-4-yl)tetrahydro-pyrimidin-2(1*H*)-on



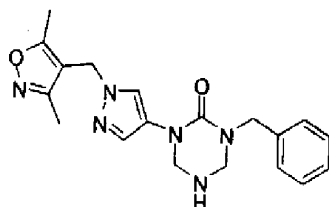
[00476] 1-(3-Chlorpropyl)-3-(1-((3,5-dimethylizoxazol-4-yl)methyl)-1*H*-pyrazol-4-yl)močovina (Příklad 9-5b) (200 mg, 0,64 mmol) a 60% hydrid sodný (28 mg, 0,71 mmol) v DMF (2 ml) se míchaly při 0 °C po dobu 15 minut, pak se ponechaly ohřát na teplotu místnosti a míchaly se po dobu 2 hodin. Reakční směs se ukončila methanolem a koncentrovala se. Reakční směs se zředila solankou (50 ml) a extrahovala se dichlormethanem (2x, 50 ml). Spojené organické extrakty se vysušily nad síranem hořečnatým, zfiltrovaly se a koncentrovaly se. Zbytek se sebral do dichlormethanu (5 ml) a přečistil pomocí chromatografie na silikagelové koloně (100% až 90% dichlormethan v methanolu: 30 minutový gradient), což dalo 1-(1-((3,5-dimethylizoxazol-4-yl)methyl)-1*H*-pyrazol-4-yl)-tetrahydropyrimidin-2(1*H*)-on (84 mg, 48%) jako bílou pevnou látku. ¹H NMR (DMSO-*d*₆, 400 MHz): δ 1,85–1,91 (m, 2H), 2,10 (s, 3H), 2,37 (s, 3H), 3,12 (m, 2H), 3,48 (t, *J* = 6,0 Hz, 2H), 5,05 (s, 2H), 6,57 (s, 1H), 7,46 (s, 1H), 7,80 (s, 1H). LC/MS; [M+H] vypočteno pro C₁₃H₁₇N₅O₂; očekáváno 276,14; nalezeno 276,10.

Příklad 9-5b: 1-(3-chlorpropyl)-3-(1-((3,5-dimethylizoxazol-4-yl)methyl)-1H-pyrazol-4-yl)močovina



[00477] 1-((3,5-Dimethylizoxazol-4-yl)methyl)-1H-pyrazol-4-amin (342mg, 1,78 mmol) a 2-chlorpropyl-(izokyanát) (213 mg, 1,78 mmol) v acetonitrilu (5 ml) se zahřívaly při 65 °C po dobu 16 hodin. Reakční směs se ochladila na teplotu místnosti, koncentrovala a zbytek se rozpustil v dichlormethanu (5 ml) a přečistil pomocí chromatografie na silikagelové koloně (100% až 90% dichlormethan v methanolu: 30 minutový gradient). Čisté frakce se spojily a koncentrovaly, pak se třely s ethylacetátem/hexany (1/9), což dalo 1-(3-chlorpropyl)-3-(1-((3,5-dimethylizoxazol-4-yl)methyl)-1H-pyrazol-4-yl)močovinu (218 mg, 39%) jako bílou pevnou látku. LC/MS; [M+H] vypočteno pro $C_{12}H_{16}ClN_5O_2$; očekáváno 298,10; nalezeno 298,10.

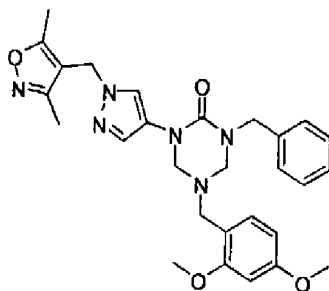
Příklad 9-6: 1-benzyl-3-(1-((3,5-dimethylizoxazol-4-yl)methyl)-1H-pyrazol-4-yl)-1,3,5-triazinan-2-on



[00478] 1-Benzyl-5-(2,4-dimethoxybenzyl)-3-(1-((3,5-dimethylizoxazol-4-yl)methyl)-1H-pyrazol-4-yl)-1,3,5-triazinan-2-on (Příklad 9-6a) (44 mg, 0,09 mmol), anizol (9 mg, 0,09 mmol) a 50% roztok kyseliny trifluoroctové/dichlormethanu (1 ml) v dichlormethanu (1 ml) se smíchaly při teplotě místnosti po dobu 2 hodin. Reakční směs se koncentrovala, ukončila se nasyceným hydrogenuhlíčanem sodným (50 ml), extrahovala se ethylacetátem (2x, 50 ml) a promyla se solankou (50 ml). Spojené organické extrakty se vysušily nad síranem hořečnatým, zfiltrovaly a koncentrovaly se. Přečištění chromatografií na silikagelové koloně (100% až 90% dichlormethan v methanol: 30 minutový gradient) dalo 1-benzyl-3-(1-((3,5-dimethylizoxazol-4-yl)methyl)-1H-pyrazol-4-yl)-1,3,5-triazinan-2-on (19 mg, 62%) jako bílou pevnou látku. LC/MS; [M+H] vypočteno pro $C_{19}H_{22}N_6O_2$; očekáváno 367,18;

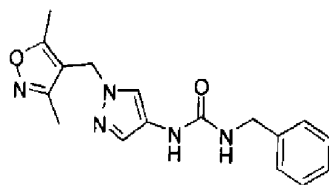
nalezeno 367,20. Titulní sloučenina vykazala inhibici hT2R08 receptoru hořkosti a měla IC_{50} 5,84 μ M.

Příklad 9-6a: 1-benzyl-5-(2,4-dimethoxybenzyl)-3-(1-((3,5-dimethylizoxazol-4-yl)-methyl)-1H-pyrazol-4-yl)-1,3,5-triazinan-2-on



[00479] 1-Benzyl-3-(1-((3,5-dimethylizoxazol-4-yl)methyl)-1H-pyrazol-4-yl)močovina (Příklad 9-6b) (50 mg, 0,15 mmol), 2,4-methoxybenzylamin (26 mg, 0,15 mmol) a formaldehyd (37 hmotn.% v vodou) (25 mg, 0,31 mmol) se zahřívaly na 100 °C po dobu 16 hodin. Reakční směs se ochladila na teplotu místnosti, zředila se solankou (50 ml) a extrahovala se dichlormethanem (2x, 50 ml). Spojené organické extrakty se vysušily nad síranem hořečnatým, zfiltrovaly se a koncentrovaly se. Zbytek se přečistil chromatografií na silikagelové koloně (100% až 90% dichlormethan v methanol: 30 minutový gradient), což dalo 1-benzyl-5-(2,4-dimethoxybenzyl)-3-(1-((3,5-dimethylizoxazol-4-yl)methyl)-1H-pyrazol-4-yl)-1,3,5-triazinan-2-on (44 mg, 56%) jako olej. LC/MS; $[M+H]$ vypočteno pro $C_{28}H_{32}N_6O_4$; očekáváno 517,25; nalezeno 517,20.

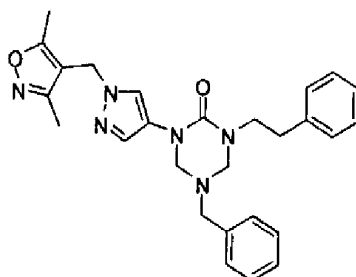
Příklad 9-6b: 1-benzyl-3-(1-((3,5-dimethylizoxazol-4-yl)methyl)-1H-pyrazol-4-yl)močovina



[00480] 1-((3,5-Dimethylizoxazol-4-yl)methyl)-1H-pyrazol-4-amin (287 mg, 1,49 mmol) a benzylizokyanát (199 mg, 1,49 mmol) v acetonitrilu (5 ml) se zahřívaly při 65 °C po dobu 16 hodin. Reakční směs se ochladila na teplotu místnosti a koncentrovala se. Zbytek se přečistil chromatografií na silikagelové koloně (100% až 90% dichlormethan v methanolu: 30

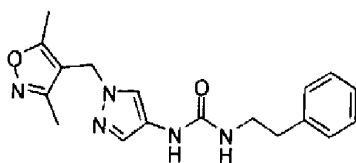
minutový gradient) a se třel s ethylacetátem/hexany (1/9), což dalo 1-benzyl-3-(1-((3,5-dimethylizoxazol-4-yl)methyl)-1H-pyrazol-4-yl)močovinu (246 mg, 51%) jako bílou pevnou látku. LC/MS; [M+H] vypočteno pro $C_{17}H_{19}N_5O_2$; očekáváno 326,15; nalezeno 326,10.

Příklad 9-7: 5-benzyl-1-(1-((3,5-dimethylizoxazol-4-yl)methyl)-1H-pyrazol-4-yl)-3-fenethyl-1,3,5-triazinan-2-on



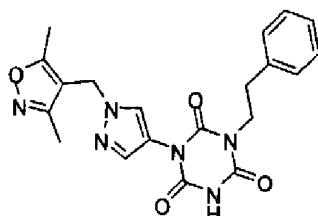
[00481] Připravený jak v Příkladu 9-6a z 1-(1-((3,5-dimethylizoxazol-4-yl)methyl)-1H-pyrazol-4-yl)-3-fenethylmočoviny (Příklad 9-7a), formaldehydu a benzylaminu. Výtěžek: 15%. ^1H NMR (DMSO- d_6 , 400 MHz): δ 2, 11 (s, 3H), 2, 37 (s, 3H), 2, 69 (t, $J = 7, 6$ Hz, 2H), 3, 39 (t, $J = 7, 8$ Hz, 2H), 3, 81 (s, 2H), 4, 16 (s, 2H), 4, 42 (s, 2H), 5, 05 (s, 2H), 7, 17-7, 32 (m, 10H), 7, 42 (s, 1H), 7, 78 (s, 1H). LC/MS; [M+H] vypočteno pro $C_{27}H_{30}N_6O_2$; očekáváno 471,24; nalezeno 471,15. Titulní sloučenina vykazala inhibici hT2R08 receptoru hořkosti a měla IC_{50} 2,64 μM .

Příklad 9-7a: 1-(1-((3,5-dimethylizoxazol-4-yl)methyl)-1H-pyrazol-4-yl)-3-fenethylmočovina



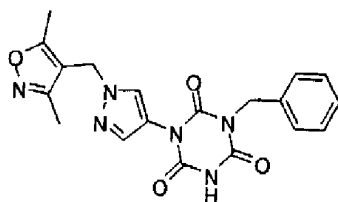
[00482] Připravený jak v Příkladu 9-6b z 1-((3,5-dimethylizoxazol-4-yl)methyl)-1H-pyrazol-4-aminu a fenethylizokyanátu. Výtěžek: 29%. ^1H NMR (DMSO- d_6 , 400 MHz): δ 2, 10 (s, 3H), 2, 36 (s, 3H), 2, 69 (t, $J = 7, 2$ Hz, 2H), 3, 25 (q, $J = 7, 4$ Hz, 2H), 5, 02 (s, 2H), 6, 00 (t, $J = 5, 8$ Hz, 1H), 7, 16-7, 30 (m, 6H), 7, 68 (s, 1H), 8, 13 (s, 1H). LC/MS; [M+H] vypočteno pro $C_{18}H_{21}N_5O_2$; očekáváno 340,17; nalezeno 340,20.

Příklad 9-8: 1-(1-((3,5-Dimethylizoxazol-4-yl)methyl)-1H-pyrazol-4-yl)-3-fenethyl-1,3,5-triazinan-2,4,6-trion



[00483] 1-(1-((3,5-Dimethylizoxazol-4-yl)methyl)-1H-pyrazol-4-yl)-3-fenethylmočovina (Příklad 9-7a) (100 mg, 0,29 mmol) v THF (2 ml) se ochladila na 0 °C a pomalu se přidával n-chlorkarbonylizokyanát (93 mg, 0,88 mmol). Po přidavku se ponechala reakční směs ohřát na teplotu místnosti a míchala se po dobu 1 hodiny. Reakční směs se koncentrovala a zbytek se přečistil chromatografií na silikagelové koloně (100% až 90% dichlormethan v methanolu: 30 minutový gradient), což dalo 1-(1-((3,5-dimethylizoxazol-4-yl)methyl)-1H-pyrazol-4-yl)-3-fenethyl-1,3,5-triazinan-2,4,6-trion (100 mg, 83%) jako bílou pevnou látku. ¹H NMR (DMSO-*d*₆, 400 MHz): δ 2, 13 (s, 3H), 2, 39 (s, 3H), 2, 82 (t, *J* = 5, 8 Hz, 2H), 3, 88 (t, *J* = 8, 0 Hz, 2H), 5, 17 (s, 2H), 7, 19-7, 31 (m, 5H), 7, 44 (s, 1H), 7, 89 (s, 1H), 11, 84 (s, 1H). LC/MS; [M+H] vypočteno pro C₂₀H₂₀N₆O₄; očekáváno 409,15; nalezeno 409,20. Titulní sloučenina vykazovala inhibici hT2R08 receptoru hořkosti a měla IC₅₀ 3,03 μM.

Příklad 9-9: 1-benzyl-3-(1-((3,5-dimethylizoxazol-4-yl)methyl)-1H-pyrazol-4-yl)-1,3,5-triazinan-2,4,6-trion

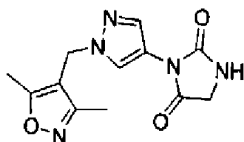


[00484] 1-Benzyl-3-(1-((3,5-dimethylizoxazol-4-yl)methyl)-1H-pyrazol-4-yl)močovina (Příklad 95b) (100 mg, 0,31 mmol) v THF (2 ml) se ochladila na 0 °C a pomalu se přidával n-chlorkarbonylizokyanát (97 mg, 0,92 mmol). Po přidavku se reakční směs ponechala ohřát na teplotu místnosti a míchala se po dobu 1 hodiny. Reakční směs se koncentrovala a zbytek se přečistil chromatografií na silikagelové koloně (100% až 90% dichlormethanu v methanolu: 30 minutový gradient), což dalo 1-benzyl-3-(1-((3,5-dimethylizoxazol-4-

yl)methyl)-1H-pyrazol-4-yl)-1,3,5-triazinan-2,4,6-trion (112 mg, 93%) jako bílou pevnou látku. ^1H NMR ($\text{DMSO}-d_6$, 400 MHz): δ 2,12 (s, 3H), 2,38 (s, 3H), 4,87 (s, 2H), 5,16 (s, 2H), 7,23-7,34 (m, 5H), 7,45 (s, 1H), 7,90 (s, 1H), 11,93 (s, 1H). LC/MS; $[\text{M}+\text{H}]$ vypočteno pro $\text{C}_{19}\text{H}_{18}\text{N}_6\text{O}_4$; očekáváno 395,14; nalezeno 395,15. Titulní sloučenina vykázala inhibici hT2R08 receptoru hořkosti a měla IC_{50} 1,14 μM .

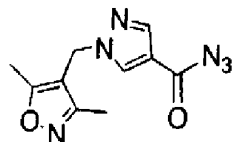
Příklad 10. hT2R8 antagonisté: Příprava sloučenin podle vynálezu

Příklad 10-1: 3-(1-((3,5-dimethylizoxazol-4-yl)methyl)-1H-pyrazol-4-yl)imidazolidin-2,4-dion



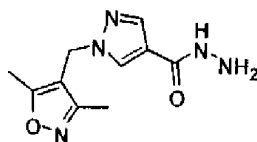
[00485] 1-((3,5-Dimethylizoxazol-4-yl)methyl)-1H-pyrazol-4-karbonylazid (Příklad 10-1a) (6 g, 25,5 mmol) v toluenu (100 ml) se refluxoval po dobu 1 hodiny a ochladil se na teplotu okolí pod atmosférou dusíku. Přidal se hydrochlorid methylesterglycinu (3,1 g, 26 mmol) a triethylamin (3,2 g, 32 mmol), směs se refluxovala po dobu 16 hodin. Reakční směs se ochladila a rozpouštědlo se odstranilo na rotační odparce. Pevná látka se znovu rozpustila v ethylacetátu (100 ml) a organická fáze se promyla 1N HCl roztokem (2x, 150 ml). Vodná fáze se opět extrahovala ethylacetátem (2x, 75 ml) a spojené organické extrakty se vysušily nad síranem sodným a koncentrovaly se. Výsledná pevná látka se třela ethylacetátem/hexany (1/9) a vysušila se za vysokého vakua, což dalo 3-(1-((3,5-dimethylizoxazol-4-yl)methyl)-1H-pyrazol-4-yl)imidazolidin-2,4-dion (5,2 g, 74%) jako bílou pevnou látku. ^1H NMR ($\text{DMSO}-d_6$, 400 MHz): δ 2,19 (s, 3H), 2,42 (s, 3H), 4,09 (s, 2H), 5,06 (s, 2H), 5,68 (bs, 1H), 7,90 (s, 1H), 8,05 (1H). Titulní sloučenina vykázala inhibici hT2R08 receptoru hořkosti a měla IC_{50} 1,7 μM .

Příklad 10-1a: 1-((3,5-dimethylizoxazol-4-yl)methyl)-1H-pyrazol-4-karbonylazid



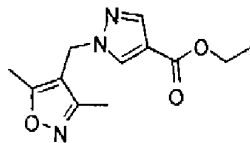
[00486] Více než 10 minut se přidával po kapkách dusičnan sodný (450 mg, 6,5 mmol, v H₂O) (10 ml) do suspenze 1-((3,5-dimethylizoxazol-4-yl)methyl)-1H-pyrazol-4-karbohydrazidu (Příklad 10-1b) (1g, 4,3 mmol) v 10% vodné kyselině octové (50 ml) a ochladila se na 0 °C pomocí ledové lázně. Reakční směs se míchala po dobu dalších 15 minut, pak se extrahovala ethylacetátem (3x, 75 ml). Spojené organické extrakty se promyly vodným nasyceným uhlíčitánem sodným (100 ml), následovaným H₂O (100 ml). Spojené organické extrakty se vysušily nad síranem sodným, zfiltrovaly a koncentrovaly se. Pevný produkt se třel ethylacetátem/hexany (1/9) a vysušil se *ve vakuu*, což dalo 1-((3,5-dimethylizoxazol-4-yl)methyl)-1H-pyrazol-4-karbonylazid (1g, 93%) jako bílou pevnou látku. ¹H NMR (CDCl₃, 400 MHz): δ2,20 (s, 3H), 2,44 (s, 3H), 5,07 (s, 2H), 7,81 (s, 1H), 7,93 (s, 1H).

Příklad 10-1b: 1-((3,5-dimethylizoxazol-4-yl)methyl)-1H-pyrazol-4-karbohydrazid



[00487] Ethyl-1-((3,5-dimethylizoxazol-4-yl)methyl)-1H-pyrazol-4-karboxylát (Příklad 10-1c) (6 g, 24 mmol) a hydrazin (7,5 g, 240 mmol) se míchaly v EtOH (100 ml) při refluxu po dobu 12 hodin. Roztok se koncentroval na rotační odparce a pevný produkt se třel ethylacetátem/hexany (1/9) a vysušil se za vysokého vakua, což dalo 1-((3,5-dimethylizoxazol-4-yl)methyl)-1H-pyrazol-4-karbohydrazid (5,5 g, 97%) jako čistý bílou pevná látka. ¹H NMR (DMSO-d₆, 400 MHz): δ2,11 (s, 3H), 2,39 (s, 3H), 5,15 (s, 2H), 7,81 (s, 1H), 8,17 (s, 1H), 9,31 (bs, 1H).

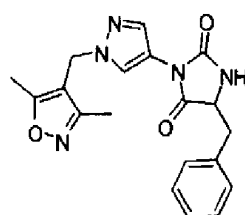
Příklad 10-1c: 1-((3,5-dimethylizoxazol-4-yl)methyl)-1H-pyrazol-4-karboxylát



[00488] Ethyl-1H-pyrazol-4-karboxylát (4,2g, 30 mmol), 4-(chlormethyl)-3,5-dimethylizoxazol (5,1 g, 35 mmol) a uhlíčitan cesný (9,8 g, 30 mmol), v DMF (50 ml) se míchaly při 80 °C po dobu 12 hodin. Reakční směs se ochladila na teplotu okolí, zředila se 0,1 N HCl (150 ml) a extrahovala se ethylacetátem (3x, 75 ml). Spojené organické extrakty se

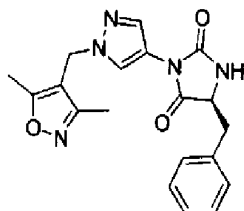
vysušily nad síranem sodným a koncentrovaly se na rotační odparce. Pevný produkt se třel ethylacetátem/hexany(1/9) a sebral se filtrací, což dalo ethyl-(1-((3,5-dimethylizoxazol-4-yl)methyl)-1H-pyrazol-4-karboxylát) (6 g, 80%) jako bílou pevnou látku. ^1H NMR (CDCl_3 , 400 MHz): δ 1,34 (t, $J = 7,2$ Hz, 3H), 2,19 (s, 3H), 2,43 (s, 3H), 4,29 (q, $J = 7,2$ Hz, 2H), 5,06 (s, 2H), 7,77 (s, 1H), 7,91 (s, 1H).

Příklad 10-2: 3-(1-((3,5-dimethylizoxazol-4-yl)methyl)-1H-pyrazol-4-yl)imidazolidin-2,4-dion



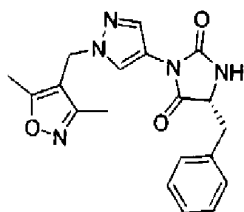
[00489] Připravený jak v Příkladu 10-1 z hydrochloridu methylester (+/-)-fenylalaninu a 1-((3,5-dimethylizoxazol-4-yl)methyl)-1H-pyrazol-4-karbonylazidu. Výtěžek: 58%. ^1H NMR (Aceton- d_6 , 400 MHz): δ 2,17 (s, 3H), 2,43 (s, 3H), 3,07 (dd, $J = 14,4, 6,4$ Hz, 1H), 3,20 (dd, $J = 14, 4,4$ Hz, 1H), 4,53 (t, $J = 4,8$ Hz, 1H), 5,18 (s, 2H), 7,27-7,19 (m, 5H), 7,46 (bs, 1H), 7,79 (s, 1H), 7,99 (s, 1H). MS $M+H$ vypočteno 366,15; nalezeno 366,1. Teplota tání: 169 až 171 °C. Titulní sloučenina vykazala inhibici hT2R08 receptoru hořkosti a měla IC_{50} 0,18 μM .

Příklad 10-3: (S)-5-benzyl-3-(1-((3,5-dimethylizoxazol-4-yl)methyl)-1H-pyrazol-4-yl)imidazolidin-2,4-dion



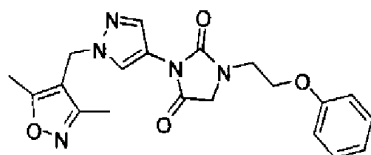
[00490] Připravený jak v Příkladu 10-1 z hydrochloridu methylester (S)-fenylalaninu a 1-((3,5-dimethylizoxazol-4-yl)methyl)-1H-pyrazol-4-karbonylazidu (Příklad 6a). Výtěžek: 13% izolovaný chirální chromatografií ^1H NMR (CDCl_3 , 400 MHz): δ 2,19 (s, 3H), 2,42 (s, 3H), 2,88 (dd, $J = 13,6, 9,2$ Hz, 1H), 3,35 (dd, $J = 13,6, 3,6$ Hz, 1H), 4,31-4,35 (m, 1H), 5,06 (s, 2H), 5,53 (bs, 1H), 7,21-7,36 (m, 5H), 7,85 (s, 1H), 8,01 (s, 1H). LC/MS; $[\text{M}+\text{H}]$ vypočteno pro $\text{C}_{19}\text{H}_{19}\text{N}_5\text{O}_3$; očekáváno 366,15; nalezeno 366,1. $[\alpha]_D = (-) -136$, $c=0,1$, ethanol. Titulní sloučenina vykazala inhibici hT2R08 receptoru hořkosti a měla IC_{50} 0,12 μM .

Příklad 10-4: (R)-5-benzyl-3-(1-((3,5-dimethylizoxazol-4-yl)methyl)-1H-pyrazol-4-yl)imidazolidin-2,4-dion



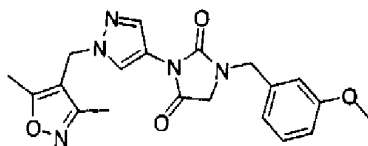
[00491] Připravený jak v Příkladu 10-1 z hydrochloridu methylester (R)-fenylalaninu a 1-((3,5-dimethylizoxazol-4-yl)methyl)-1H-pyrazol-4-karbonylazidu. Výtěžek: 9% se izoloval chirální chromatografií ^1H NMR (CDCl_3 , 400 MHz): δ 2,19 (s, 3H), 2,42 (s, 3H), 2,88 (dd, $J = 13,6, 9,2$ Hz, 1H), 3,35 (dd, $J = 13,6, 3,6$ Hz, 1H), 4,31-4,35 (m, 1H), 5,06 (s, 2H), 5,53 (bs, 1H), 7,21-7,36 (m, 5H), 7,85 (s, 1H), 8,01 (s, 1H). MS $\text{M}+\text{H}$ vypočteno 366,15; nalezeno 366,1. $[\alpha]_D = (+) -124$, $c=0,2$, ethanol. Titulní sloučenina vykazala inhibici hT2R08 receptoru hořkosti a měla IC_{50} 0,11 μM .

Příklad 10-5: 3-(1-((3,5-dimethylizoxazol-4-yl)methyl)-1H-pyrazol-4-yl)-1-(2-fenoxyethyl)imidazolidin-2,4-dion



[00492] 3-(1-((3,5-dimethylizoxazol-4-yl)methyl)-1H-pyrazol-4-yl)imidazolidin-2,4-dion (Příklad 10-1) (200 mg, 0,7 mmol), (2-bromethoxy)benzen (200 mg, 1 mmol) a uhlíčitá kyselina (325 mg, 1 mmol) se ozařovaly v mikrovlnném reaktoru při 85 °C po dobu 20 minut. Reakční směs se ochladila na teplotu místnosti, zředila se vodným 1N HCl (100 ml) a extrahovala se ethylacetátem (3x, 75 ml). Spojené organické extrakty se vysušily nad síranem sodným, zfiltrovaly a koncentrovaly se. Zbytek se sebral do methanolu (10 ml) a přečistil se pomocí reverzní fázovou HPLC (5 až 95% acetonitril v H₂O: 25 minutový gradient). Čisté frakce se spojily, koncentrovaly, pak se znovu rozpustily v absolutním ethanolu a koncentrovaly se na rotační odparce (4x), což dalo 3-(1-((3,5-dimethylizoxazol-4-yl)methyl)-1H-pyrazol-4-yl)-1-(2-fenoxyethyl)imidazolidin-2,4-dion (150 mg, 54%) jako bílou pevnou látku. ¹H NMR (CDCl₃ 2,18, 400 MHz): δ (s, 3H), 2,41 (s, 3H), 3,86 (t, *J* = 5,2 Hz, 2H), 4,19 (t, *J* = 4,4 Hz, 2H), 4,25 (s, 2H), 5,05 (s, 2H), 6,88 (dd, *J* = 9,2, 1,2 Hz, 2H), 7,00 (dt, *J* = 7,6, 1,2 Hz, 1H), 7,27-7,32 (m, 2H), 7,89 (s, 1H), 8,05 (s, 1H). MS *M*+*H* vypočteno 396,17; nalezeno 396,1. Teplota tání: 117-118 °C. Titulní sloučenina vykazovala inhibici hT2R08 receptoru hořkosti a měla IC₅₀ 0,06 μM.

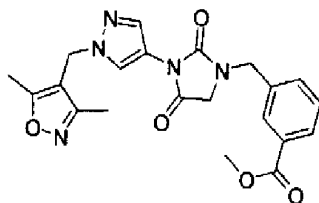
Příklad 10-6: 3-(1-((3,5-dimethylizoxazol-4-yl)methyl)-1H-pyrazol-4-yl)-1-(3-methoxybenzyl)imidazolidin-2,4-dion



[00493] Připravený jak v Příkladu 10-5 z 3-(1-((3,5-dimethylizoxazol-4-yl)methyl)-1H-pyrazol-4-yl)imidazolidin-2,4-dionu (Příklad 6) a 3-methoxy-benzylbromidu. Výtěžek: 55%. ¹H NMR (CDCl₃, 400 MHz): δ 2,19 (s, 3H), 2,42 (s, 3H), 3,81 (s, 3H), 3,85 (s, 2H),

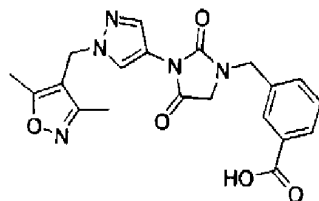
4,58 (s, 2H), 5,06 (s, 2H), 6,81-6,88 (m, 3H), 7,26-7,31 (m, 1H), 7,92 (s, 1H), 8,08 (s, 1H).
Titulní sloučenina vykazala inhibici hT2R08 receptoru hořkosti a měla IC_{50} 0,07 μ M.

Příklad 10-7: Methyl-(3-((3-(1-((3,5-dimethylizoxazol-4-yl)methyl)-1H-pyrazol-4-yl)-2,4-dioxoimidazolidin-1-yl)methyl)benzoát)



[00494] Připravený jak v Příkladu 10-5 z 3-(1-((3,5-dimethylizoxazol-4-yl)methyl)-1H-pyrazol-4-yl)imidazolidin-2,4-dionu a 3-methoxy-benzylbromidu. Výtěžek: 83%. ^1H NMR ($CDCl_3$, 400 MHz): δ 2,20 (s, 3H), 2,43 (s, 3H), 3,86 (s, 2H), 3,93 (s, 3H), 4,67 (s, 2H), 5,07 (s, 2H), 7,45-7,52 (m, 2H), 7,93 (s, 1H), 7,95 (s, 1H), 8,03 (dd, J = 7,2, 1,6 Hz, 1H), 8,08 (s, 1H). Titulní sloučenina vykazala inhibici hT2R08 receptoru hořkosti a měla IC_{50} 0,09 μ M.

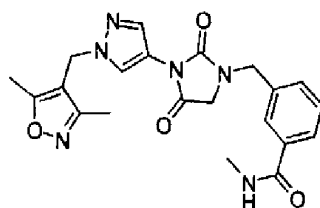
Příklad 10-8: Kyselina 3-((3-(1-((3,5-dimethylizoxazol-4-yl)methyl)-1H-pyrazol-4-yl)-2,4-dioxoimidazolidin-1-yl)methyl)benzoová



[00495] 3-(1-((3,5-dimethylizoxazol-4-yl)methyl)-1H-pyrazol-4-yl)imidazolidin-2,4-dion (500 mg, 1,8 mmol) (Příklad 10-5), methyl-(3-(bromomethyl)benzoát) (456 mg, 2 mmol) a uhlíčitán cesný (650 mg, 2 mmol) se smíchaly v DMF (4 ml) v mikrovlnném reaktoru při 85 °C po dobu 20 minut. Reakční směs se ochladila, zředila se 1N vodnou HCl (100 ml) a extrahovala se ethylacetátem (3x, 75 ml). Spojené organické extrakty se vysušily nad síranem sodným, zfiltróvaly se a koncentrovaly se. Surový ester se rozpustil v methanolu (5 ml) a přidal se vodný NaOH (50 ml, 10 hmotn.%) a směs se míchala při teplotě okolí po dobu 2 hodin. Reakční směs se okyselila 1N HCl (150 ml) a extrahovala se ethylacetátem (3x, 75 ml). Spojené organické extrakty se vysušily nad síranem sodným, zfiltróvaly se a koncentrovaly se na rotační odparce. Volná kyselina se třela ethylacetátem/hexany (1/9) a

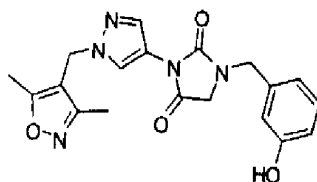
vysušila se za vakua, což dalo kyselinu 3-((3-(1-((3,5-dimethylizoxazol-4-yl)methyl)-1H-pyrazol-4-yl)-2,4-dioxoimidazolidin-1-yl)methyl)benzoovou (610 mg, 83%) jako bílou pevnou látku. ^1H NMR ($\text{DMSO}-d_6$, 400 MHz): δ 2,13 (s, 3H), 2,29 (s, 3H), 4,00 (s, 2H), 4,59 (s, 2H), 5,18 (s, 2H), 7,46-7,59 (m, 2H), 7,78 (s, 1H), 7,85-7,88 (m, 2H), 8,18 (s, 1H). Titulní sloučenina vykazala inhibici hT2R08 receptoru hořkosti a měla IC_{50} 1,8 μM .

Příklad 10-9: 3-((3-(1-((3,5-dimethylizoxazol-4-yl)methyl)-1H-pyrazol-4-yl)-2,4-dioxoimidazolidin-1-yl)methyl)-N-methylbenzamid



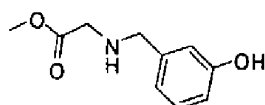
[00496] Kyselina 3-((3-(1-((3,5-dimethylizoxazol-4-yl)methyl)-1H-pyrazol-4-yl)-2,4-dioxoimidazolidin-1-yl)methyl)benzoová (100 mg, 0,24 mmol) (Příklad 10-8), hydrochlorid methylaminu (67 mg, 1 mmol), triethylamin (155 mg, 1,5 mmol) a EDC (57 mg, 0,3 mmol) v acetonitrilu (3 ml) se ozařovaly v mikrovlnném reaktoru při 80 °C po dobu 10 minut. Reakční směs se ochladila, zředila se vodnou 1N HCl (100 ml) a extrahovala se ethylacetátem (3x, 75 ml). Spojené organické extrakty se vysušily nad síranem sodným, zfiltrovaly se a koncentrovaly se. Surový produkt se rozpustil v MeOH (3 ml) a přečistil se pomocí reverzní fázové HPLC (5 až 95% acetonitril v H_2O : 25 minutový gradient), což dalo 3-((3-(1-((3,5-dimethylizoxazol-4-yl)methyl)-1H-pyrazol-4-yl)-2,4-dioxoimidazolidin-1-yl)methyl)-N-methylbenzamid (25 mg, 25%) jako bílou pevnou látku. MS $\text{M}+\text{H}$ vypočteno 423,17; nalezeno 423,2. Titulní sloučenina vykazala inhibici hT2R08 receptoru hořkosti a měla IC_{50} 0,14 μM .

Příklad 10-10: 3-(1-((3,5-dimethylizoxazol-4-yl)methyl)-1H-pyrazol-4-yl)-1-(3-hydroxybenzyl)imidazolidin-2,4-dion:



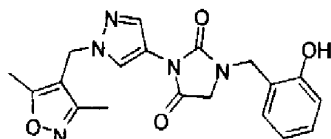
[00497] Připravený jak v Příkladu 10-1 z 1-((3,5-dimethylizoxazol-4-yl)methyl)-1H-pyrazol-4-karbonylazidu (Příklad 10-1a) a methyl-(2-(3-hydroxybenzylamino)acetátu) (Příklad 10-10a). Výtěžek: 24%. ¹H NMR (DMSO, 400 MHz): δ 2,15 (s, 3H), 2,41 (s, 3H), 3,99 (s, 2H), 4,45 (s, 2H), 5,21 (s, 2H), 6,70 (m, 3H), 7,15 (m, 1H), 7,80 (s, 1H), 8,19 (s, 1H), 9,44 (s, 1H). LC/MS; [M+H] očekáváno 382,1; nalezeno 382,1. Teplota tání: 135-136 °C. Titulní sloučenina vykazala inhibici hT2R08 receptoru hořkosti a měla IC₅₀ 0,035 μM.

Příklad 10-10a: methyl-(2-(3-hydroxybenzylamino)acetát):



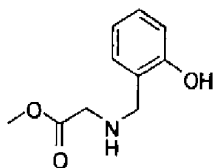
[00498] Methylester glycinu (500 mg, 4 mmol) a 3-hydroxybenzaldehyd (480mg, 4mmol) se rozpustily v 5 ml THF/Methanol (1:1). Kyselina octová (240mg, 4mmol) a 1M kyanoborhydrid sodný v THF (4,8ml, 4,8 mmol) se pomalu přidaly do reakční směsi. Reakční směs se ozařovala v mikrovlnném reaktoru při 85 °C po dobu 15 minut, ochladila se na teplotu místnosti a soli se odstranily filtrací. Čirý roztok se koncentroval a zbytek se přečistil pomocí reverzní fázové HPLC (10 až 95% acetonitril v H₂O; 25 minutový gradient), což dalo titulní sloučeninu jako čirý gel. Výtěžek 45%. MS M+H vypočteno 196,1; nalezeno 196,1.

Příklad 10-11: 3-(1-((3,5-dimethylizoxazol-4-yl)methyl)-1H-pyrazol-4-yl)-1-(2-hydroxybenzyl)imidazolidin-2,4-dion:



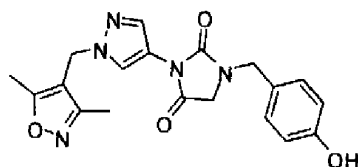
[00499] Připravený jak v Příkladu 10-1 z 1-((3,5-dimethylizoxazol-4-yl)methyl)-1H-pyrazol-4-karbonylazidu (Příklad 10-1a) a methyl-(2-(2-hydroxybenzylamino)acetátu) (Příklad 10-11a). Výtěžek: 28%. ¹H NMR (DMSO, 400 MHz): δ 2,12 (s, 3H), 2,38 (s, 3H), 4,00 (s, 2H), 4,45 (s, 2H), 5,17 (s, 2H), 6,83 (m, 2H), 7,10 (m, 2H), 7,78 (s, 1H), 8,16 (s, 1H), 9,66 (s, 1H). LC/MS; [M+H] očekáváno 382,1; nalezeno 382,2. Titulní sloučenina vykazala inhibici hT2R08 receptoru hořkosti a měla IC₅₀ 0,07 μM.

Příklad 10-11a: methyl-(2-(2-hydroxybenzylamino)acetát):



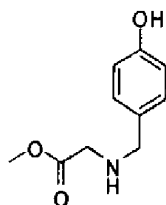
[00500] Připravený jak v Příkladu 10-10a z methylesteru glycinu a 2-hydroxybenzaldehydu. Výtěžek 40%. MS M+H vypočteno 196,1; nalezeno 196,1

Příklad 10-12: 3-(1-((3,5-dimethylizoxazol-4-yl)methyl)-1H-pyrazol-4-yl)-1-(4-hydroxybenzyl)imidazolidin-2,4-dion:



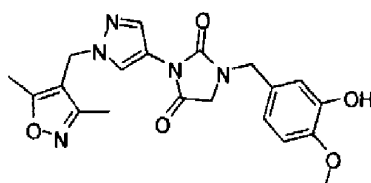
[00501] Připravený jak v Příkladu 10-1 z 1-((3,5-dimethylizoxazol-4-yl)methyl)-1H-pyrazol-4-karbonylazidu a methyl-(2-(4-hydroxybenzylamino)acetátu) (Příklad 10-12a). Výtěžek 9%. ^1H NMR (DMSO, 400 MHz): δ 2,117 (s, 3H), 2,383 (s, 3H), 3,918 (s, 2H), 4,387 (s, 2H), 5,174 (s, 2H), 6,719 (J=8,8, d, 2H), 7,108 (J=8,8, m, 2H), 7,761 (s, 1H), 8,154 (s, 1H), 9,399 (s, 1H). LC/MS; [M+H] očekáváno 382,1; nalezeno 382,2. Titulní sloučenina vykazala inhibici hT2R08 receptoru hořkosti a měla IC_{50} 0,06 μM .

Příklad 10-12a: methyl-(2-(4-hydroxybenzylamino)acetát):



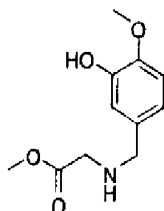
[00502] Připravený jak v Příkladu 10-10a z methylester glycinu a 4-hydroxybenzaldehydu. Výtěžek 40%. MS M+H vypočteno 196,1; nalezeno 196,1

Příklad 10-13: 3-(1-((3,5-dimethylizoxazol-4-yl)methyl)-1H-pyrazol-4-yl)-1-(3-hydroxy-4-methoxybenzyl)imidazolidin-2,4-dion:



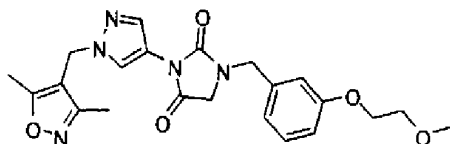
[00503] Připravený jak v Příkladu 10-1 z 1-((3,5-dimethylizoxazol-4-yl)methyl)-1H-pyrazol-4-karbonylazidu (Příklad 10-1a) a methyl-(2-(3-hydroxy-4-methoxybenzylamino)acetátu) (Příklad 10-13a). Výtěžek 22%. ¹H NMR (DMSO, 400 MHz): δ 2,119 (s, 3H), 2,383 (s, 3H), 3,716 (s, 3H), 3,923 (s, 2H), 4,361 (s, 2H), 5,117 (s, 2H), 6,667 (m, 2H), 6,863 (J=8,4, d, 1H), 7,766 (s, H), 8,159 (s, H). MS M+H vypočteno 412,1; nalezeno 412,1. Titulní sloučenina vykazala inhibici hT2R08 receptoru hořkosti a měla IC₅₀ 0,1 μM.

Příklad 10-13a: methyl-(2-(3-hydroxy-4-methoxybenzylamino)acetát):



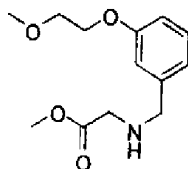
[00504] Připravený jak v Příkladu 10-10a z methylester glycinu a 3-hydroxy-4-methoxybenzaldehydu. Výtěžek 47%. MS M+H vypočteno 226,1; nalezeno 226,1

Příklad 10-14: 3-(1-((3,5-dimethylizoxazol-4-yl)methyl)-1H-pyrazol-4-yl)-1-(3-(2-methoxyethoxy)benzyl)imidazolidin-2,4-dion:



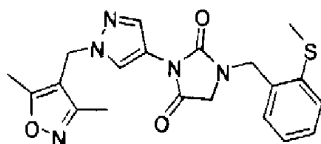
[00505] Připravený jak v Příkladu 10-1 z 1-((3,5-dimethylizoxazol-4-yl)methyl)-1H-pyrazol-4-karbonylazidu (Příklad 10-1a) a methyl-(2-(3-(2-methoxyethoxy)-benzyl-amino)acetátu) (Příklad 10-14a). Výtěžek 27%. ¹H NMR (DMSO, 400 MHz); δ 2,12 (s, 3H), 2,38 (s, 3H), 3,26 (s, 3H), 3,62 (t, J=4,4, 2H), 3,98 (s, 2H), 4,06 (t, J=4,4, 2H), 4,48 (s, 2H), 5,18 (s, 2H), 6,86 (m, 3H), 7,24 (t, J=8, 1H), 7,78 (s, 1H), 8,17 (s, 1H). MS M+H vypočteno 440,2; nalezeno 440,2. Titulní sloučenina vykazovala inhibici hT2R08 receptoru hořkosti a měla IC₅₀ 0,07 μM.

Příklad 10-14a: methyl-(2-(3-(2-methoxyethoxy)benzylamino)acetát):



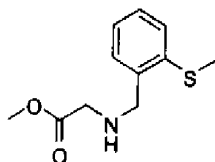
[00506] Připravený jak v Příkladu 10-10a z methylesteru glycinu a 3-(2-methoxyethoxy)benzaldehydu. Výtěžek 55%. MS M+H vypočteno 254,1; nalezeno 254,1.

Příklad 10-15: 3-(1-((3,5-dimethylizoxazol-4-yl)methyl)-1H-pyrazol-4-yl)-1-(2-(methylthio)benzyl)imidazolidin-2,4-dion:



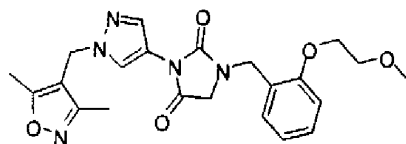
[00507] Připravený jak v Příkladu 10-1 z 1-((3,5-dimethylizoxazol-4-yl)methyl)-1H-pyrazol-4-karbonylazidu (Příklad 10-1a) a methyl-(2-(2-(methylthio)benzylamino)acetátu) (Příklad 10-15a). Výtěžek 67%. ^1H NMR (DMSO, 400 MHz): δ 2,12 (s, 3H), 2,39 (s, 3H), 2,48 (s, 3H), 3,98 (s, 2H), 4,54 (s, 2H), 5,19 (s, 2H), 7,18 (m, 1H), 7,30 (m, 3H), 7,79 (s, 1H), 8,18 (s, 1H). LC/MS; [M+H] očekáváno 412,1; nalezeno 412,1. Titulní sloučenina vykazala inhibici hT2R08 receptoru hořkosti a měla IC_{50} 0,03 μM .

Příklad 10-15a: methyl-(2-(2-(methylthio)benzylamino)acetát):



[00508] Připravený jak v Příkladu 10-10a z methylesteru glycinu a 2-(methylthio)-benzaldehydu. Výtěžek 50%. MS M+H vypočteno 226,1, nalezeno 226,1.

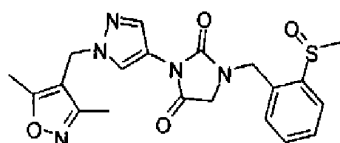
Příklad 10-16: 3-(1-((3,5-dimethylizoxazol-4-yl)methyl)-1H-pyrazol-4-yl)-1-(2-(2-methoxyethoxy)benzyl)imidazolidin-2,4-dion:



[00509] Připravený jak v Příkladu 10-5 z 3-(1-((3,5-dimethylizoxazol-4-yl)methyl)-1H-pyrazol-4-yl)-1-(2-hydroxybenzyl)imidazolidin-2,4-dionu (Příklad 10-11) a 2-bromomethyl-methyletheru. Výtěžek 19%. ^1H NMR (DMSO, 400 MHz): δ 2,11 (s, 3H), 2,08 (s, 3H), 3,25 (s,

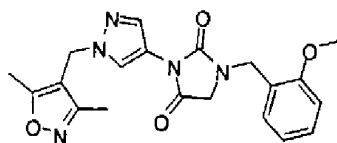
3H), 3,64 (t, $J=3,6$, 2H), 4,00 (s, 2H), 4,11 (t, $J=3,2$, 2H), 4,27 (s, 2H), 5,17 (s, 2H), 6,90 (m, 1H), 7,00 (m, 1H), 7,26 (m, 2H), 7,76 (s, 1H), 8,15 (s, 1H). Titulní sloučenina vykazala inhibici hT2R08 receptoru hořkosti a měla IC_{50} 0,1 μ M.

Příklad 10-17: 3-(1-((3,5-dimethylizoxazol-4-yl)methyl)-1H-pyrazol-4-yl)-1-(2-(methyl-sulfinyl)benzyl)imidazolidin-2,4-dion:



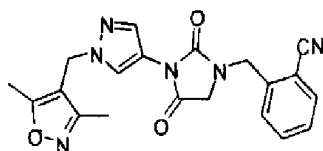
[00510] Ve 20 ml mikrovlnné zkumavce se rozpustily 3-(1-((3,5-dimethylizoxazol-4-yl)methyl)-1H-pyrazol-4-yl)-1-(2-(methylthio)benzyl)imidazolidin-2,4-dion (Příklad 10-15) (70 mg, 0,17 mmol) a m-CPBA (58 mg, 0,34 mmol) v dichlormethanu při 0 °C. Reakční směs se míchala při 0 °C a ponechala se ohřívat na teplotu místnosti po dobu 4 hodin. Rozpouštědlo se z reakční směsi odstranilo za vakua a surový produkt se rozpustil v 1 ml ethanolu a přečistil se variantní HPLC (10 až 95% acetonitril/voda; 25 minut). Přečištěná frakce se odpařila za vakua, což dalo titulní sloučeninu. MS $M+H$ vypočteno 428,1; nalezeno 428,1. Titulní sloučenina vykazala inhibici hT2R08 receptoru hořkosti a měla IC_{50} 0,4 μ M. Výtěžek: 12 mg, 17%.

Příklad 10-18: 3-(1-((3,5-dimethylizoxazol-4-yl)methyl)-1H-pyrazol-4-yl)-1-(2-methoxybenzyl)imidazolidin-2,4-dion:



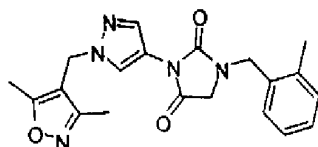
[00511] Připravený jak v Příkladu 10-5 z 3-(1-((3,5-dimethylizoxazol-4-yl)methyl)-1H-pyrazol-4-yl)imidazolidin-2,4-dion (Příklad 10-1) a 1-(brommethyl)-2-methoxybenzenu (199 mg, 1 mmol). Výtěžek: 33%. MS $M+H$ vypočteno 396,1; nalezeno 396,1. Titulní sloučenina vykazala inhibici hT2R08 receptoru hořkosti a měla IC_{50} 0,06 μ M.

Příklad 10-19: 2-((3-(1-((3,5-dimethylizoxazol-4-yl)methyl)-1H-pyrazol-4-yl)-2,4-dioxoimidazolidin-1-yl)methyl)benzonitril:



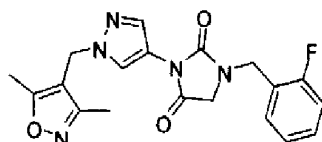
[00512] Připravený jak v Příkladu 10-5 z 3-(1-((3,5-dimethylizoxazol-4-yl)methyl)-1H-pyrazol-4-yl)imidazolidin-2,4-dionu (Příklad 10-1) a 2-(brommethyl)benzonitrilu. Výtěžek: 27%. MS M+H vypočteno 391,1; nalezeno 391,1. Titulní sloučenina vykazala inhibici hT2R08 receptoru hořkosti a měla IC_{50} 0,5 μ M.

Příklad 10-20: 3-(1-((3,5-dimethylizoxazol-4-yl)methyl)-1H-pyrazol-4-yl)-1-(2-methylbenzyl)imidazolidin-2,4-dion:



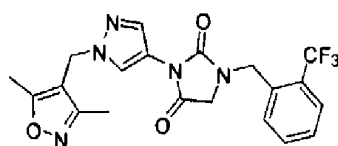
[00513] Připravený jak v Příkladu 10-5 z 3-(1-((3,5-dimethylizoxazol-4-yl)methyl)-1H-pyrazol-4-yl)imidazolidin-2,4-dionu (Příklad 10-1) a 1-(brommethyl)-2-methylbenzenu. Výtěžek: 21%. MS M+H vypočteno 380,1; nalezeno 380,1. Titulní sloučenina vykazala inhibici hT2R08 receptoru hořkosti a měla IC_{50} 0,1 μ M.

Příklad 10-21: 3-(1-((3,5-dimethylizoxazol-4-yl)methyl)-1H-pyrazol-4-yl)-1-(2-fluorbenzyl)imidazolidin-2,4-dion:



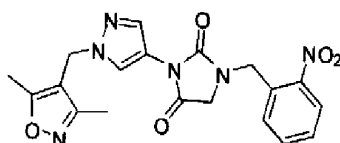
[00514] Připravený jak v Příkladu 10-5 z 3-(1-((3,5-dimethylizoxazol-4-yl)methyl)-1H-pyrazol-4-yl)imidazolidin-2,4-dionu (Příklad 10-1) a 1-(brommethyl)-2-fluorbenzenu. Výtěžek 42%. MS M+H vypočteno 384,1; nalezeno 384,1. Titulní sloučenina vykazala inhibici hT2R08 receptoru hořkosti a měla IC_{50} 0,08 μ M.

Příklad 10-22: 3-(1-((3,5-dimethylizoxazol-4-yl)methyl)-1H-pyrazol-4-yl)-1-(2-(trifluormethyl)benzyl)imidazolidin-2,4-dion:



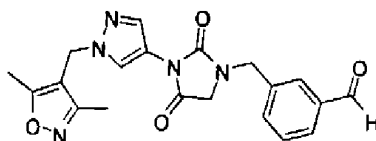
[00515] Připravený jak v Příkladu 10-5 z 3-(1-((3,5-dimethylizoxazol-4-yl)methyl)-1H-pyrazol-4-yl)imidazolidin-2,4-dionu (Příklad 10-1) a 1-(brommethyl)-2-(trifluormethyl)benzenu. Výtěžek: 37%. MS M+H vypočteno 434,1; nalezeno 434,1. Titulní sloučenina vykazala inhibici hT2R08 receptoru hořkosti a měla IC_{50} 0,2 μ M.

Příklad 10-23: 3-(1-((3,5-dimethylizoxazol-4-yl)methyl)-1H-pyrazol-4-yl)-1-(2-nitro-benzyl)imidazolidin-2,4-dion:



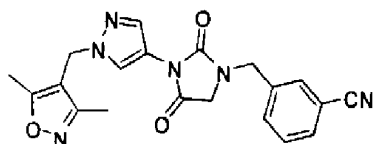
[00516] Připravený jak v Příkladu 10-5 z 3-(1-((3,5-dimethylizoxazol-4-yl)methyl)-1H-pyrazol-4-yl)imidazolidin-2,4-dionu (Příklad 10-1) a 1-(brommethyl)-2-nitro-benzenu. Výtěžek 22%. MS M+H vypočteno 411,1; nalezeno 411,1. Titulní sloučenina vykazala inhibici hT2R08 receptoru hořkosti a měla IC_{50} 0,07 μ M.

Příklad 10-24: 3-((3-(1-((3,5-dimethylizoxazol-4-yl)methyl)-1H-pyrazol-4-yl)-2,4-dioxo-imidazolidin-1-yl)methyl)benzaldehyd:



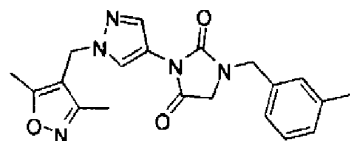
[00517] Připravený jak v Příkladu 10-5 z 3-(1-((3,5-dimethylizoxazol-4-yl)methyl)-1H-pyrazol-4-yl)imidazolidin-2,4-dionu (Příklad 10-1) a 3-(brommethyl)benzaldehydu. Výtěžek: 35%. ^1H NMR (DMSO, 400 MHz): δ 2,123 (s, 3H), 2,388 (s, 3H), 4,035 (s, 2H), 4,631 (s, 2H), 5,186 (s, 2H), 7,581 (m, 1H), 7,643 (m, 1H), 7,787 (m, 3H), 8,178 (s, H), 9,997 (s, H). Titulní sloučenina vykazala inhibici hT2R08 receptoru hořkosti a měla IC_{50} 0,2 μ M.

Příklad 10-25: 3-((3-(1-((3,5-dimethylizoxazol-4-yl)methyl)-1H-pyrazol-4-yl)-2,4-dioxoimidazolidin-1-yl)methyl)benzonitril:



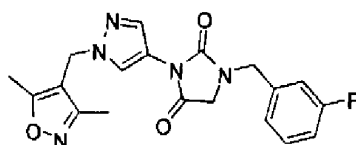
[00518] Připravený jak v Příkladu 10-5 z 3-(1-((3,5-dimethylizoxazol-4-yl)methyl)-1H-pyrazol-4-yl)imidazolidin-2,4-dionu (Příklad 10-1) a 3-(brommethyl)benzonitrilu. Výtěžek 21%. MS M+H vypočteno 411,1; nalezeno 411,1. Titulní sloučenina vykazala inhibici hT2R08 receptoru hořkosti a měla IC_{50} 1 μ M.

Příklad 10-26: 3-(1-((3,5-dimethylizoxazol-4-yl)methyl)-1H-pyrazol-4-yl)-1-(3-methylbenzyl)imidazolidin-2,4-dion:



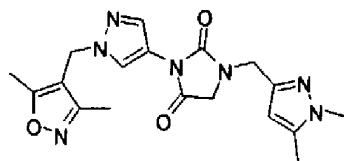
[00519] Připravený jak v Příkladu 10-5 z 3-(1-((3,5-dimethylizoxazol-4-yl)methyl)-1H-pyrazol-4-yl)imidazolidin-2,4-dionu (Příklad 10-1) a 1-(brommethyl)-3-methylbenzenu. Výtěžek 25%. MS M+H vypočteno 380,1; nalezeno 380,1. Titulní sloučenina vykazala inhibici hT2R08 receptoru hořkosti a měla IC_{50} 0,02 μ M.

Příklad 10-27: 3-(1-((3,5-dimethylizoxazol-4-yl)methyl)-1H-pyrazol-4-yl)-1-(3-fluor-benzyl)imidazolidin-2,4-dion:



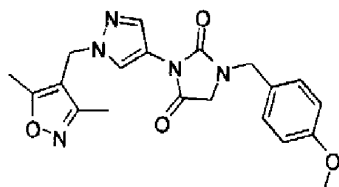
[00520] Připravený jak v Příkladu 10-5 z 3-(1-((3,5-dimethylizoxazol-4-yl)methyl)-1H-pyrazol-4-yl)imidazolidin-2,4-dionu (Příklad 10-1) a 1-(brommethyl)-3-fluor-benzenu. Výtěžek 27%. MS M+H vypočteno 384,1; nalezeno 384,1. Titulní sloučenina vykazala inhibici hT2R08 receptoru hořkosti a měla IC_{50} 0,06 μ M.

Příklad 10-28: 1-((1,5-dimethyl-1H-pyrazol-3-yl)methyl)-3-(1-((3,5-dimethylizoxazol-4-yl)methyl)-1H-pyrazol-4-yl)imidazolidin-2,4-dion:



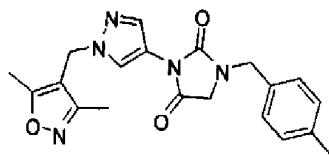
[00521] Připravený jak v Příkladu 10-5 z 3-(1-((3,5-dimethylizoxazol-4-yl)methyl)-1H-pyrazol-4-yl)imidazolidin-2,4-dionu (Příklad 10-1) a 3-(brommethyl)-1,5-dimethyl-1H-pyrazolu. Výtěžek: 22%. MS M+H vypočteno 384,1; nalezeno 384,1. Titulní sloučenina vykazala inhibici hT2R08 receptoru hořkosti a měla IC_{50} 0,3 μ M

Příklad 10-29: 3-(1-((3,5-dimethylizoxazol-4-yl)methyl)-1H-pyrazol-4-yl)-1-(4-methoxybenzyl)imidazolidin-2,4-dion:



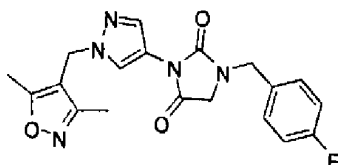
[00522] Připravený jak v Příkladu 10-5 z 3-(1-((3,5-dimethylizoxazol-4-yl)methyl)-1H-pyrazol-4-yl)imidazolidin-2,4-dionu (Příklad 10-1) a 1-(brommethyl)-4-methoxybenzenu. Výtěžek 19%. MS M+H vypočteno 396,1; nalezeno 396,1. Titulní sloučenina vykazala inhibici hT2R08 receptoru hořkosti a měla IC_{50} 0,07 μ M.

Příklad 10-30: 3-(1-((3,5-dimethylizoxazol-4-yl)methyl)-1H-pyrazol-4-yl)-1-(4-methylbenzyl)imidazolidin-2,4-dion:



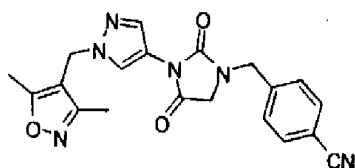
[00523] Připravený jak v Příkladu 10-5 z 3-(1-((3,5-dimethylizoxazol-4-yl)methyl)-1H-pyrazol-4-yl)imidazolidin-2,4-dionu (Příklad 10-1) a 1-(brommethyl)-4-methylbenzenu. Výtěžek 25%. MS M+H vypočteno 380,1; nalezeno 380,1. Titulní sloučenina vykazala inhibici hT2R08 receptoru hořkosti a měla IC_{50} 0,06 μ M.

Příklad 10-31: 3-(1-((3,5-dimethylizoxazol-4-yl)methyl)-1H-pyrazol-4-yl)-1-(4-fluorbenzyl)imidazolidin-2,4-dion:



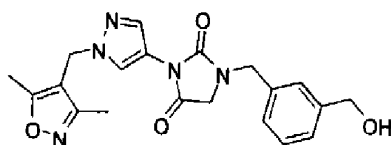
[00524] Připravený jak v Příkladu 10-5 z 3-(1-((3,5-dimethylizoxazol-4-yl)methyl)-1H-pyrazol-4-yl)imidazolidin-2,4-dionu (Příklad 10-1) a 1-(brommethyl)-4-fluorbenzenu. Výtěžek 33%. MS M+H vypočteno 384,1; nalezeno 384,1. Titulní sloučenina vykazala inhibici hT2R08 receptoru hořkosti a měla IC_{50} 0,05 μ M.

Příklad 10-32: 4-((3-(1-((3,5-dimethylizoxazol-4-yl)methyl)-1H-pyrazol-4-yl)-2,4-dioxoimidazolidin-1-yl)methyl)benzonitril:



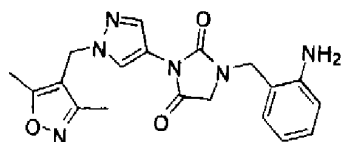
[00525] Připravený jak v Příkladu 10-5 z 3-(1-((3,5-dimethylizoxazol-4-yl)methyl)-1H-pyrazol-4-yl)imidazolidin-2,4-dionu (Příklad 10-1) a 4-(brommethyl)benzonitrilu. Výtěžek 21%. MS M+H vypočteno 391,1; nalezeno 391,2. Titulní sloučenina vykazala inhibici hT2R08 receptoru hořkosti a měla IC_{50} 0,05 μ M.

Příklad 10-33: 3-(1-((3,5-dimethylizoxazol-4-yl)methyl)-1H-pyrazol-4-yl)-1-(3-(hydroxymethyl)benzyl)imidazolidin-2,4-dion:



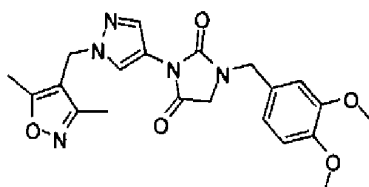
[00526] 3-((1-((3,5-dimethylizoxazol-4-yl)methyl)-1H-pyrazol-4-yl)-2,4-dioxoimidazolidin-1-yl)methyl)benzaldehyd (Příklad 10-24) (131 mg, 0,3 mmol) se rozpustil v 2 ml ethanolu. Roztok se nechal projít přístrojem H-Cube při teplotě místnosti za použití 10% Pd/C katalyzátoru při proudové rychlosti 1 ml/minutu. Sebrané frakce se koncentrovaly, znovu se rozpustily ve 2 ml ethanolu a přečistily se pomocí HPLC (10-95% acetonitril/voda, 25 minut). Přečištěné frakce se spojily a koncentrovaly, což dalo titulní sloučeninu. ^1H NMR (DMSO, 400 MHz): δ 2,123 (s, 3H), 2,388 (s, 3H), 3,978 (s, 2H), 4,516 (s, 2H), 5,182 (s, 2H), 7,242 (m, 4H), 7,779 (s, 1H), 8,172 (s, 1H), 8,505 (s, 1H), MS M+H vypočteno 396,1; nalezeno 396,1. Titulní sloučenina vykazala inhibici hT2R08 receptoru hořkosti a měla IC_{50} 0,3 μM . Výtěžek: 24 mg, 18%.

Příklad 10-34: 1-(2-aminobenzyl)-3-(1-((3,5-dimethylizoxazol-4-yl)methyl)-1H-pyrazol-4-yl)imidazolidin-2,4-dion:



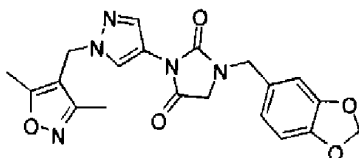
[00527] 3-(1-((3,5-dimethylizoxazol-4-yl)methyl)-1H-pyrazol-4-yl)-1-(2-nitrobenzyl)imidazolidin-2,4-dion (Příklad 10-23) (126 mg, 0,3 mmol) se rozpustil v 2 ml ethanolu. Roztok se nechal projít přístrojem H-Cube při teplotě místnosti za použití 10% Pd/C katalyzátoru při proudové rychlosti 1 ml/minutu. Sebraná frakce se koncentrovala, znovu se rozpustila ve 2 ml ethanolu a přečistila se pomocí HPLC (10-95% acetonitril/voda, 25 minut). Přečištěné frakce se spojily a koncentrovaly, což dalo titulní sloučeninu. Výtěžek 26%. MS M+H vypočteno 381,1; nalezeno 381,1. Titulní sloučenina vykazala inhibici hT2R08 receptoru hořkosti a měla IC_{50} 0,02 μM .

Příklad 10-35: 1-(3,4-dimethoxybenzyl)-3-(1-((3,5-dimethylizoxazol-4-yl)methyl)-1H-pyrazol-4-yl)imidazolidin-2,4-dion:



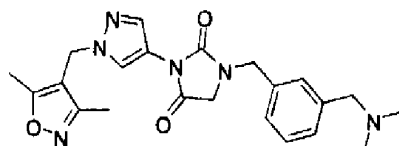
[00528] 3-(1-((3,5-Dimethylizoxazol-4-yl)methyl)-1H-pyrazol-4-yl)imidazolidin-2,4-dion (Příklad 10-1) (275 mg, 1 mmol), (3,4-dimethoxyfenyl)methanol (201 mg, 1,2 mmol), N,N,N,N-tetramethylazodikarboxamid (344 mg, 2 mmol) se rozpustily v 2 ml bezvodém THF. Přidal se ributylfosfin (404 mg, 2 mmol) a reakční směs se ponechala v mikrovlnném reaktoru po dobu 5 minut při 90 °C. Reakční směs se zfiltrovala, koncentrovala a přečistila pomocí HPLC (10-95% acetonitril/voda, 25 minut), což dalo titulní sloučeninu. Výtěžek: 25mg, 6%. ¹H NMR (DMSO, 400 MHz): δ2,119 (s, 3H), 2,385 (s, 3H), 3,724 (J=6,4 d, 6H), 3,946 (s, 2H), 4,435 (s, 2H), 5,178 (s, 2H), 6,885 (m, 3H), 7,776 (s, 1H), 8,166 (s, 1H). MS M+H vypočteno 426,1; nalezeno 426,1. Titulní sloučenina vykazala inhibici hT2R08 receptoru hořkosti a měla IC₅₀ 0,06 μM.

Příklad 10-36: 1-(benzo[d][1,3]dioxol-5-ylmethyl)-3-(1-((3,5-dimethylizoxazol-4-yl)methyl)-1H-pyrazol-4-yl)imidazolidin-2,4-dion:



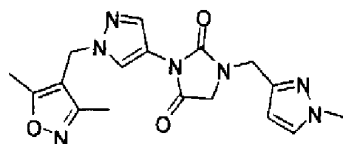
[00529] Připravený jak v Příkladu 10-35 z 3-(1-((3,5-dimethylizoxazol-4-yl)methyl)-1H-pyrazol-4-yl)imidazolidin-2,4-dion (Příklad 10-1) a benzo[d][1,3]dioxol-5-ylmethanol. Výtěžek: 19%. ¹H NMR (DMSO, 400 MHz): δ2,143 (s, 3H), 2,408 (s, 3H), 3,977 (s, 2H), 4,440 (s, 2H), 5,202 (s, 2H), 6,003 (s, 2H), 6,897 (m, 3H), 7,788 (s, 1H), 8,181 (s, 1H). MS M+H vypočteno 410,1; nalezeno 410,1. Titulní sloučenina vykazala inhibici hT2R08 receptoru hořkosti a měla IC₅₀ 0,07 μM.

Příklad 10-37: 1-(3-((dimethylamino)methyl)benzyl)-3-(1-((3,5-dimethylizoxazol-4-yl)methyl)-1H-pyrazol-4-yl)imidazolidin-2,4-dion:



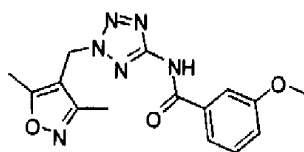
[00530] 3-(1-((3,5-dimethylisoxazol-4-yl)methyl)-1H-pyrazol-4-yl)imidazolidin-2,4-dion (Příklad 10-1) (275 mg, 1 mmol), 1,3-bis(brommethyl)benzen (263 mg, 1 mmol) a uhličitany cesný (325mg, 1 mmol) se rozpustily ve 2 ml DMF a ozařovaly se v mikrovlnném reaktoru při 165 °C po dobu 5 minut. Reakční směs se ochladila na teplotu místnosti a sraženina soli se odstranila filtrací. Čirý roztok obsahující surový produkt se koncentroval a znovu se rozpustil v ethylacetátu. Organický roztok se promyl vodou dvakrát a poté solankou. Organická vrstva se vysušila nad síranem sodným a odpařila se, což dalo surový produkt, který se přenesl do dalšího kroku bez dalšího přečištění nebo charakterizace. 1-(3-(Brommethyl)benzyl)-3-(1-((3,5-dimethylisoxazol-4-yl)methyl)-1H-pyrazol-4-yl)imidazolidin-2,4-dion (Příklad 42a) (152 mg, 0,3 mmol), dimethylamin (2 M roztok v THF) (1,5 ml, 3 mmol) a hydrid sodný (9 mg, 0,36 mmol) se rozpustily v 1 ml bezvodého THF. Reakční směs se umístila do mikrovlnného reaktoru po dobu 5 minut při 120 °C. Surový produkt se znovu rozpustil ve 2 ml ethanolu a přečistil se HPLC (10-95% acetonitril/voda, 25 minut), což dalo 1-(3-((dimethylamino)methyl)benzyl)-3-(1-((3,5-dimethylisoxazol-4-yl)methyl)-1H-pyrazol-4-yl)imidazolidin-2,4-dion (16 mg, 13%). MS M+H vypočteno 423,1; nalezeno 423,1. Titulní sloučenina vykazovala inhibici hT2R08 receptoru hořkosti a měla IC₅₀ 1,2 μM.

Příklad 10-38: 3-(1-((3,5-dimethylizoxazol-4-yl)methyl)-1H-pyrazol-4-yl)-1-((1-methyl-1H-pyrazol-3-yl)methyl)imidazolidin-2,4-dion:



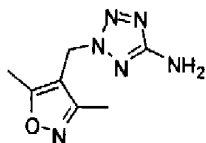
[00531] Připravený jak v Příkladu 10-5 z 3-(1-((3,5-dimethylizoxazol-4-yl)methyl)-1H-pyrazol-4-yl)imidazolidin-2,4-dionu (Příklad 10-1) a 3-(brommethyl)-1-methyl-1H-pyrazolu. Výtěžek 19%. MS M+H vypočteno 370,1; nalezeno 370. Titulní sloučenina vykazala inhibici hT2R08 receptoru hořkosti a měla IC_{50} 0,4 μ M.

Příklad 10-39: N-(2-((3,5-dimethylizoxazol-4-yl)methyl)-2H-tetrazol-5-yl)-3-methoxybenzamid



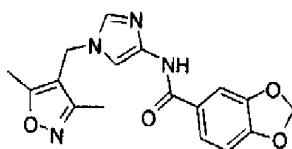
[00532] 2-((3,5-dimethylizoxazol-4-yl)methyl)-2H-tetrazol-5-amin (Příklad 10-39a) (102 mg, 0,528 mmol), 3-methoxybenzoylchlorid (0,065 ml, 0,528 mmol) a pyridin (0,043 ml, 0,528 mmol) v acetonitrilu (3 ml) se míchaly při 100 °C po dobu jedné hodiny. Reakční směs se zředila dichlormethanem (30 ml) a promyla se solankou (30 ml). Organické vrstvy se vysušily nad síranem sodným, koncentrovaly se a přečistily pomocí reverzní fázové HPLC (systém rozpouštědel: acetonitril/voda 10% až 100% gradient), 25 minutový běh), což dalo N-(2-((3,5-dimethylizoxazol-4-yl)methyl)-2H-tetrazol-5-yl)-3-methoxybenzamid jako bílou krystalickou pevnou látku (60 mg, 35 % výtěžek) MS M+H vypočteno 329,1, nalezeno 329, ^1H NMR (400MHz, DMSO- d_6): δ 2,02 (s, 3H), 2,46 (s, 3H), 3,81 (s, 3H), 5,78 (s, 2H), 7,16 (m, 1H), 7,42 (t, J = 8 Hz, 2H), 7,54 (m, 1H), 11,3 (s, 1H). Sloučenina měla IC_{50} 1,87 μ M na hT2R8 receptoru hořkosti.

Příklad 10-39a: 2-((3,5-dimethylizoxazol-4-yl)methyl)-2H-tetrazol-5-amin



[00533] 2H-Tetrazol-5-amin (1,29 g, 12,5 mmol), 4-(chlormethyl)-3,5-dimethylizoxazol (1,56 ml, 12,5 mmol) a uhličitán draselný (1,73 g, 15,5 mmol) v DMF (20 ml) se zahřívaly na 80 °C za stálého míchání po dobu 16 hodin. Reakční směs se ochladila na teplotu místnosti, zředila se dichlormethanem (100 ml), a pak následně se promývala solankou a vodou. Organické vrstvy se vysušily nad síranem sodným a koncentrovaly se na rotační odparce. Surový produkt se přečistil chromatografií na silikagelu (0 – 10 % gradient ethylacetát/ dichlormethan), což dalo 2-((3,5-dimethylizoxazol-4-yl)methyl)-2H-tetrazol-5-amin jako bílou krystalickou pevnou látku (970 mg, 40 % výtěžek) MS M+H vypočteno 195,1, nalezeno 195.

Příklad 10-40: N-(1-((3,5-dimethylizoxazol-4-yl)methyl)-1H-imidazol-4-yl)benzo[d][1,3]dioxol-5-karboxamid



[00534] 1-((3,5-Dimethylizoxazol-4-yl)methyl)-1H-imidazol-4-amin (Příklad 10-40a) (110 mg, 0,57 mmol), benzo[d][1,3]dioxol-5-karbonylchlorid (105 mg, 0,57 mmol) a triethylamin (90 µl, 0,69 mmol) v dichlormethanu se míchal po dobu 16 hodin. Reakční směs se zředila dichlormethanem (30 ml) a následně promývala solankou a vodou. Organické vrstvy se vysušily nad síranem sodným a koncentrovaly se na rotační odparce. Surový produkt se přečistil reverzní fázové HPLC (systém rozpouštědel: acetonitril/voda, 10% až 100% gradient, 25 minutový běh), což dalo N-(1-((3,5-dimethylizoxazol-4-yl)methyl)-1H-imidazol-4-yl)benzo[d][1,3]dioxol-5-karboxamid jako bílou krystalickou pevnou látku (32 mg, 15 % výtěžek). MS M+H vypočteno 341,3, nalezeno 341,3. ¹H NMR (400MHz, DMSO-d₆): δ 2,08 (s, 3H), 2,41 (s, 3H), 5,02 (s, 2H), 6,07 (s, 2H), 6,95 (d, J = 8,4 Hz, 1H),

7,27 (d, $J = 1,6$ Hz, 1H), 7,54 (m, 3H), 10,6 (s, 1H). Sloučenina měla IC_{50} 12,1 μ M na hT2R8 receptoru hořkosti.

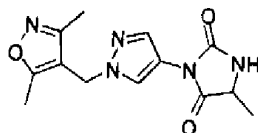
Příklad 10-40a: 1-((3,5-dimethylizoxazol-4-yl)methyl)-1H-imidazol-4-amin

[00535] 3,5-Dimethyl-4-((4-nitro-1H-imidazol-1-yl)methyl)izoxazol (Příklad 10-40b) (1,0 g, 4,5 mmol) a 10% palladium na aktivním uhlí (200 mg) v metanolu (40 ml) se třepaly na Parrově třepačce pod tlakem 250 kPa (2,5 bar) vodíku po dobu 2 hodin. Filtrace přes zátku celitu následována odpařením v rotační odparce dala vzniku 1-((3,5-dimethylizoxazol-4-yl)-methyl)-1H-imidazol-4-aminu jako žluto-červené pevné látky (800 mg, 93 % Výtěžek). MS M+H vypočteno 193, nalezeno 193.

Příklad 10-40b: 3,5-dimethyl-4-((4-nitro-1H-imidazol-1-yl)methyl)izoxazol

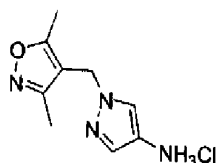
[00536] 3,5-Dimethyl-4-((4-nitro-1H-imidazol-1-yl)methyl)izoxazol se připravil stejným postupem jako v Příkladu 10-41c alkylací 4-nitro-1H-imidazolu, což dalo 3,5-dimethyl-4-((4-nitro-1H-imidazol-1-yl)methyl)izoxazol jako bílou krystalickou pevnou látku (5,0 g, 80% výtěžek). MS M+H vypočteno 223, nalezeno 223. ^1H NMR (400MHz, DMSO- d_6): δ , ppm: 2,09 (s, 3H), 2,43 (s, 3H), 5,15 (s, 2H), 7,90 (d, $J = 1,6$ Hz, 1H), 8,35 (d, $J = 1,9$ Hz, 1H).

Příklad 10-41: 3-(1-((3,5-dimethylizoxazol-4-yl)methyl)-1H-pyrazol-4-yl)-5-methylimidazolidin-2,4-dion



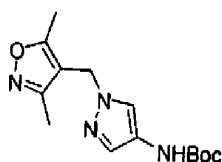
[00537] Hydrochlorid 1-((3,5-dimethylizoxazol-4-yl)methyl)-1H-pyrazol-4-aminu (Příklad 10-41a) (1,0 g, 5,20 mmol), ethyl-(2-izokynatepropionát) (0,745 g, 5,20 mmol) a triethylamin (1,5 ml, 10,4 mmol) se smíchaly v EtOH (20 ml). Reakční směs se refluxovala po dobu 12 hodin a pak se ponechala ochladit na teplotu místnosti. Rozpouštědlo se odstranilo za vakua a krystaly se vytvořily v průběhu stání. Krystaly se sebraly a promyly hexany, což dalo 3-(1-((3,5-dimethylizoxazol-4-yl)methyl)-1H-pyrazol-4-yl)-5-methylimidazolidin-2,4-dion v 80% výtěžku jako bílou pevnou látku. ^1H NMR (DMSO- d_6 , 400 MHz): δ 1,53-1,51 (d, 3H), 2,19 (s, 3H), 2,42 (s, 3H), 4,21-4,19 (m, 1H), 5,06 (s, 2H), 6,00 (bs, 1H), 7,90 (s, 1H), 8,05 (s, 1H). Titulní sloučenina vykazovala inhibici hT2R08 receptoru hořkosti a měla IC_{50} 1,3 μ M.

Příklad 10-41a: hydrochlorid 1-((3,5-dimethylizoxazol-4-yl)methyl)-1H-pyrazol-4-aminu



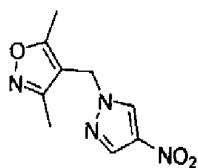
[00538] Terc.butyl-(1-((3,5-dimethylizoxazol-4-yl)methyl)-1H-pyrazol-4-ylkarbamát) (Příklad 10-41b) (592 mg, 2 mmol) se míchal v roztoku 4N HCl v dioxanu (20 ml) při teplotě okolí po dobu 2 hodin. Rozpouštědlo se odstranilo a zbytek se rozpustil ve směsi 1/1 ethylacetát/hexany (30 ml) a koncentroval se dvakrát. Pevná látka se třela s hexany a sebrala se filtrací, což dalo hydrochlorid 1-((3,5-dimethylizoxazol-4-yl)methyl)-1H-pyrazol-4-aminu (500 mg, 99%) jako bílou pevnou látku. ^1H NMR (DMSO- d_6 , 400 MHz); δ 2,11 (s, 3H), 2,38 (s, 3H), 5,16 (s, 2H), 7,51 (s, 1H), 8,03 (s, 1H), 10,27 (bs, 3H).

Příklad 10-41b: terc.butyl-(1-((3,5-dimethylizoxazol-4-yl)methyl)-1H-pyrazol-4-ylkarbamát)



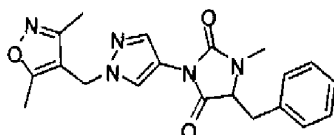
[00539] 3,5-Dimethyl-4-((4-nitro-1H-pyrazol-1-yl)methyl)izoxazol (Příklad 10-41c) (12 g, 53,8 mmol) a BOC anhydrid (12,8 g, 64 mmol) se rozpustily ve směsi 3/1/1 MeOH/EtOH/THF (300 ml) v Parrově reakční nádobě, načež následoval přídavek 10% Pd/C (1,5 g). Směs se třepala Parrově hydrogenátoru při 202,65 kPa (2 atmosférách) vodíku po dobu 3 hodin. Směs se zfiltrovala přes 7,62cm (3 palcovou) zátku celitu a koncentrovala se na rotační odparce. Růžový olej se přečistil chromatografií na silikagelu (25% ethylacetát v hexanech), což dalo terc.butyl-(1-((3,5-dimethylizoxazol-4-yl)methyl)-1H-pyrazol-4-ylkarbamát) (12,6 g, 80%) jako růžový/červený olej, který během stání ztuhne za vzniku světle růžové pevné látky. ^1H NMR (CDCl_3 , 400 MHz); δ 1,41 (s, 9H), 2,10 (s, 3H), 2,32 (s, 3H), 4,90 (s, 2H), 6,19 (bs, 1H), 7,19 (s, 1H), 7,50 (s, 1H).

Příklad 10-41c: 3,5-dimethyl-4-((4-nitro-1H-pyrazol-1-yl)methyl)izoxazol



[00540] 1H-Pyrazol (10 g, 147 mmol) se přidal v malých dávkách do koncentrované H_2SO_4 (100 ml), ochlazené na 0 °C pomocí ledové lázně, přičemž se udržovala vnitřní reakční teplota pod 40 °C. Po kapkách se opatrně do reakční směsi přidala koncentrovaná HNO_3 (10 ml) za současného udržení vnitřní reakční teploty pod 55 °C. Reakční směs se pak zahřála na 55 °C a míchala se po dobu 5 hodin. Směs se ochladila na 0 °C a opatrně se přidal (pH~8) vodný NaOH roztok (110 g NaOH v 150 ml H_2O), dokud se nevytvořila bílá sraženina, přičemž se pečlivě udržovala vnitřní reakční teplota roztoku pod 40 °C. Bílá pevná látka se odfiltrovala a promyla se ethylacetátem/hexany (1/3), pak se vysušila *ve vakuu*, což dalo 4-nitro-1H-pyrazol (7g, 42% izolovaný výtěžek). ^{13}C NMR (DMSO-d_6 , 137,0, 126,4. Do 4-nitro-1H-pyrazolu (9 g, 80 mmol) v DMF (100 ml) 100 MHz) δ se přidal uhličitán cesný (26 g, 80 mmol), načež následoval přídavek 4-(chlormethyl)-3,5-dimethylizoxazolu (12,3 g, 85 mmol). Reakční směs se míchala v DMF (100 ml) při 80 °C po dobu 30 minut, pak se ochladila, zředila se H_2O (150 ml) a extrahovala se ethylacetátem (3x, 75 ml). Spojené organické vrstvy se vysušily nad síranem sodným, zfiltrovaly se a koncentrovaly se. Zbytek se sebral do ethylacetátu (200 ml) a promyl se H_2O (2x, 100 ml). Organická vrstva se vysušila nad síranem sodným, zfiltrovala se a koncentrovala se. Pevný produkt se třel ethylacetátem/hexany (1/9) a sebral se filtrací. Produkt se vysušil za vysokého vakua, což dalo 3,5-dimethyl-4-((4-nitro-1H-pyrazol-1-yl)methyl)izoxazol (12g, 67%) jako světle žlutou pevnou látku. ^1H NMR (CDCl_3 , 400 MHz); δ 2,23 (s, 3H), 2,46 (s, 3H), 5,08 (s, 2H), 8,02 (s, 1H), 8,08 (s, 1H).

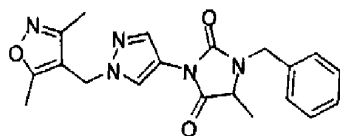
Příklad 10-42: 5-benzyl-3-(1-((3,5-dimethylizoxazol-4-yl)methyl)-1H-pyrazol-4-yl)-1-methylimidazolidin-2,4-dion



[00541] Připravený jak v Příkladu 10-5 z 5-benzyl-3-(1-((3,5-dimethylizoxazol-4-yl)methyl)-1H-pyrazol-4-yl)imidazolidin-2,4-dion (Příklad 10-2) a jodmethan. Výtěžek: 95%. ^1H NMR (CDCl_3 , 400 MHz): δ 2,04 (s, 3H), 2,15 (s, 3H), 2,96 (s, 3H), 3,24-3,23 (m, 2H, $J = 4,0$ Hz), 4,23-4,21 (m, 1H), 5,00 (s, 2H), 7,24-7,23 (m, 5H, $J = 4,0$ Hz), 7,70 (s, 1H), 7,87 (s, 1H).

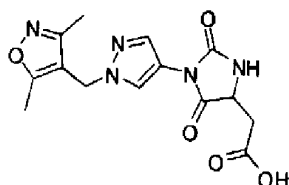
[00542] Titulní sloučenina vykazala inhibici hT2R08 receptoru hořkosti a měla IC_{50} 0,15 μM .

Příklad 10-43: 1-benzyl-3-(1-((3,5-dimethylizoxazol-4-yl)methyl)-1H-pyrazol-4-yl)-5-methylimidazolidin-2,4-dion



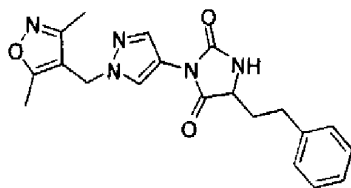
[00543] Připravený jak v Příkladu 10-5 z 3-(1-((3,5-dimethylizoxazol-4-yl)methyl)-1H-pyrazol-4-yl)-5-methylimidazolidin-2,4-dionu (Příklad 10-41) a benzylbromidu. Výtěžek: 50%. ^1H NMR (CDCl_3 , 400 MHz): δ 1,44 (s, 3H), 2,19 (s, 3H), 3,88 (s, 3H), 4,18 (d, $J = 8$ Hz, 2H), 4,22 (t, 1H, $J = 4$ Hz), 5,06 (s, 2H), 7,39 – 7,29 (m, 5H), 7,94 (s, 1H), 8,10 (s, 1H). Titulní sloučenina vykazala inhibici hT2R08 receptoru hořkosti a měla IC_{50} 0,02 μM .

Příklad 10-44: kyselina 2-(1-(1-((3,5-dimethylizoxazol-4-yl)methyl)-1H-pyrazol-4-yl)-2,5-dioxoimidazolidin-4-yl)octová



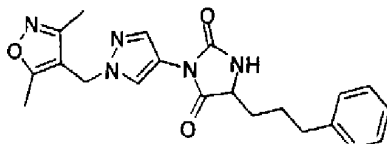
[00544] Připravená jak v Příkladu 10-1 z 1-((3,5-dimethylizoxazol-4-yl)methyl)-1H-pyrazol-4-karbonylazidu (Příklad 10-1a) a H-Asp-OMe. Výtěžek: 85%. MS M+H vypočteno 334,1; nalezeno 334,1

Příklad 10-45: 3-(1-((3,5-dimethylizoxazol-4-yl)methyl)-1H-pyrazol-4-yl)-5-fenethyl-imidazolidin-2,4-dion



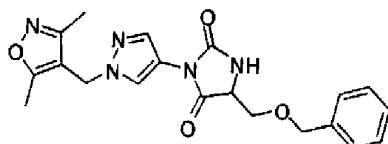
[00545] Přípravný jak v Příkladu 10-1 z 1-((3,5-dimethylizoxazol-4-yl)methyl)-1H-pyrazol-4-karbonylazidu (Příklad 10-1a) a methyl-(2-amino-4-fenylbutanoátu). Výtěžek: 15%. ^1H NMR (CDCl_3 , 400 MHz): δ 2,09-2,02 (m, 2H), 2,19 (s, 3H), 2,41 (s, 3H), 2,83-2,78 (m, 2H), 4,13-4,09 (t, 1H, $J = 8$ Hz), 5,05 (s, 2H), 5,95 (bs, 1H), 7,30-7,19 (m, 5H), 7,95 (s, 1H), 8,03 (s, 1H). Titulní sloučenina vykazovala inhibici hT2R08 receptoru hořkosti a měla IC_{50} 0,22 μM .

Příklad 10-46: 3-(1-((3,5-dimethylizoxazol-4-yl)methyl)-1H-pyrazol-4-yl)-5-(3-fenylpropyl)imidazolidin-2,4-dion



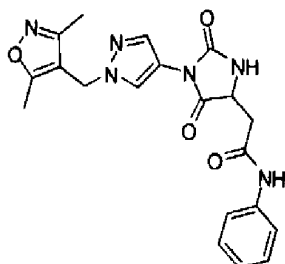
[00546] Připravený jak v Příkladu 10-1 z 1-((3,5-dimethylizoxazol-4-yl)methyl)-1H-pyrazol-4-karbonylazidu (Příklad 10-1a) a methyl-(2-amino-5-fenylpentanoátu). Výtěžek: 20%. ^1H NMR (CDCl_3 , 400 MHz): δ 1,72-1,68 (m, 1H), 1,85-1,78 (m, 2H), 1,99-1,91 (m, 1H), 2,19 (s, 3H), 2,41 (s, 3H), 2,69-2,63 (t, $J = 8$ Hz, 2H), 4,13 (bs, 1H), 5,05 (s, 2H), 5,95 (bs, 1H), 7,30-7,19 (m, 5H), 7,95 (s, 1H), 8,03 (s, 1H). Titulní sloučenina vykazala inhibici hT2R08 receptoru hořkosti a měla IC_{50} 0,17 μM .

Příklad 10-47: 5-(benzyloxymethyl)-3-(1-((3,5-dimethylizoxazol-4-yl)methyl)-1H-pyrazol-4-yl)imidazolidin-2,4-dion



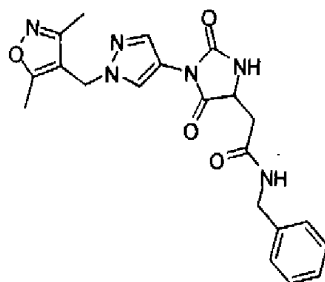
[00547] Připravený jak v Příkladu 10-1 z 1-((3,5-dimethylizoxazol-4-yl)methyl)-1H-pyrazol-4-karbonylazidu (Příklad 10-1a) a methyl-(2-amino-3-(benzyloxy)propanoátu). Výtěžek: 32%. ^1H NMR (CDCl_3 , 400 MHz): δ 2,19 (s, 3H), 2,43 (s, 3H), 3,70-3,67 (m, 1H), 3,89-3,86 (m, 1H), 4,31-4,30 (m, 1H), 4,56-4,32 (d, $J = 1,6$ Hz, 2H), 5,05 (s, 2H), 5,62 (bs, 1H), 7,35-7,29 (m, 5H), 7,88 (s, 1H), 8,04 (s, 1H). Titulní sloučenina vykazala inhibici hT2R08 receptoru hořkosti a měla IC_{50} 0,76 μM .

Příklad 10-48: 2-(1-(1-((3,5-dimethylizoxazol-4-yl)methyl)-1H-pyrazol-4-yl)-2,5-dioxoimidazolidin-4-yl)-N-fenylacetamid



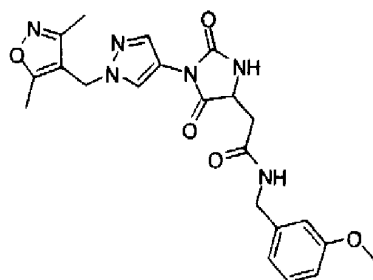
[00548] Kyselina 3-(1-(1-((3,5-dimethylizoxazol-4-yl)methyl)-1H-pyrazol-4-yl)-2,5-dioxoimidazolidin-4-yl)octová (Příklad 10-44) (100 mg, 0,3 mmol), anilin (33 mg, 0,36 mmol), Pybop (187 mg, 0,36 mmol) a triethylamin (0,05 ml, 0,36 mmol) se míchaly v DMF (1 ml). Reakční směs se míchala při 65 °C po dobu 4 hodin. Reakční směs se nechala ochladit na teplotu místnosti a pak se zředila ethylacetátem (2 ml). Organická fáze se promyla roztokem nasyceného hydrogenuhličitanu sodného (2x, 2 ml) a pak nasyceným roztokem NaCl (1 ml). Organická fáze se extrahovala, vysušila se nad bezvodým Na₂SO₄ a zfiltrovala se. Surový produkt se znovu suspendoval v MeOH (1 ml) a přečistil se pomocí reverzní fázové HPLC (5-95% acetonitril v H₂O; 16 minutový gradient). Čisté frakce se spojily a rozpouštědlo se odstranilo na rotační odparce, což dalo 2-(1-(1-((3,5-dimethylizoxazol-4-yl)methyl)-1H-pyrazol-4-yl)-2,5-dioxoimidazolidin-4-yl)-N-fenylacetamid jako bílou pevnou látku (50%).
¹H NMR (CDCl₃, 400 MHz): δ 2,18 (s, 3H), 2,40 (s, 3H), 2,72 (m, 1 H), 3,14-3,13 (d, 1H, *J* = 4 Hz), 4,54-4,51 (d, *J* = 8 Hz 1H), 5,04 (s, 2H), 6,53 (bs, 1H), 7,15-7,13 (m, 1H), 7,33-7,22 (m, 2H), 7,47-7,45 (d, *J* = 8 Hz, 2H), 7,78 (bs, 1H), 7,09 (s, 1H), 8,05 (s, 1H).
 Titulní sloučenina vykazovala inhibici hT2R08 receptoru hořkosti a měla IC₅₀ 0,75 μM.

Příklad 10-49: N-benzyl-2-(1-(1-((3,5-dimethylizoxazol-4-yl)methyl)-1H-pyrazol-4-yl)-2,5-dioxoimidazolidin-4-yl)acetamid



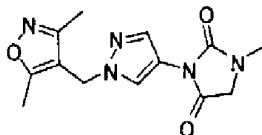
[00549] Připravený jak v Příkladu 10-48 z kyseliny 3-(1-(1-((3,5-dimethylizoxazol-4-yl)methyl)-1H-pyrazol-4-yl)-2,5-dioxoimidazolidin-4-yl)octové (Příklad 10-44) a benzylaminu. Výtěžek: 30%. ^1H NMR (CDCl_3 , 400 MHz): δ 2,18 (s, 3 H), 2,41 (s, 3 H), 2,56-2,52 (m, 1H, $J = 16$ Hz), 2,56-2,52 (m, 1H), 3,00-2,96 (m, 1H), 4,45-4,44 (d, $J = 5,6$ Hz, 2H), 5,04 (s, 2H), 5,96 (bs, 1H), 6,36 (bs, 1H), 7,36 – 7,25 (m, 5H), 7,90 (s, 1H), 8,05 (s, 1H). Titulní sloučenina vykazovala inhibici hT2R08 receptoru hořkosti a měla IC_{50} 1,3 μM .

Příklad 10-50: 2-(1-(1-((3,5-dimethylizoxazol-4-yl)methyl)-1H-pyrazol-4-yl)-2,5-dioxoimidazolidin-4-yl)-N-(3-methoxybenzyl)acetamid



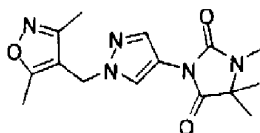
[00550] Připravený jak v Příkladu 10-48 z kyseliny 3-(1-(1-((3,5-dimethylizoxazol-4-yl)methyl)-1H-pyrazol-4-yl)-2,5-dioxoimidazolidin-4-yl)octové (Příklad 10-44) a (3-methoxyfenyl)methanaminu. Výtěžek: 50%. LC/MS; očekáváno 453; nalezeno 453,1. Titulní sloučenina vykazovala inhibici hT2R08 receptoru hořkosti a měla IC_{50} 1,7 μM .

Příklad 10-51: 3-(1-(1-((3,5-dimethylizoxazol-4-yl)methyl)-1H-pyrazol-4-yl)-1-methylimidazolidin-2,4-dion



[00551] 3-(1-((3,5-Dimethylisoxazol-4-yl)methyl)-1H-pyrazol-4-yl)imidazolidin-2,4-dion (Příklad 10-1) (50 mg, 0,182 mmol) a uhlíčitan cesný (60 mg, 0,185 mmol) se míchaly v DMF (1 ml) po dobu 15 minut v dusíkové atmosféře při teplotě místnosti. Pak se přidal jodmethan (14 mg, 0,185 mmol) a reakční směs se dále míchala po dobu dalších 2 hodin. H₂O (2 ml) se přidala a produkt se extrahoval ethylacetátem (1 ml, 2x). Organická fáze se sebrala a promyla se roztokem nasyceného hydrogenuhličitanu sodného (2ml, 2x), vysušila se a zfiltrovala se. Rozpouštědlo se odstranilo pod proudem dusíku a pak se dále vysušilo za vysokého vakua, což dalo 3-(1-((3,5-dimethylisoxazol-4-yl)methyl)-1H-pyrazol-4-yl)-1-methylimidazolidin-2,4-dion jako bílou pevnou látku (42 mg, 80%). Výtěžek: 80%. ¹H NMR (CDCl₃, 400 MHz): δ 2,18 (s, 3H), 2,41 (s, 3H), 3,06 (s, 3H), 3,95 (s, 2H), 5,05 (s, 2H), 7,89 (s, 1H), 8,05 (s, 1H). Titulní sloučenina vykazovala inhibici hT2R08 receptoru hořkosti a měla IC₅₀ 0,58 μM.

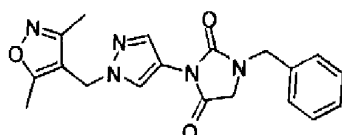
Příklad 10-52: 3-(1-((3,5-dimethylisoxazol-4-yl)methyl)-1H-pyrazol-4-yl)-1,5,5-trimethylimidazolidin-2,4-dion



[00552] 3-(1-((3,5-Dimethylisoxazol-4-yl)methyl)-1H-pyrazol-4-yl)-5-methylimidazolidin-2,4-dion (Příklad 10-41) (50 mg, 0,173 mmol) a 60% NaH (8 mg, 0,190 mmol) se míchaly v DMF (1 ml) po dobu 30 minut. MeI (0,04 ml, 0,190 mmol) se přidal a reakční směs se míchala další 4 hodiny. Reakční směs se okyselila 1N HCl a zředila se ethylacetátem (2 ml). Organická fáze se vysušila, zfiltrovala a rozpouštědlo se odstranilo pod proudem dusíku. Surový produkt se znovu suspendoval v MeOH (1 ml) a přečistil pomocí reverzní fázové HPLC (5 až 95% acetonitril v H₂O: 16 minutový gradient). Čisté frakce se spojily a rozpouštědlo odstranilo za vakua, což dalo 3-(1-((3,5-dimethylisoxazol-4-yl)methyl)-1H-pyrazol-4-yl)-1,5,5-trimethylimidazolidin-2,4-dion jako bílou pevnou látku (25 mg, 50%). ¹H NMR (CDCl₃, (CDCl₃, 400 MHz): δ 1,45 (s, 6H), 2,19 (s, 3H), 2,42 (s, 3H), 2,94 (s, 3 H),

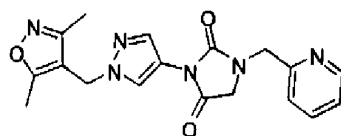
5,05 (s, 2 H), 7,92 (s, 1 H), 8,08 (s, 1H). Titulní sloučenina vykazala inhibici hT2R08 receptoru hořkosti a měla IC_{50} 0,80 μ M.

Příklad 10-53: 1-benzyl-3-(1-((3,5-dimethylizoxazol-4-yl)methyl)-1H-pyrazol-4-yl)imidazolidin-2,4-dion



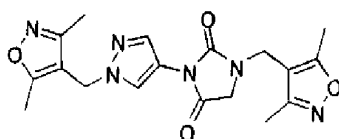
[00553] Připravený jak v Příkladu 10-5 z 3-(1-((3,5-dimethylizoxazol-4-yl)methyl)-1H-pyrazol-4-yl)imidazolidin-2,4-dionu (Příklad 10-1) a benzylbromidu. Výtěžek: 40%. ^1H NMR ($CDCl_3$, 400 MHz): δ 2,18 (s, 3H), 2,42 (s, 3H), 3,84 (s, 2H), 4,61 (s, 2 H), 5,06 (s, 2H), 7,40 – 7,27 (m, 5H), 7,92 (s, 1 H), 8,08 (s, 1H). Titulní sloučenina vykazala inhibici hT2R08 receptoru hořkosti a měla IC_{50} 0,09 μ M.

Příklad 10-54: 3-(1-((3,5-dimethylizoxazol-4-yl)methyl)-1H-pyrazol-4-yl)-1-(pyridin-2-ylmethyl)imidazolidin-2,4-dion



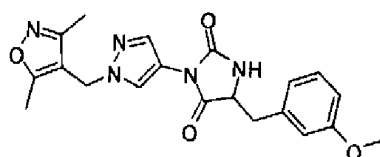
[00554] Připravený jak v Příkladu 10-5 z 3-(1-((3,5-dimethylizoxazol-4-yl)methyl)-1H-pyrazol-4-yl)imidazolidin-2,4-dionu a 2-(brommethyl)pyridinu. Výtěžek: 50%. ^1H NMR ($CDCl_3$, 400 MHz): δ 2,19 (s, 3H), 2,41 (s, 3H), 4,12 (s, 2H), 4,71 (s, 2H), 5,05 (s, 2H), 7,72-7,23 (m, 4H), 7,92 (s, 1H) 8,08 (s, 1H). Titulní sloučenina vykazala inhibici hT2R08 receptoru hořkosti a měla IC_{50} 0,68 μ M.

Příklad 10-55: 1-((3,5-dimethylizoxazol-4-yl)methyl)-3-(1-((3,5-dimethylizoxazol-4-yl)methyl)-1H-pyrazol-4-yl)imidazolidin-2,4-dion



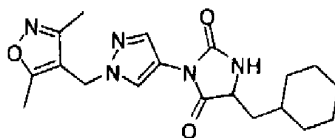
[00555] Připravený jak v Příkladu 10-5 z 3-(1-((3,5-dimethylizoxazol-4-yl)methyl)-1H-pyrazol-4-yl)imidazolidin-2,4-dionu a 4-(chlormethyl)-3,5-dimethylizoxazolu. Výtěžek: 50%. ^1H NMR (CDCl_3 , 400 MHz): 2,19 (s, 3H), 2,27 (s, 3H), 2,43-2,42 (d, $J = 5,2$ Hz, 6H), 3,82 (s, 2H), 4,40 (s, 2H), 5,05 (s, 2H), 7,92 (s, 1H), 8,05 (s, 1H). Titulní sloučenina vykazala inhibici hT2R08 receptoru hořkosti a měla IC_{50} 0,04 μM .

Příklad 10-56: 3-(1-((3,5-dimethylizoxazol-4-yl)methyl)-1H-pyrazol-4-yl)-5-(3-methoxybenzyl)imidazolidin-2,4-dion



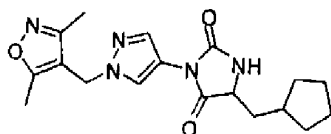
[00556] Hydrochlorid 1-((3,5-dimethylizoxazol-4-yl)methyl)-1H-pyrazol-4-aminu (400 mg, 2,08 mmol), dipyridin-2-yl-(karbonát) (450 mg, 2,08 mmol) a triethylamin (0,290 ml, 2,08 mmol) se míchaly v dichlormethanu (7 ml) po dobu 12 hodin při teplotě místnosti. Reakční směs se koncentrovala za vakua, což dalo 4-((4-izokyanato-1H-pyrazol-1-yl)methyl)-3,5-dimethylizoxazol jako ne zcela bílou pevnou látku v kvantitativním výtěžku. Ethanol (1 ml) se přidal spolu s methyl-(2-amino-3-(3-methoxyfenyl)propanoátem) (68 mg, 0,327 mmol) a triethylaminem (0,064 ml, 0,461 mmol). Reakční směs se míchala při refluxu po dobu 12 hodin, pak se nechala ochladit na teplotu místnosti. Rozpouštědlo se odstranilo pod proudem dusíku. Surový produkt se znovu suspendoval v MeOH (1 ml) a přečistil se pomocí reverzní fázové HPLC (5 až 95% acetonitril v H_2O : 16 minutový gradient). Čisté frakce se spojily a rozpouštědlo se odstranilo za vakua, což dalo 3-(1-((3,5-dimethylizoxazol-4-yl)methyl)-1H-pyrazol-4-yl)-5-(3-methoxybenzyl)imidazolidin-2,4-dion jako bílou pevnou látku. Výtěžek: 50%. ^1H NMR (CDCl_3 , 400 MHz): δ 2,19 (s, 3 H), 2,41 (s, 3H), 3,34-3,33 (d, $J = 3,2$ Hz, 1H), 3,31-3,29 (d, $J = 8$ Hz, 1H), 3,76 (s, 3H), 4,33-4,30 (m, 1H), 5,05 (s, 2H), 5,95 (bs, 1H), 7,25-7,21 (t, 1H), 6,82-6,78 (m, 3H), 7,85 (s, 1H), 7,99 (s, 1H). Titulní sloučenina vykazala inhibici hT2R08 receptoru hořkosti a měla IC_{50} 0,13 μM .

Příklad 10-57: 5-(cyklohexylmethyl)-3-(1-((3,5-dimethylizoxazol-4-yl)methyl)-1H-pyrazol-4-yl)imidazolidin-2,4-dion



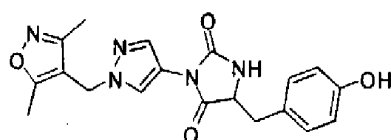
[00557] Připravený jak v Příkladu 10-56 z hydrochloridu 1-((3,5-dimethylisoxazol-4-yl)methyl)-1H-pyrazol-4-aminu (Příklad 10-41a) a methyl-(2-amino-3-cyklohexylpropanoátu). Výtěžek: 30%. ^1H NMR (CDCl_3 , 400 MHz): δ 1,06-0,95 (m, 2H), 1,29-1,15 (m, 3H), 1,60-1,50 (1H), 1,77-1,67 (7 H), 1,91-1,85 (m, 1H), 2,19 (s, 3H), 2,41 (s, 3H), 4,19 (s, 1H), 4,15 (m, 1H), 5,05 (s, 2H), 6,01 (bs, 1H), 7,91 (s, 1H), 8,05 (s, 1H). Titulní sloučenina vykazala inhibici hT2R08 receptoru hořkosti a měla IC_{50} 0,96 μM .

Příklad 10-58: 5-(cyklopentylmethyl)-3-(1-((3,5-dimethylisoxazol-4-yl)methyl)-1H-pyrazol-4-yl)imidazolidin-2,4-dion



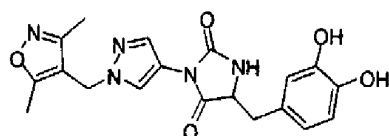
[00558] Připravený jak v Příkladu 10-56 z hydrochloridu 1-((3,5-dimethylisoxazol-4-yl)methyl)-1H-pyrazol-4-aminu (Příklad 10-41a) a methyl-(2-amino-3-cyklopentylpropanoátu). Výtěžek: 50%. ^1H NMR (CDCl_3 , 400 MHz): δ 1,20-1,14 (m, 3H), 1,68-1,55 (m, 6H), 2,04-1,92 (m, 2H), 2,19 (s, 3H), 2,42 (s, 3H), 4,14-4,11 (m, 1H), 5,05 (s, 2H), 5,52 (bs, 1H), 7,90 (s, 1H), 8,06 (s, 1H). Titulní sloučenina vykazala inhibici hT2R08 receptoru hořkosti a měla IC_{50} 0,31 μM .

Příklad 10-59: 3-(1-((3,5-dimethylizoxazol-4-yl)methyl)-1H-pyrazol-4-yl)-5-(4-hydroxybenzyl)imidazolidin-2,4-dion



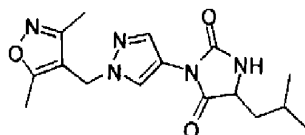
[00559] Připravený jak v Příkladu 10-56 z hydrochloridu 1-((3,5-dimethylizoxazol-4-yl)methyl)-1H-pyrazol-4-aminu (Příklad 10-41a) a methyl-(2-amino-3-(4-hydroxyfenyl)-propanoátu). Výtěžek: 50%. ^1H NMR (CDCl_3 , 400 MHz): δ 2,41 (s, 3H), 2,85 (s, 3H), 3,26-3,25 (d, 1H, $J = 4$ Hz), 3,23-3,22 (d, $J = 4$ Hz, 1H), 4,31-4,28 (m, 1H), 5,04 (s, 2H), 5,77-5,74 (bs, 1H), 7,07-7,04 (d, $J = 12$ Hz, 2H), 6,75-6,73 (d, $J = 8$ Hz, 2H), 7,06 (s, 1H), 7,97 (s, 1H), 9,43 (bs, 1H). Titulní sloučenina vykazala inhibici hT2R08 receptoru hořkosti a měla IC_{50} 0,33 μM .

Příklad 10-60: 5-(3,4-dihydroxybenzyl)-3-(1-((3,5-dimethylizoxazol-4-yl)methyl)-1H-pyrazol-4-yl)imidazolidin-2,4-dion



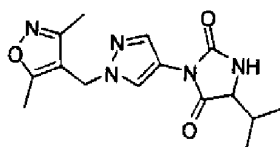
[00560] Připravený jak v Příkladu 10-56 z hydrochloridu 1-((3,5-dimethylizoxazol-4-yl)methyl)-1H-pyrazol-4-aminu (Příklad 10-41a) a methyl-(2-amino-3-(3,4-dihydroxyfenyl)propanoátu). Výtěžek: 50%. MS $\text{M}+\text{H}$ vypočteno 398,1; nalezeno 398,1. Titulní sloučenina vykazala inhibici hT2R08 receptoru hořkosti a měla IC_{50} 0,51 μM .

Příklad 10-61: 3-(1-((3,5-dimethylizoxazol-4-yl)methyl)-1H-pyrazol-4-yl)-5-izobutyl-imidazolidin-2,4-dion



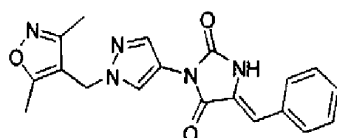
[00561] Připravený jak v Příkladu 10-41 z hydrochloridu 1-((3,5-dimethylizoxazol-4-yl)methyl)-1H-pyrazol-4-aminu (Příklad 10-41a) a ethyl-(2-izokyanato-4-methyl-pentanoátu). Výtěžek: 50%. ^1H NMR (CDCl_3 , 400 MHz): δ 1,01-0,98 (m, 8H), 1,87-1,82 (m, 1H), 2,19 (s, 3H), 2,41 (s, 3H), 4,13-4,12 (t, 1H), (5,05 (s, 2H), 5,70 (bs, 1H), 7,90 (s, 1H), 8,05 (s, 1H). Titulní sloučenina vykazala inhibici hT2R08 receptoru hořkosti a měla IC_{50} 1,0 μM .

Příklad 10-62: 3-(1-((3,5-dimethylizoxazol-4-yl)methyl)-1H-pyrazol-4-yl)-5-izopropyl-imidazolidin-2,4-dion



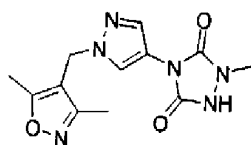
[00562] Připravený jak v Příkladu 10-41 z hydrochloridu 1-((3,5-dimethylizoxazol-4-yl)methyl)-1H-pyrazol-4-aminu (Příklad 10-41a) a ethyl-(2-izokyanato-3-methylbutanoátu). Výtěžek: 30%. ^1H NMR (CDCl_3 , 400 MHz): δ 0,96-0,94 (d, 3H, $J = 7,2$ Hz), 1,09-1,07 (d, 3H, $J = 8$ Hz), 2,19 (s, 3H), 2,26-2,22 (m, 1H), 2,40 (s, 3H), 4,02 (s, 1H), 5,05 (s, 2H), 5,53 (bs, 1H), 7,90 (s, 1H), 8,05 (s, 1H). Titulní sloučenina vykazala inhibici hT2R08 receptoru hořkosti a měla IC_{50} 1,1 μM .

Příklad 10-63: (Z)-5-benzyliden-3-(1-((3,5-dimethylizoxazol-4-yl)methyl)-1H-pyrazol-4-yl)imidazolidin-2,4-dion



[00563] 3-(1-((3,5-Dimethylizoxazol-4-yl)methyl)-1H-pyrazol-4-yl)imidazolidin-2,4-dion (Příklad 10-1) (275 mg, 1 mmol), benzaldehyd (140 mg, 1,3 mmol) a octan sodný (205 mg, 2,5 mmol) v kyselině octové (3 ml) se ozařovaly v mikrovlnném reaktoru po dobu 7 hodin při 185 °C. Po ochlazení se směs zředila H₂O (100 ml) a extrahovala se ethylacetátem (3x, 50 ml). Spojené organické extrakty se promyly roztokem nasyceného vodného uhličitanu sodného, vysušily se nad síranem sodným, zfiltrovaly se a koncentrovaly se. Pevný produkt se třel ethylacetátem/hexany (1/1) a vysušil se za vysokého vakua, což dalo (Z)-5-benzyliden-3-(1-((3,5-dimethylizoxazol-4-yl)methyl)-1H-pyrazol-4-yl)imidazolidin-2,4-dion (173 mg, 48%) jako světle žlutou pevnou látku. ¹H NMR (DMSO-d₆, 400 MHz): δ 2,14 (s, 3H), 2,40 (s, 3H), 6,59 (s, 1H), 5,20 (s, 2H), 7,33-7,40 (m, 3H), 7,66 (s, 2H), 7,81 (s, 1H), 8,21 (s, 1H), 11,01 (bs, 1H). Titulní sloučenina vykazovala inhibici hT2R08 receptoru hořkosti a měla IC₅₀ 0,34 μM.

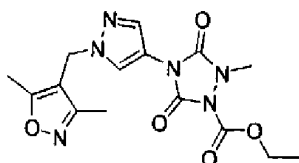
Příklad 10-64: 4-(1-((3,5-dimethylizoxazol-4-yl)methyl)-1H-pyrazol-4-yl)-1-methyl-1,2,4-triazolidin-3,5-dion



[00564] Ethyl-(4-(1-((3,5-dimethylizoxazol-4-yl)methyl)-1H-pyrazol-4-yl)-2-methyl-3,5-dioxo-1,2,4-triazolidin-1-karboxylát) (3,2 g, 8,8 mmol) se míchal ve směsi (1/1) MeOH/1N vodný NaOH (100 ml) při teplotě okolí po dobu 30 minut. Směs se okyselila vodnou 1N HCl (150 ml), extrahovala se ethylacetátem (3x, 100 ml), vysušila se nad síranem sodným, zfiltrovala se a koncentrovala se, což dalo 4-(1-((3,5-dimethylizoxazol-4-yl)methyl)-1H-

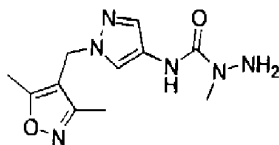
-pyrazol-4-yl)-1-methyl-1,2,4-triazolidin-3,5-dion (2,3 g, 89%) jako žlutou pevnou látku. ^1H NMR (DMSO- d_6 , 400 MHz): δ 2,18 (s, 3H), 2,44 (s, 3H), 3,05 (s, 3H), 5,17 (s, 2H), 7,94 (s, 1H), 8,13 (s, 1H).

Příklad 10-64a: ethyl-(4-(1-((3,5-dimethylizoxazol-4-yl)methyl)-1H-pyrazol-4-yl)-2-methyl-3,5-dioxo-1,2,4-triazolidin-1-karboxylát)



[00565] Ethyl(chlorformiát) (1,3 g, 12 mmol) se přidal do směsi N-(1-((3,5-dimethylizoxazol-4-yl)methyl)-1H-pyrazol-4-yl)-1-methylhydrazinkarboxamidu (Příklad 10-64b) (2,5 g, 9 mmol) a triethylaminu (1,2 g, 12 mmol) v acetonitrilu (100 ml). Směs se refluxovala po dobu 1 hodiny, ochladila se, pak se zředila 1N vodnou HCl (150 ml) a extrahovala se ethylacetátem (3x, 75 ml). Spojené organické extrakty se vysušily nad síranem sodným, zfiltróvaly se a koncentrovaly se na rotační odparce. Pevná látka se třela s ethylacetátem/hexany (1/3) a vysušila se za vysokého vakua, což dalo ethyl-(4-(1-((3,5-dimethylizoxazol-4-yl)methyl)-1H-pyrazol-4-yl)-2-methyl-3,5-dioxo-1,2,4-triazolidin-1-karboxylát) (3,2 g, 94%) jako bílou pevnou látku. ^1H NMR (DMSO- d_6 , 400 MHz): δ 1,28 (t, $J=7,2$ Hz, 3H), 2,13 (s, 3H), 2,40 (s, 3H), 3,24 (s, 3H), 4,30 (t, $J=7,2$ Hz, 2H), 5,21 (s, 2H), 7,73 (m, 1H), 8,16 (s, 1H).

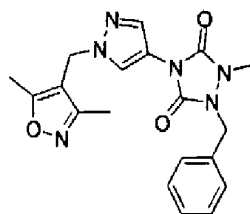
Příklad 10-64b: N-(1-((3,5-dimethylizoxazol-4-yl)methyl)-1H-pyrazol-4-yl)-1-methylhydrazinkarboxamid



[00566] 1-((3,5-Dimethylizoxazol-4-yl)methyl)-1H-pyrazol-4-karbonylazid (Příklad 10-1a) (1,25 g, 5,3 mmol) se míchal v toluenu (30 ml) při teplotě refluxu po dobu 40 minut. Směs se ochladila na teplotu okolí a přidal se methylhydrazin (0,3 ml, 260 mg, 5,6 mmol) a směs se refluxovala po dobu 30 minut. Po ochlazení reakční směsi na teplotu místnosti se na rotační

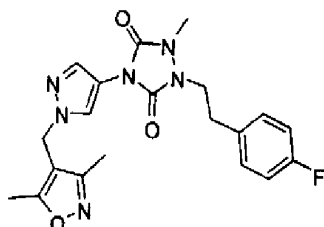
odparce odstranilo rozpouštědlo a pevný produkt se třel s ethylacetátem/hexany (2/5) a vysušil se za vysokého vakua, což dalo N-(1-((3,5-dimethylizoxazol-4-yl)methyl)-1H-pyrazol-4-yl)-1-methylhydrazinkarboxamid (1,1 g, 79%) jako bílou pevnou látku. ¹H NMR (DMSO-d₆, 400 MHz): δ 2,09 (s, 3H), 2,36 (s, 3H), 2,98 (s, 3H), 4,61 (s, 2H), 5,02 (s, 2H), 7,42 (s, 1H), 7,72 (m, 1H), 8,78 (s, 1H).

Příklad 10-65: 1-Benzyl-4-(1-((3,5-dimethylizoxazol-4-yl)methyl)-1H-pyrazol-4-yl)-2-methyl-1,2,4-triazolidin-3,5-dion



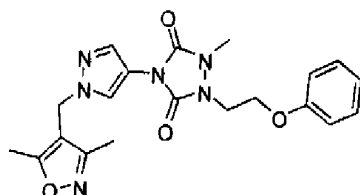
[00567] 4-(1-((3,5-Dimethylizoxazol-4-yl)methyl)-1H-pyrazol-4-yl)-1-methyl-1,2,4-triazolidin-3,5-dion (Příklad 10-64) (785 mg, 2,7 mmol) se rozpustil v acetonitrilu (50 ml). Přidaly se triethylamin (1 g, 10 mmol) a benzylbromid (510 mg, 3 mmol) a reakční směs se míchala při teplotě okolí po dobu 12 hodin. Směs se pak koncentrovala na rotační odparce, rozpustila se v methanolu (5 ml) a přečistila pomocí reverzní fázové HPLC (5-95% acetonitril v H₂O: 25 minutový gradient). Čisté frakce se spojily a koncentrovaly se a produkt se znovu překrystalizoval z ethanolu, což dalo 1-benzyl-4-(1-((3,5-dimethylizoxazol-4-yl)methyl)-1H-pyrazol-4-yl)-2-methyl-1,2,4-triazolidin-3,5-dion (210 mg, 20%) jako bílou pevnou látku. ¹H NMR (DMSO-d₆, 400 MHz): δ 2,13 (s, 3H), 2,39 (s, 3H), 3,09 (s, 3H), 4,81 (s, 2H), 5,18 (s, 2H), 7,30-7,35 (m, 5H), 7,76 (s, 1H), 8,18 (s, 1H). MS M+H vypočteno 381,1; nalezeno 381,1. Teplota tání: 124-126 °C. Titulní sloučenina vykazala inhibici hT2R08 receptoru hořkosti a měla IC₅₀ 0,02 μM.

Příklad 10-66: 1-benzyl-4-(1-((3,5-dimethylizoxazol-4-yl)methyl)-1H-pyrazol-4-yl)-2-methyl-1,2,4-triazolidin-3,5-dion



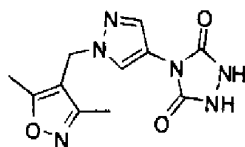
[00568] Připravený jak v Příkladu 10-65 z 4-(1-((3,5-dimethylizoxazol-4-yl)methyl)-1H-pyrazol-4-yl)-1-methyl-1,2,4-triazolidin-3,5-dionu (Příklad 10-64) a 1-(2-bromomethyl)-4-fluorbenzenem. Výtěžek: 14%. ^1H NMR (CDCl_3 , 400 MHz): δ 2,18 (s, 3H), 2,40 (s, 3H), 2,87 (t, $J=6,8$ Hz, 2H), 3,14 (s, 3H), 3,83 (t, $J=7,2$ Hz, 2H), 5,03 (s, 2H), 6,95 (t, $J=8,4$ Hz, 2H), 7,14 (t, $J=8$ Hz, 2H), 7,77 (s, 1H), 7,95 (s, 1H). Titulní sloučenina vykazovala inhibici hT2R08 receptoru hořkosti a měla IC_{50} 0,01 μM .

Příklad 10-67: 4-(1-((3,5-dimethylizoxazol-4-yl)methyl)-1H-pyrazol-4-yl)-1-methyl-2-(2-fenoxyethyl)-1,2,4-triazolidin-3,5-dion



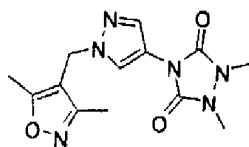
[00569] Připravený jak v Příkladu 10-65 z 4-(1-((3,5-dimethylizoxazol-4-yl)methyl)-1H-pyrazol-4-yl)-1-methyl-1,2,4-triazolidin-3,5-dionu (Příklad 10-64) a (2-bromomethoxy)-benzenem. Výtěžek: 20%. ^1H NMR ($\text{DMSO}-d_6$, 400 MHz): δ 2,13 (s, 3H), 2,40 (s, 3H), 3,15 (s, 3H), 3,99 (t, $J=4,4$ Hz, 2H), 4,13 (t, $J=4,8$ Hz, 2H), 5,20 (s, 2H), 6,80 (d, $J=8$ Hz, 2H), 6,90 (t, $J=7,1$ Hz, 1H), 7,22 (t, $J=8$ Hz, 2H), 7,75 (s, 1H), 8,17 (s, 1H). Titulní sloučenina vykazovala inhibici hT2R08 receptoru hořkosti a měla IC_{50} 0,031 μM .

Příklad 10-68: 4-(1-((3,5-dimethylizoxazol-4-yl)methyl)-1H-pyrazol-4-yl)-1,2,4-triazolidin-3,5-dion



[00570] 1-((3,5-Dimethylizoxazol-4-yl)methyl)-1H-pyrazol-4-karbonylazid (Příklad 10-1a) (1g, 4,1 mmol) se refluxoval v toluenu (100 ml) po dobu jedné hodiny. Reakční směs se ochladila na teplotu místnosti a přidal se ethyl-(hydrazinkarboxylát) (0,45g, 43 mmol). Reakční směs se zahřála na reflux a míchala se po dobu 1 hodiny, pak se ochladila a koncentrovala se na rotační odparce. Zbytek se sebral do ethanolu (100 ml) a přidal se uhlíčitán draselný (100 mg). Směs se refluxovala po dobu 12 hodin, pak se zfiltrovala, ochladila se na teplotu okolí a neutralizovala se kyselinou octovou (přibližně 7 kapkami). Rozpouštědlo se odstranilo na rotační odparce a výsledná pevná látka se třela s ethylacetátem/hexany (1/9), což dalo 4-(1-((3,5-dimethylizoxazol-4-yl)methyl)-1H-pyrazol-4-yl)-1,2,4-triazolidin-3,5-dion (0,98 g, 85%) jako ne zcela bílou pevnou látku. ^1H NMR (CDCl_3 , 400 MHz); δ 2,18 (s, 3H), 2,41 (s, 3H), 4,98 (s, 2H) 7,16 (s, 1H), 7,38 (s, 1H).

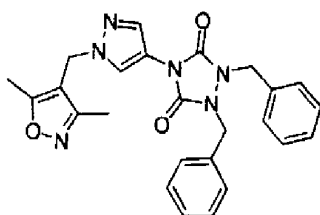
Příklad 10-69: 4-(1-((3,5-dimethylizoxazol-4-yl)methyl)-1H-pyrazol-4-yl)-1,2-dimethyl-1,2,4-triazolidin-3,5-dion



[00571] 4-(1-((3,5-Dimethylizoxazol-4-yl)methyl)-1H-pyrazol-4-yl)-1,2,4-triazolidin-3,5-dion (Příklad 10-68) (100 mg, 0,36 mmol), methyljodid (141 mg, 1 mmol) a uhlíčitán cesný (325 mg, 1 mmol) se míchaly ve směsi 2/1 acetonitril/DMF (5 ml) při teplotě okolí po dobu 2 hodin. Směs se zředila vodnou 1N HCl (100 ml) a extrahovala se ethylacetátem (3x, 50 ml). Spojené organické extrakty se vysušily nad síranem sodným, koncentrovaly se a surový zbytek se sebral do MeOH a přečistil se pomocí reverzní fázové HPLC (5 až 95% acetonitril v H_2O : 25 minutový gradient). Čisté frakce se spojily a koncentrovaly se, což dalo 4-(1-((3,5-

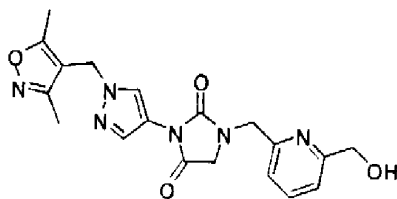
-dimethylizoxazol-4-yl)methyl)-1H-pyrazol-4-yl)-1,2-dimethyl-1,2,4-triazolidin-3,5-dion (89 mg, 80%) jako čirou polotuhou látku. ^1H NMR (CDCl_3 , 400 MHz); δ 2,18 (s, 3H), 2,41 (s, 3H), 3,22 (s, 6H), 5,04 (s, 2H), 7,88 (s, 1H), 8,03 (s, 1H). Titulní sloučenina vykazala inhibici hT2R08 receptoru hořkosti a měla IC_{50} 0,6 μM .

Příklad 10-70: 1,2-Dibenzyl-4-(1-((3,5-dimethylizoxazol-4-yl)methyl)-1H-pyrazol-4-yl)-1,2,4-triazolidin-3,5-dion



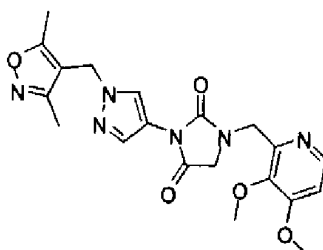
[00572] Připravený jak v Příkladu 10-65 z 4-(1-((3,5-dimethylizoxazol-4-yl)methyl)-1H-pyrazol-4-yl)-1,2-dimethyl-1,2,4-triazolidin-3,5-dionu (Příklad 10-69) a benzylbromidu. Výtěžek: 69%. ^1H NMR (CDCl_3 , 400 MHz); δ 2,14 (s, 3H), 2,36 (s, 3H), 4,65 (s, 4H), 4,99 (s, 2H), 7,06-7,08 (m, 4H), 7,19-7,25 (m, 6H), 7,86 (s, 1H), 8,02 (s, 1H). Titulní sloučenina vykazala inhibici hT2R08 receptoru hořkosti a měla IC_{50} 0,8 μM .

Příklad 10-71: 3-(1-((3,5-dimethylizoxazol-4-yl)methyl)-1H-pyrazol-4-yl)-1-((6-(hydroxymethyl)pyridin-2-yl)methyl)imidazolidin-2,4-dion



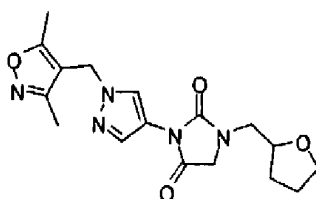
[00573] Připravený jak v Příkladu 10-5 z 3-(1-((3,5-dimethylizoxazol-4-yl)methyl)-1H-pyrazol-4-yl)imidazolidin-2,4-dionu a 6-bromomethyl-2-pyridinmethanolu. Výtěžek: 35%. MS $\text{M}+\text{H}$ vypočteno 397,2; nalezeno 397,2. Titulní sloučenina vykazala inhibici hT2R08 receptoru hořkosti a měla IC_{50} 0,72 μM .

Příklad 10-72: 1-((3,4-dimethoxypyridin-2-yl)methyl)-3-(1-((3,5-dimethylizoxazol-4-yl)methyl)-1*H*-pyrazol-4-yl)imidazolidin-2,4-dion



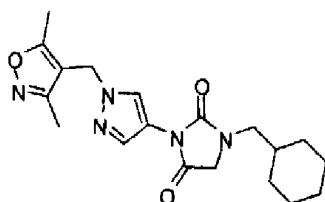
[00574] Připravený jak v Příkladu 10-5 z 3-(1-((3,5-dimethylizoxazol-4-yl)methyl)-1*H*-pyrazol-4-yl)imidazolidin-2,4-dionu a hydrochloridu 3,4-dimethoxy-2-chlormethylpyridinu. Výtěžek: 26%. MS M+H vypočteno 360,2; nalezeno 360,2. Titulní sloučenina vykazala inhibici hT2R08 receptoru hořkosti a měla IC₅₀ 1,0 μM.

Příklad 10-73: 3-(1-((3,5-dimethylizoxazol-4-yl)methyl)-1*H*-pyrazol-4-yl)-1-((6-(tetrahydrofuran-2-yl)methyl)imidazolidin-2,4-dion



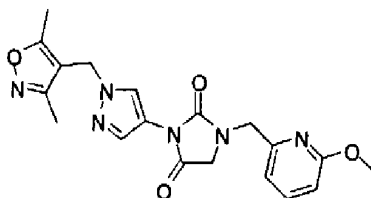
[00575] Připravený jak v Příkladu 10-52 z 3-(1-((3,5-dimethylizoxazol-4-yl)methyl)-1*H*-pyrazol-4-yl)imidazolidin-2,4-dionu a tetrahydrofurfurylbromidu. Výtěžek: 28%. MS M+H vypočteno 427,2; nalezeno 427,2. Titulní sloučenina vykazala inhibici hT2R08 receptoru hořkosti a měla IC₅₀ 1,4 μM.

Příklad 10-74: 1-(cyklohexylmethyl)-3-(1-((3,5-dimethylizoxazol-4-yl)methyl)-1H-pyrazol-4-yl)imidazolidin-2,4-dion



[00576] Připravený jak v Příkladu 10-52 z 3-(1-((3,5-dimethylizoxazol-4-yl)methyl)-1H-pyrazol-4-yl)imidazolidin-2,4-dionu (Příklad 10-1) a brommethylcyklohexanu. Výtěžek: 20%. ^1H NMR (DMSO- d_6 , 400 MHz): δ 0,88 (q, J = 10,4 Hz, 2H), 1,09-1,19 (m, 3H), 1,58-1,65 (m, 6H), 2,12 (s, 3H), 2,38 (s, 3H), 3,13 (d, J = 7,2 Hz, 2H), 4,06 (s, 2H), 5,17 (s, 2H), 7,75 (s, 1H), 8,14 (s, 1H). MS $M+H$ vypočteno 372,2; nalezeno 372,1. Titulní sloučenina vykazovala inhibici hT2R08 receptoru hořkosti a měla IC_{50} 0,28 μM .

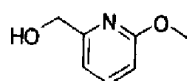
Příklad 10-75: 3-(1-((3,5-dimethylizoxazol-4-yl)methyl)-1H-pyrazol-4-yl)-1-((6-methoxypyridin-2-yl)methyl)imidazolidin-2,4-dion



[00577] 3-(1-((3,5-Dimethylizoxazol-4-yl)methyl)-1H-pyrazol-4-yl)imidazolidin-2,4-dion (100 mg, 0,4 mmol), (6-methoxy-pyridin-2-yl)-methanol (Příklad 10-75a) (101 mg, 0,7 mmol), tributylfosfín (147 mg, 0,7 mmol) a 1,1'-azobis(N,N-dimethylformamid) (125 mg, 0,7 mmol) se rozpustily v THF (5 ml) a míchaly se při teplotě místnosti po dobu 15 hodin. Reakční směs se zředila solankou (100 ml) a extrahovala se ethylacetátem (2x, 100 ml). Spojené organické extrakty se vysušily nad síranem hořečnatým, zfiltrovaly se a koncentrovaly se na rotační odparce. Zbytek se sebral do methanolu (5 ml) a přečistil se pomocí reverzní fázové HPLC (5 až 95% acetonitril v H_2O : 25 minutový gradient). Čisté frakce se spojily, koncentrovaly se, pak se znovu rozpustily ve směsi ethylacetát/hexan (1:9). Roztok se chladil při 5 °C po dobu 15 hodin, přičemž vznikla bílá pevná látka. Sraženina se sebrala, což dalo 3-(1-((3,5-dimethylizoxazol-4-yl)methyl)-1H-pyrazol-4-yl)-1-((6-methoxy-

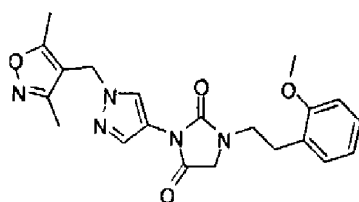
pyridin-2-yl)methyl)imidazolidin-2,4-dion (5 mg, 4%) jako bílou pevnou látku. ^1H NMR (DMSO- d_6 , 400 MHz): δ 2,11 (s, 3H), 2,37 (s, 3H), 3,74 (s, 3H), 4,17 (s, 2H), 4,54 (s, 2H), 5,17 (s, 2H), 6,69 (d, $J = 7,6$ Hz, 1H), 6,96 (d, $J = 6,8$ Hz, 1H), 7,67 (d, $J = 6,8$ Hz, 1H), 7,76 (s, 1H), 8,17 (s, 1H). MS M+H vypočteno 397,2; nalezeno 397,2. Titulní sloučenina vykazala inhibici hT2R08 receptoru hořkosti a měla IC_{50} 0,23 μM .

Příklad 10-75a: (6-methoxypyridin-2-yl)methanol



[00578] Methyl-(6-methoxypyridin-2-karboxylát) (2g, 11.96 mmol) v bezvodém methanolu (20 ml) se ochladil na 0 °C pod dusíkem a do roztoku se pomalu přidával borhydrid sodný (1,36 g, 35,89 mmol). Reakční směs se míchala při 0 °C po dobu 30 minut, pak se ohřívala na teplotu místnosti 1 hodinu. Reakční směs se ukončila vodou a koncentrovala se na rotační odparce. Reakční směs se zředila solankou (100 ml) a extrahovala se roztokem dichlormethan/2-propanolu (2:1) (3x, 150 ml). Spojené organické extrakty se vysušily nad síranem hořečnatým, zfiltrovaly se a koncentrovaly se na rotační odparce, což dalo (6-methoxypyridin-2-yl)methanol (500 mg, 30%) jako olej. MS M+H vypočteno 140,1; nalezeno 140,1.

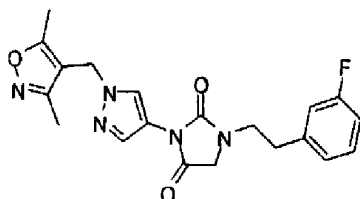
Příklad 10-76: 3-(1-((3,5-dimethylizoxazol-4-yl)methyl)-1H-pyrazol-4-yl)-1-(2-methoxyfenethyl)imidazolidin-2,4-dion



[00579] Připravený jak v Příkladu 10-52 z 3-(1-((3,5-dimethylizoxazol-4-yl)methyl)-1H-pyrazol-4-yl)imidazolidin-2,4-dionu (Příklad 6) a 2-methoxyfenethylbromidu. Výtěžek: 52%. ^1H NMR (DMSO- d_6 , 400 MHz): δ 2,11 (s, 3H), 2,38 (s, 3H), 2,80 (t, $J = 7,2$ Hz, 2H), 3,51 (t, $J = 7,2$ Hz, 2H), 3,75 (s, 3H), 4,03 (s, 2H), 5,17 (s, 2H), 6,85 (t, $J = 7,2$ Hz, 1H), 6,95 (d, $J = 8,4$ Hz, 1H), 7,16-7,21 (m, 2H), 7,73 (s, 1H), 8,13 (s, 1H). MS M+H vypočteno 410,2;

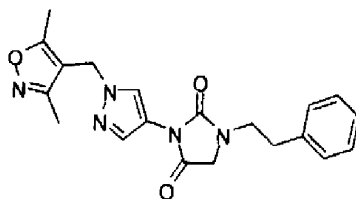
nalezeno 410,1. Teplota tání: 97 až 98 °C. Titulní sloučenina vykazala inhibici hT2R08 receptoru hořkosti a měla IC_{50} 0,14 μ M.

Příklad 10-77: 3-(1-((3,5-dimethylizoxazol-4-yl)methyl)-1*H*-pyrazol-4-yl)-1-(3-fluor-fenethyl)imidazolidin-2,4-dion



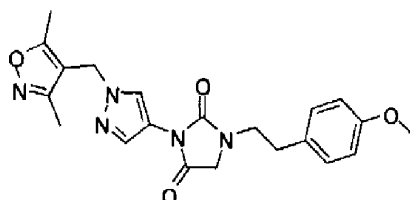
[00580] Připravený jak v Příkladu 10-52 z 3-(1-((3,5-dimethylizoxazol-4-yl)methyl)-1*H*-pyrazol-4-yl)imidazolidin-2,4-dionu (Příklad 10-1) a 3-fluorfenethylbromidu. Výtěžek: 22%. ^1H NMR (DMSO- d_6 , 400 MHz): δ 2,11 (s, 3H), 2,38 (s, 3H), 2,80 (t, J = 7,2 Hz, 2H), 3,57 (t, J = 7,2 Hz, 2H), 4,06 (s, 2H), 5,17 (s, 2H), 6,85 (dt, J = 8,4, 2,0 Hz, 1H), 7,11 (t, J = 8,4 Hz, 2H), 7,32 (q, J = 7,8 Hz, 1H), 7,73 (s, 1H), 8,12 (s, 1H). MS M+H vypočteno 398,2; nalezeno 398,1. Teplota tání: 110-111 °C. Titulní sloučenina vykazala inhibici hT2R08 receptoru hořkosti a měla IC_{50} 0,06 μ M.

Příklad 10-78: 3-(1-((3,5-dimethylizoxazol-4-yl)methyl)-1*H*-pyrazol-4-yl)-1-fenethyl-imidazolidin-2,4-dion



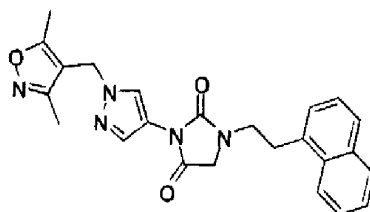
[00581] Připravený jak v Příkladu 10-52 z 3-(1-((3,5-dimethylizoxazol-4-yl)methyl)-1*H*-pyrazol-4-yl)imidazolidin-2,4-dionu (Příklad 10-1) a fenethylbromidu. Výtěžek: 37%. ^1H NMR (DMSO- d_6 , 400 MHz): δ 2,11 (s, 3H), 2,38 (s, 3H), 2,83 (t, J = 6,4 Hz, 2H), 3,55 (t, J = 7,4 Hz, 2H), 4,03 (s, 2H), 5,17 (s, 2H), 7,18-7,30 (m, 5H), 7,73 (s, 1H), 8,13 (s, 1H). MS M+H vypočteno 380,2; nalezeno 380,1. Teplota tání: 95-96 °C. Titulní sloučenina vykazala inhibici hT2R08 receptoru hořkosti a měla IC_{50} 0,14 μ M.

Příklad 10-79: 3-(1-((3,5-dimethylizoxazol-4-yl)methyl)-1*H*-pyrazol-4-yl)-1-(4-methoxyfenethyl)imidazolidin-2,4-dion



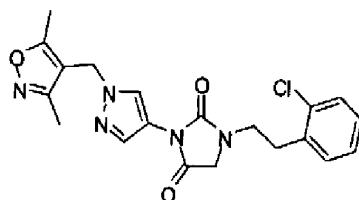
[00582] Připravený jak v Příkladu 10-52 z 3-(1-((3,5-dimethylizoxazol-4-yl)methyl)-1*H*-pyrazol-4-yl)imidazolidin-2,4-dionu (Příklad 10-1) a 4-methoxyfenethylbromidu. Výtěžek: 32%. ¹H NMR (DMSO-*d*₆, 400 MHz): δ 2,11 (s, 3H), 2,38 (s, 3H), 2,78 (t, *J* = 7,4 Hz, 2H), 3,50 (t, *J* = 7,4 Hz, 2H), 3,69 (s, 3H), 4,02 (s, 2H), 5,16 (s, 2H), 6,84 (d, *J* = 8,4 Hz, 2H), 7,15 (d, *J* = 8,4 Hz, 2H), 7,73 (s, 1H), 8,12 (s, 1H). MS *M*+*H* vypočteno 410,18; nalezeno 410,2. Titulní sloučenina vykazala inhibici hT2R08 receptoru hořkosti a měla IC₅₀ 0,04 μM.

Příklad 10-80: 3-(1-((3,5-dimethylizoxazol-4-yl)methyl)-1*H*-pyrazol-4-yl)-1-(2-naftalen-1-yl)ethyl)imidazolidin-2,4-dion



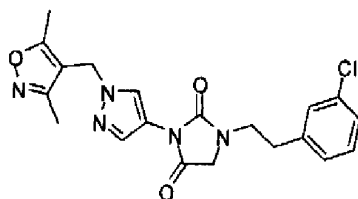
[00583] Připravený jak v Příkladu 10-52 z 3-(1-((3,5-dimethylizoxazol-4-yl)methyl)-1*H*-pyrazol-4-yl)imidazolidin-2,4-dionu (Příklad 10-1) a 1-(2-bromethyl)naftalenu. Výtěžek: 20%. MS *M*+*H* vypočteno 430,18; nalezeno 430,2. Titulní sloučenina vykazala inhibici hT2R08 receptoru hořkosti a měla IC₅₀ 1,27 μM.

Příklad 10-81: 1-(2-chlorfenethyl)-3-(1-((3,5-dimethylizoxazol-4-yl)methyl)-1H-pyrazol-4-yl)imidazolidin-2,4-dion



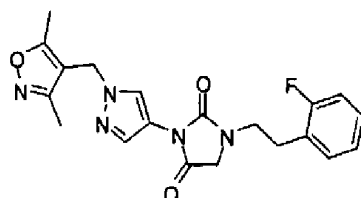
[00584] Připravený jak v Příkladu 10-52 z 3-(1-((3,5-dimethylizoxazol-4-yl)methyl)-1H-pyrazol-4-yl)imidazolidin-2,4-dionu (Příklad 10-1) a 2-chlorfenethylbromidu. Výtěžek: 25%. MS M+H vypočteno 414,13; nalezeno 414,2. Titulní sloučenina vykazala inhibici hT2R08 receptoru hořkosti a měla IC_{50} 0,25 μ M.

Příklad 10-82: 1-(3-chlorfenethyl)-3-(1-((3,5-dimethylizoxazol-4-yl)methyl)-1H-pyrazol-4-yl)imidazolidin-2,4-dion



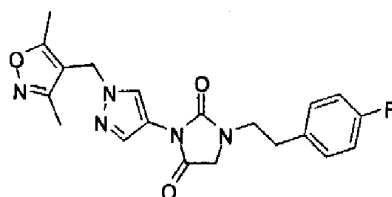
[00585] Připravený jak v Příkladu 10-52 z 3-(1-((3,5-dimethylizoxazol-4-yl)methyl)-1H-pyrazol-4-yl)imidazolidin-2,4-dionu (Příklad 10-1) a 3-chlorfenethylbromidu. Výtěžek: 27%. MS M+H vypočteno 414,13; nalezeno 414,2. Titulní sloučenina vykazala inhibici hT2R08 receptoru hořkosti a měla IC_{50} 0,20 μ M.

Příklad 10-83: 3-(1-((3,5-dimethylizoxazol-4-yl)methyl)-1*H*-pyrazol-4-yl)-1-(2-fluor-fenethyl)imidazolidin-2,4-dion



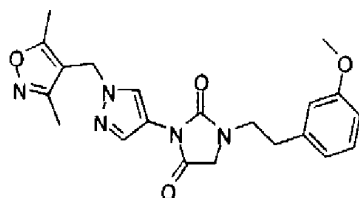
[00586] Připravený jak v Příkladu 10-52 z 3-(1-((3,5-dimethylizoxazol-4-yl)methyl)-1*H*-pyrazol-4-yl)imidazolidin-2,4-dionu (Příklad 10-1) a 2-fluorfenethylbromidu. Výtěžek: 24%. MS $M+H$ vypočteno 398,16; nalezeno 398,1. Titulní sloučenina vykázala inhibici hT2R08 receptoru hořkosti a měla IC_{50} 0,13 μM .

Příklad 10-84: 3-(1-((3,5-dimethylizoxazol-4-yl)methyl)-1*H*-pyrazol-4-yl)-1-(4-fluor-fenethyl)imidazolidin-2,4-dion



[00587] Připravený jak v Příkladu 10-52 z 3-(1-((3,5-dimethylizoxazol-4-yl)methyl)-1*H*-pyrazol-4-yl)imidazolidin-2,4-dionu (Příklad 10-1) a 4-fluorfenethylbromidu. Výtěžek: 34%. MS $M+H$ vypočteno 398,16; nalezeno 398,1. Titulní sloučenina vykázala inhibici hT2R08 receptoru hořkosti a měla IC_{50} 0,01 μM .

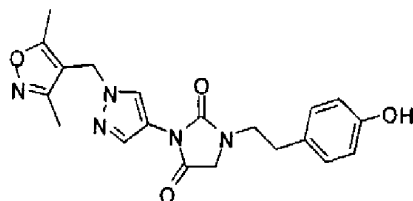
Příklad 10-85: 3-(1-((3,5-dimethylizoxazol-4-yl)methyl)-1*H*-pyrazol-4-yl)-1-(3-methoxy-fenethyl)imidazolidin-2,4-dion



[00588] Připravený jak v Příkladu 10-52 z 3-(1-((3,5-dimethylizoxazol-4-yl)methyl)-1*H*-pyrazol-4-yl)imidazolidin-2,4-dionu (Příklad 10-1) a 3-methoxyfenethylbromidu. Výtěžek:

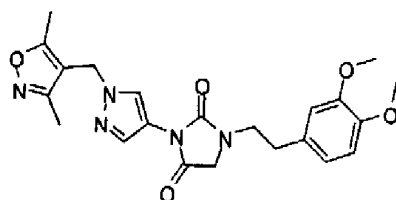
34%. MS M+H vypočteno 410,18; nalezeno 410,1. Titulní sloučenina vykazala inhibici hT2R08 receptoru hořkosti a měla IC_{50} 0,16 μ M.

Příklad 10-86: 3-(1-((3,5-dimethylizoxazol-4-yl)methyl)-1*H*-pyrazol-4-yl)-1-(4-hydroxy-fenethyl)imidazolidin-2,4-dion



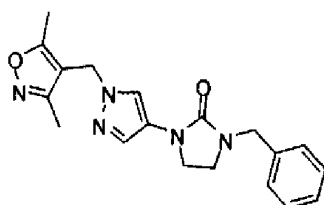
[00589] Připravený jak v Příkladu 10-52 z 3-(1-((3,5-dimethylizoxazol-4-yl)methyl)-1*H*-pyrazol-4-yl)imidazolidin-2,4-dionu (Příklad 10-1) a 4-hydroxyfenethylbromidu. Výtěžek: 31%. MS M+H vypočteno 396,16; nalezeno 396,1. Titulní sloučenina vykazala inhibici hT2R08 receptoru hořkosti a měla IC_{50} 0,41 μ M.

Příklad 10-87: 1-(3,4-dimethoxyfenethyl)-3-(1-((3,5-dimethylizoxazol-4-yl)methyl)-1*H*-pyrazol-4-yl)imidazolidin-2,4-dion



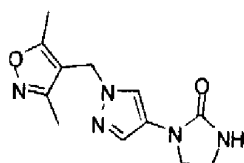
[00590] Připravený jak v Příkladu 10-52 z 3-(1-((3,5-dimethylizoxazol-4-yl)methyl)-1*H*-pyrazol-4-yl)imidazolidin-2,4-dionu (Příklad 10-1) a 3,4-dimethoxyfenethylbromidu. Výtěžek: 36%. MS M+H vypočteno 440,19; nalezeno 440,2. Titulní sloučenina vykazala inhibici hT2R08 receptoru hořkosti a měla IC_{50} 0,26 μ M.

Příklad 10-88: 1-benzyl-3-(1-((3,5-dimethylizoxazol-4-yl)methyl)-1H-pyrazol-4-yl)imidazolidin-2-on



[00591] 1-(1-((3,5-dimethylizoxazol-4-yl)methyl)-1H-pyrazol-4-yl)imidazolidin-2-on (Příklad 10-88a) (50 mg, 0,19 mmol) a 60% hydrid sodný (8 mg, 0,21 mmol) v DMF (3 ml) se míchaly při teplotě místnosti po dobu 15 minut, pak se ochladily na 0 °C. Do směsi se přidal benzylbromid (33 mg, 0,19 mmol) a nechal se ohřívat při teplotě místnosti po dobu 2 hodin. Reakce se ukončila methanolem a koncentrovala se na rotační odparce. Reakční směs se zředila solankou (50 ml) a extrahovala se dichlormethanem (2x, 50 ml). Spojené organické extrakty se vysušily nad síranem hořečnatým, zfiltrovaly se a koncentrovaly se na rotační odparce. Zbytek se přečistil chromatografií na silikagelové koloně (100% až 90% dichlormethan v methanolu: 30 minutový gradient), což dalo 1-benzyl-3-(1-((3,5-dimethylizoxazol-4-yl)methyl)-1H-pyrazol-4-yl)imidazolidin-2-on (21 mg, 31%) jako bílou pevnou látku. MS M+H vypočteno 352,17; nalezeno 352,2. Titulní sloučenina vykazovala inhibici hT2R08 receptoru hořkosti a měla IC₅₀ 0,71 μM.

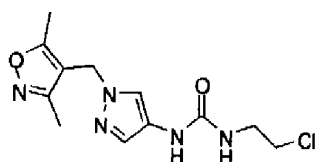
Příklad 10-88a: 1-(1-((3,5-dimethylizoxazol-4-yl)methyl)-1H-pyrazol-4-yl)imidazolidin-2-on



[00592] 1-(2-chlorethyl)-3-(1-((3,5-dimethylizoxazol-4-yl)methyl)-1H-pyrazol-4-yl)-močovina (Příklad 10-88b) (115 mg, 0,39 mmol) a 60% hydrid sodný (17mg, 0,42 mmol) v DMF (2 ml) se míchaly při 0 °C po dobu 15 minut, pak se ponechaly ohřát na teplotu místnosti za současného míchání po dobu 2 hodin. Reakční směs se ukončila methanolem a koncentrovala se na rotační odparce. Reakční směs se zředila solankou (50 ml) a extrahovala se dichlormethanem (2x, 50 ml). Spojené organické extrakty se vysušily nad síranem hořečnatým, zfiltrovaly se a koncentrovaly se na rotační odparce. Zbytek se přečistil

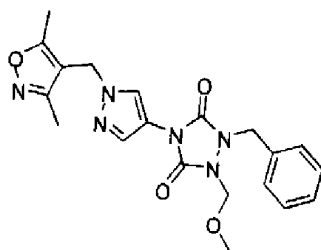
chromatografií na silikagelové koloně (100% až 90% dichlormethanu v methanolu: 30 minutový gradient), což dalo 1-(1-((3,5-dimethylizoxazol-4-yl)methyl)-1*H*-pyrazol-4-yl)-imidazolidin-2-on (98 mg, 97%) jako bílou pevnou látku. ¹H NMR (DMSO-*d*₆, 400 MHz): δ 2,10 (s, 3H), 2,37 (s, 3H), 3,35-3,39 (m, 2H), 3,61 (d, *J* = 8,8 Hz, 1H), 3,63 (d, *J* = 10,4 Hz, 1H), 5,07 (s, 2H), 6,71 (s, 1H), 7,42 (s, 1H), 7,74 (s, 1H). MS *M*+*H* vypočteno 262,12; nalezeno 262,1.

Příklad 10-88b: 1-(2-chlorethyl)-3-(1-((3,5-dimethylizoxazol-4-yl)methyl)-1*H*-pyrazol-4-yl)močovina



[00593] 1-((3,5-Dimethylizoxazol-4-yl)methyl)-1*H*-pyrazol-4-amin (419 mg, 2,18 mmol) a 2-chlorethylizokyanát (230mg, 2,18 mmol) v acetonitrilu (5 ml) se zahřívaly při 65 °C po dobu 16 hodin. Reakční směs se ochladila na teplotu místnosti a koncentrovala se na rotační odparce. Zbytek se přečistil chromatografií na silikagelové koloně (100% až 90% dichlormethanu v methanolu: 30 minutový gradient), vysušil se a třel se s ethylacetátem/hexany (1/9), což dalo 1-(2-chlorethyl)-3-(1-((3,5-dimethylizoxazol-4-yl)methyl)-1*H*-pyrazol-4-yl)močovina (258 mg, 40%) jako žlutá pevná látka. MS *M*+*H* vypočteno 298,10; nalezeno 298,1

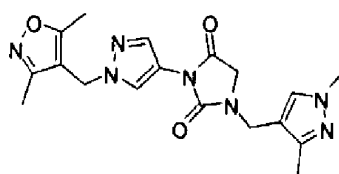
Příklad 10-89: 1-benzyl-4-(1-((3,5-dimethylizoxazol-4-yl)methyl)-1*H*-pyrazol-4-yl)-2-(methoxymethyl)-1,2,4-triazolidin-3,5-dion



[00594] Připravený jak v Příkladu 10-91 z 1-benzyl-4-(1-((3,5-dimethylizoxazol-4-yl)-methyl)-1*H*-pyrazol-4-yl)-1,2,4-triazolidin-3,5-dionu (Příklad 10-91a) a brommethylmethyl-

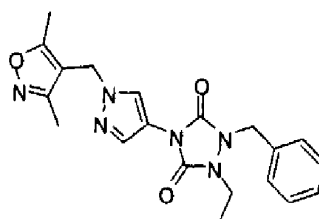
etheru. Výtěžek: 18%. MS M+H vypočteno 411,17; nalezeno 411,2. Titulní sloučenina vykazala inhibici hT2R08 receptoru hořkosti a měla IC_{50} 0,02 μ M.

Příklad 10-90: 1-((1,3-dimethyl-1H-pyrazol-4-yl)methyl)-3-(1-((3,5-dimethylizoxazol-4-yl)methyl)-1H-pyrazol-4-yl)imidazolidin-2,4-dion



[00595] 3-(1-((3,5-dimethylizoxazol-4-yl)methyl)-1H-pyrazol-4-yl)imidazolidin-2,4-dion (10a) (200 mg, 0,7 mmol), 4-(chlormethyl)-1,3-dimethyl-1H-pyrazol (144 mg, 1 mmol) a uhlíčan cesný (325 mg, 1 mmol) se rozpustily v 2 ml DMF a ozařovaly se v mikrovlnném reaktoru při 165 °C po dobu 5 minut. Reakční směs se ochladila na teplotu místnosti a sraženina soli se odstranila filtrací. Získal se čirý roztok obsahující surový produkt a přečistil se HPLC (10 až 95% acetonitril/voda; 25 minut), což dalo 1-((1,3-dimethyl-1H-pyrazol-5-yl)methyl)-3-(1-((3,5-dimethylizoxazol-4-yl)methyl)-1H-pyrazol-4-yl)imidazolidin-2,4-dion (150 mg, 53%) jako světle hnědou pevnou látku. ^1H NMR (DMSO, 400 MHz): δ (s, 3H), 2,14 (s, 3H), 2,20 (s, 3H), 3,70 (s, 3H), 3,99 (s, 2H), 4,55 (s, 2H), 5,19 (s, 2H), 6,06 (s, H), 7,77 (s, H), 8,17 (s, H). MS M+H vypočteno pro 384,2; nalezeno 384,2. Teplota tání: 145 až 146 °C.

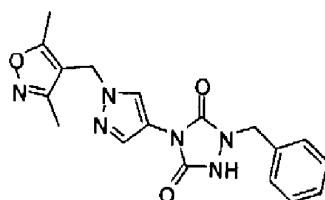
Příklad 10-91: 1-benzyl-4-(1-((3,5-dimethylizoxazol-4-yl)methyl)-1H-pyrazol-4-yl)-2-ethyl-1,2,4-triazolidin-3,5-dion



[00596] 1-benzyl-4-(1-((3,5-dimethylizoxazol-4-yl)methyl)-1H-pyrazol-4-yl)-1,2,4-triazolidin-3,5-dion (100 mg, 0,27 mmol), bromethan (149 mg, 1,36 mmol) a uhlíčan cesný (355 mg, 1,1 mmol) v DMF (5 ml) se zahřívaly se při 80 °C po dobu 15 hodin. Reakční směs se ochladila na teplotu místnosti, zředila se solankou (50 ml) a extrahovala se ethylacetátem

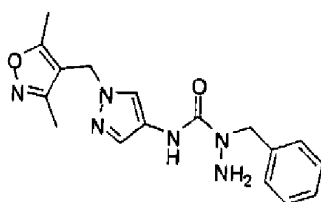
(2x, 50 ml). Spojené organické extrakty se vysušily nad síranem hořečnatým, zfiltrovaly se a koncentrovaly se na rotační odparce. Zbytek se přečistil pomocí HPLC (5 až 95% acetonitril v H₂O: 25 minutový gradient), což dalo 1-benzyl-4-(1-((3,5-dimethylizoxazol-4-yl)methyl)-1*H*-pyrazol-4-yl)-2-ethyl-1,2,4-triazolidin-3,5-dion (40 mg, 37%) jako olej. ¹H NMR (DMSO-*d*₆, 400 MHz): δ 0,97 (t, *J* = 7,2 Hz, 3H), 2,13 (s, 3H), 2,39 (s, 3H), 3,58 (q, *J* = 6,8 Hz, 2H), 4,80 (s, 2H), 5,18 (s, 2H), 7,28-7,36 (m, 5H), 7,77 (s, 1H), 8,19 (s, 1H). MS *M*+*H* vypočteno 395,18; nalezeno 395,2. Titulní sloučenina vykazovala inhibici hT2R08 receptoru hořkosti a měla IC₅₀ 0,04 μM.

Příklad 10-91a: 1-benzyl-4-(1-((3,5-dimethylizoxazol-4-yl)methyl)-1*H*-pyrazol-4-yl)-1,2,4-triazolidin-3,5-dion



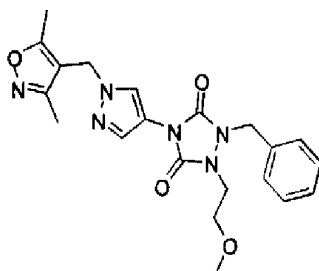
[00597] 1-Benzyl-N-(1-((3,5-dimethylizoxazol-4-yl)methyl)-1*H*-pyrazol-4-yl)hydrazin-karboxamid (2,00g, 5,88 mmol), ethyl-(chlorformiát) (6,38g, 58,77 mmol) a triethylamin (1,78g, 17,63 mmol) v acetonitrilu (50 ml) se zahřívaly při 100 °C po dobu 48 hodin. Směs se ochladila na 80 °C, přidal se vodný 1 M NaOH (5 ml) a reakční směs se míchala po dobu 1 hodiny. Reakční směs se ochladila na teplotu místnosti a koncentrovala na rotační odparce. Zbytek se rozpustil v dichlormethanu a zfiltroval se, aby se odstranily soli a roztok se koncentroval, což dalo 1-benzyl-4-(1-((3,5-dimethylizoxazol-4-yl)methyl)-1*H*-pyrazol-4-yl)-1,2,4-triazolidin-3,5-dion (1,28 g, 60%) jako žlutý olej. MS *M*+*H* vypočteno 367,14; nalezeno 367,2.

Příklad 10-91b: 1-benzyl-N-(1-((3,5-dimethylizoxazol-4-yl)methyl)-1*H*-pyrazol-4-yl)hydrazinkarboxamid



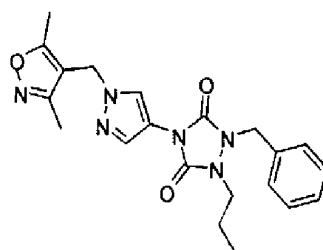
[00598] 1-((3,5-dimethylizoxazol-4-yl)methyl)-1*H*-pyrazol-4-karbonylazid (2,79g, 11,33 mmol) v toluenu (70 ml) se zahřival při refluxu po dobu 4 hodin, což dalo 4-((4-izokyanato-1*H*-pyrazol-1-yl)methyl)-3,5-dimethylizoxazol *in situ*. Dihydrochlorid benzylhydrazinu (2,44 g, 12,45 mmol) a triethylamin (2,29 g, 22,64 mmol) se přidaly do směsi. Směs se zahřívala při 100 °C po dobu dalších 4 hodin. Reakční směs se ochladila na teplotu místnosti, zředila se ethylacetátem (150 ml) a zfiltrovala se přes celit. Mateřský loup se pak promyl solankou (150 ml) a organická vrstva se vysušila nad síranem hořečnatým, zfiltrovala se a koncentrovala se. Zbytek se přečistil chromatografií na silikagelové koloně (100% až 90% dichlormethanu v methanolu: 30 minutový gradient), což dalo 1-benzyl-N-(1-((3,5-dimethylizoxazol-4-yl)methyl)-1*H*-pyrazol-4-yl)hydrazinkarboxamid (2,00g, 52%) jako olej. MS M+H vypočteno 341,16; nalezeno 341,2.

Příklad 10-92: 1-benzyl-4-(1-((3,5-dimethylizoxazol-4-yl)methyl)-1*H*-pyrazol-4-yl)-2-(2-methoxyethyl)-1,2,4-triazolidin-3,5-dion



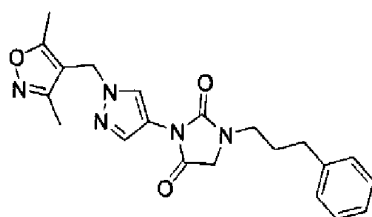
[00599] Připravený jak v Příkladu 10-91 z 1-benzyl-4-(1-((3,5-dimethylizoxazol-4-yl)methyl)-1*H*-pyrazol-4-yl)-1,2,4-triazolidin-3,5-dionu (Příklad 10-91a) a 2-bromethylmethyletheru. Výtěžek: 20%. MS M+H vypočteno 425,19; nalezeno 425,2. Titulní sloučenina vykazala inhibici hT2R08 receptoru hořkosti a měla IC₅₀ 0,06 μM.

Příklad 10-93: 1-benzyl-4-(1-((3,5-dimethylizoxazol-4-yl)methyl)-1*H*-pyrazol-4-yl)-2-propyl-1,2,4-triazolidin-3,5-dion



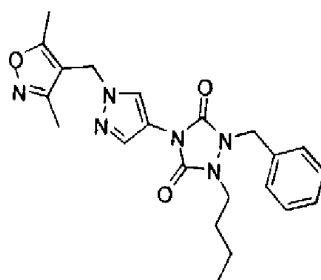
[00600] Připravený jak v Příkladu 10-91 z 1-benzyl-4-(1-((3,5-dimethylisoxazol-4-yl)methyl)-1*H*-pyrazol-4-yl)-1,2,4-triazolidin-3,5-dionu (Příklad 10-91a) a 1-brompropanu. Výtěžek: 38%. MS M+H vypočteno 409,19; nalezeno 409,2. Titulní sloučenina vykazala inhibici hT2R08 receptoru hořkosti a měla IC_{50} 0,06 μ M.

Příklad 10-94: 3-(1-((3,5-dimethylisoxazol-4-yl)methyl)-1*H*-pyrazol-4-yl)-1-(3-fenylpropyl)imidazolidin-2,4-dion.



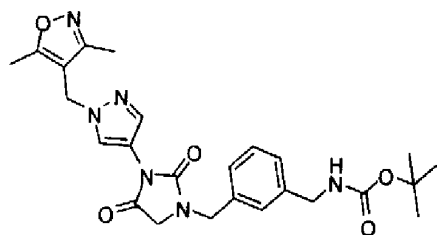
[00601] Připravený jak v Příkladu 10-52 z 3-(1-((3,5-dimethylisoxazol-4-yl)methyl)-1*H*-pyrazol-4-yl)imidazolidin-2,4-dionu (Příklad 10-1) a (3-brompropyl)benzenu. Výtěžek: 36%. MS M+H vypočteno 394,2; nalezeno 394,2. Titulní sloučenina vykazala inhibici hT2R08 receptoru hořkosti a měla IC_{50} 0,26 μ M.

Příklad 10-95: 1-benzyl-2-butyl-4-(1-((3,5-dimethylisoxazol-4-yl)methyl)-1*H*-pyrazol-4-yl)-1,2,4-triazolidin-3,5-dion



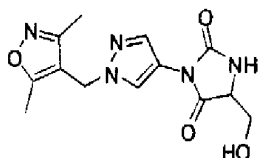
[00602] Připravený jak v Příkladu 10-91 z 1-benzyl-4-(1-((3,5-dimethylisoxazol-4-yl)methyl)-1H-pyrazol-4-yl)-1,2,4-triazolidin-3,5-dionu (Příklad 10-91a) a 1-brombutanu. Výtěžek: 22%. MS M+H vypočteno 423,21; nalezeno 423,15. Titulní sloučenina vykázala inhibici hT2R08 receptoru hořkosti a měla IC_{50} 0,41 μ M.

Příklad 10-96: terc.butylu 3-((3-(1-((3,5-dimethylisoxazol-4-yl)methyl)-1H-pyrazol-4-yl)-2,4-dioxoimidazolidin-1-yl)methyl)benzylkarbamát



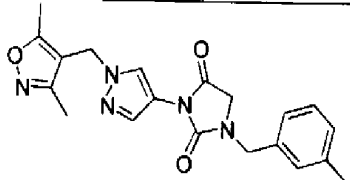
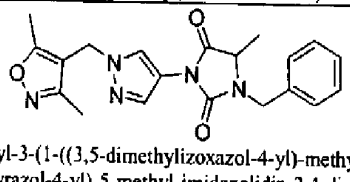
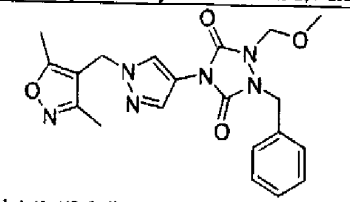
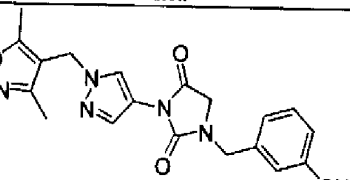
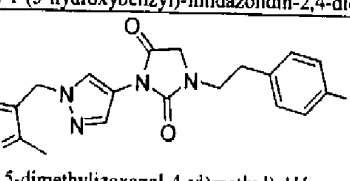
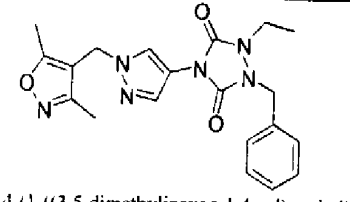
[00603] 3-(1-((3,5-Dimethylisoxazol-4-yl)methyl)-1H-pyrazol-4-yl)imidazolidin-2,4-dion (Příklad 10-1) (070 mg, 0,254 mmol), terc.butyl-(3-(hydroxymethyl)benzylkarbamát) (0,254 mmol, 60 mg), diethyl-(azodikarboxylát) (0,50 mmol, 86 mg) a P-tBu₃ (125 ml, 0,50 mmol) se míchaly v THF (1 ml) po dobu 4 hodin. Reakční směs se zředila ethylacetátem (1,5 ml) a promyla se roztokem nasyceného hydrogenuhličitanu sodného (2x, 1,5 ml). Organická fáze se sebrala a směs se koncentrovala pod proudem dusíku. Surový produkt se přečistil kolonovou chromatografií na silikagelu použitím ethylacetátu, jako elučního činidla. Čisté frakce se spojily a rozpouštědla se odstranila na rotační odparce, což dalo terc.butyl-(3-((3-(1-((3,5-dimethylisoxazol-4-yl)methyl)-1H-pyrazol-4-yl)-2,4-dioxoimidazolidin-1-yl)methyl)-benzylkarbamát) jako bílou pevnou látku (112 mg, 90%). ¹H NMR (CDCl₃, 400 MHz): δ 1,44 (s, 9H), 2,19 (s, 3H), 2,42 (s, 3H), 3,48 (bs, 1H), 3,84 (s, 2H), 4,31-4,30 (d, J = 6 Hz, 1H), 4,60 (s, 2H), 4,87 (bs, 1H), 5,06 (s, 2H), 7,36 – 7,16 (m, 4H), 7,92 (s, 1 H), 8,08 (s, 1H). Titulní sloučenina vykázala inhibici hT2R08 receptoru hořkosti a měla IC_{50} 0,90 μ M.

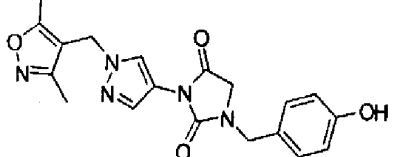
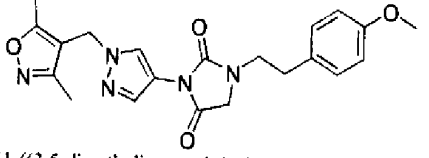
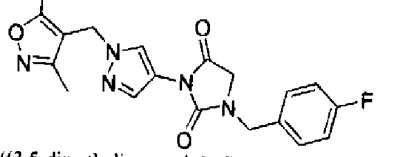
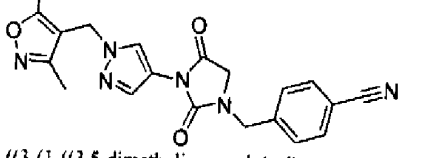
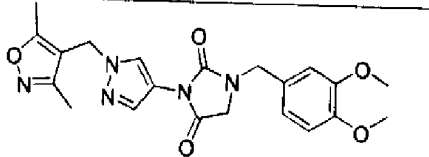
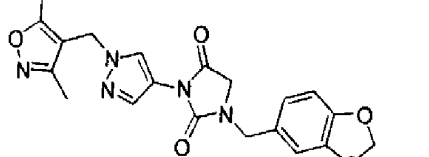
Příklad 10-97: 3-(1-((3,5-dimethylizoxazol-4-yl)methyl)-1H-pyrazol-4-yl)-5-(hydroxymethyl)imidazolidin-2,4-dion

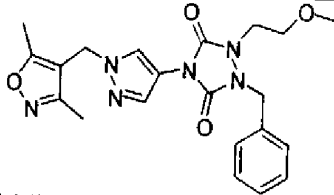
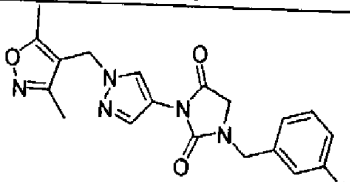
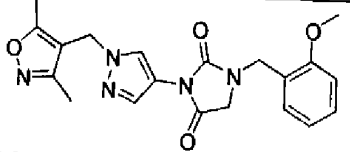
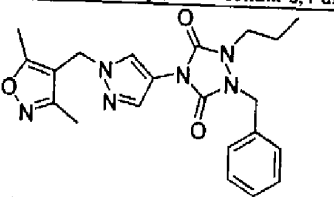
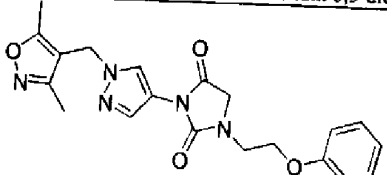
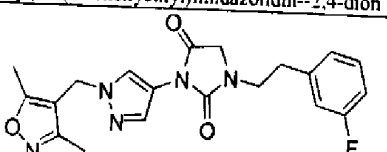


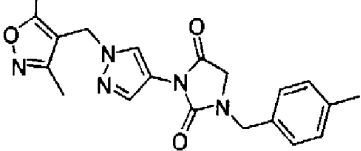
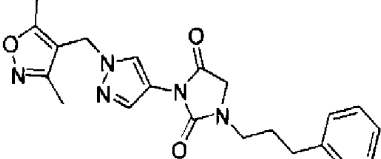
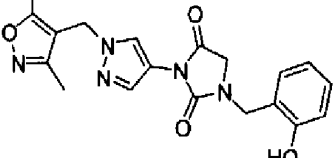
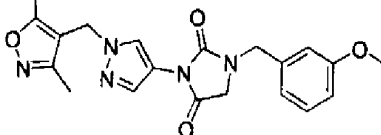
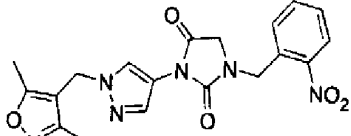
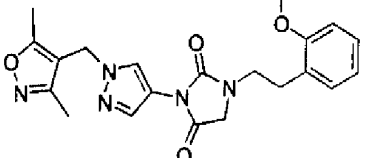
[00604] 4-((4-izokyanato-1H-pyrazol-1-yl)methyl)-3,5-dimethylizoxazol (Příklad 10-1) (784 mg, 3,6 mmol), hydrochlorid methylesteru serinu (672 mg, 432 mmol) a triethylamin (1 ml, 7,2 mmol) se refluxovaly v toluenu (16 ml) po dobu 8 hodin. Reakční směs se nechala ochladit na teplotu místnosti a pak se roztok koncentroval na rotační odparce. Produkt se přečistil reverzní fázovou HPLC (5 až 95% acetonitril v H₂O: 16 minutový gradient), což dalo 3-(1-((3,5-dimethylizoxazol-4-yl)methyl)-1H-pyrazol-4-yl)-5-(hydroxymethyl)-imidazolidin-2,4-dion jako bílou pevnou látku (60 mg, 25%). ¹H NMR (CDCl₃, 400 MHz): δ(s, 3H), 2,40 (s, 3H), 3,13-3,07 (m, 1H), 3,94-3,93 (d, *J* = 4 Hz, 2H), 4,21-4,19 (t, *J* = 4 Hz, 1H), 5,03 (s, 2H), 6,68 (bs, 1H), 7,87 (s, 1H), 7,99 (s, 1H). Titulní sloučenina vykazovala inhibici hT2R08 receptoru hořkosti a měla IC₅₀ 3 μM.

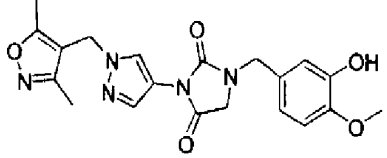
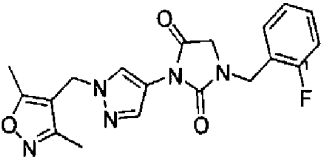
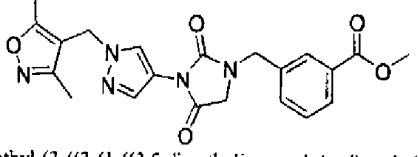
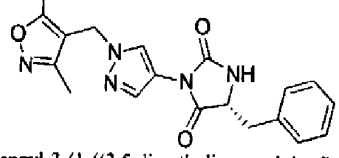
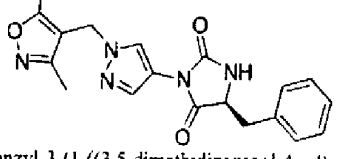
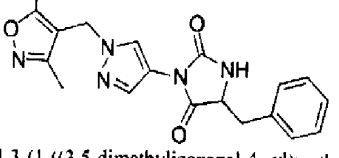
Sloučenina č.	Sloučenina	hT2R8 IC ₅₀ (μM)
10-66	4-(1-((3,5-dimethylizoxazol-4-yl)methyl)-1H-pyrazol-4-yl)-1-(4-fluorfenethyl)-2-methyl-1,2,4-triazolidin-3,5-dion	0,012
10-15	3-(1-((3,5-dimethylizoxazol-4-yl)methyl)-1H-pyrazol-4-yl)-1-(2-(methylthio)benzyl)-imidazolidin-2,4-dion	0,016
10-42	5-benzyl-3-(1-((3,5-dimethylizoxazol-4-yl)methyl)-1H-pyrazol-4-yl)-1-methyl-imidazolidin-2,4-dion	0,017

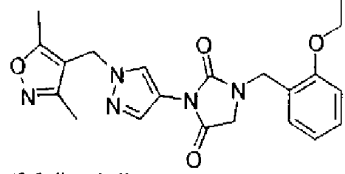
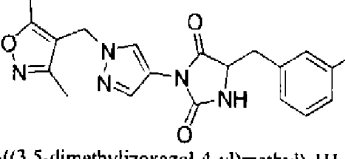
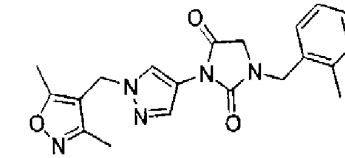
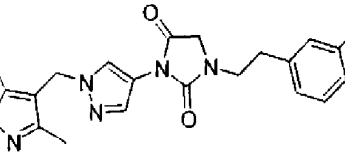
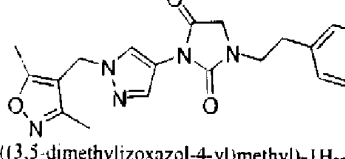
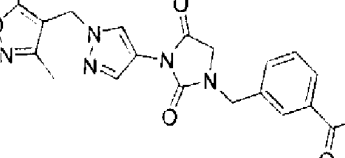
Sloučenina č.	Sloučenina	hT2R8 IC ₅₀ (μM)
10-26	 3-(1-((3,5-dimethylizoxazol-4-yl)methyl)-1H-pyrazol-4-yl)-1-(3-methylbenzyl)-imidazolidin-2,4-dion	0,019
10-43	 1-benzyl-3-(1-((3,5-dimethylizoxazol-4-yl)-methyl)-1H-pyrazol-4-yl)-5-methyl-imidazolidin-2,4-dion	0,020
10-89	 1-benzyl-4-(1-((3,5-dimethylizoxazol-4-yl)-methyl)-1H-pyrazol-4-yl)-2-(methoxymethyl)-1,2,4-triazolidin-3,5-dion	0,024
10-10	 3-(1-((3,5-dimethylizoxazol-4-yl)methyl)-1H-pyrazol-4-yl)-1-(3-hydroxybenzyl)-imidazolidin-2,4-dion	0,026
10-84	 3-(1-((3,5-dimethylizoxazol-4-yl)methyl)-1H-pyrazol-4-yl)-1-(4-fluorophenethyl)imidazolidin-2,4-dion	0,027
10-91	 1-benzyl-4-(1-((3,5-dimethylizoxazol-4-yl)methyl)-1H-pyrazol-4-yl)-2-ethyl-1,2,4-triazolidin-3,5-dion	0,041

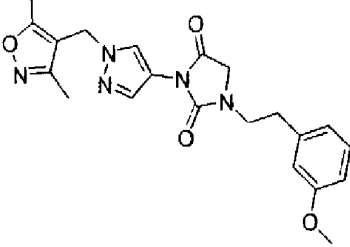
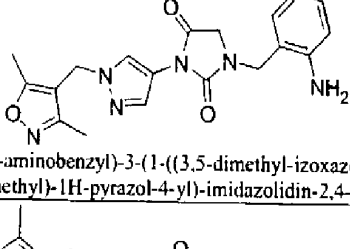
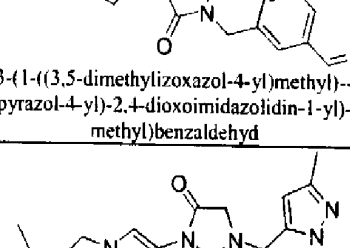
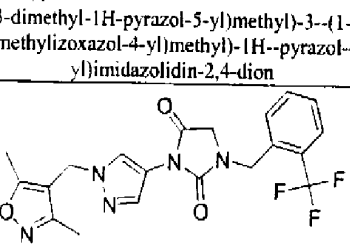
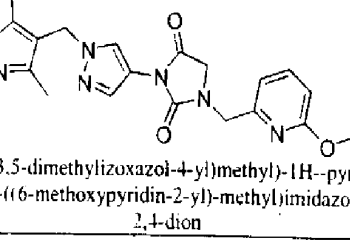
Sloučenina č.	Sloučenina	hT2R8 IC ₅₀ (μM)
10-12	 3-(1-((3,5-dimethylisoxazol-4-yl)methyl)-1H-pyrazol-4-yl)-1-(4-hydroxybenzyl)-imidazolidin-2,4-dione	0,043
10-79	 3-(1-((3,5-dimethylisoxazol-4-yl)methyl)-1H-pyrazol-4-yl)-1-(4-methoxyphenethyl)-imidazolidin-2,4-dione	0,044
10-31	 3-(1-((3,5-dimethylisoxazol-4-yl)methyl)-1H-pyrazol-4-yl)-1-(4-fluorbenzyl)-imidazolidin-2,4-dione	0,045
10-32	 4-((3-(1-((3,5-dimethylisoxazol-4-yl)methyl)-1H-pyrazol-4-yl)-2,4-dioxoimidazolidin-1-yl)methyl)benzonitrile	0,048
10-35	 1-(3,4-dimethoxybenzyl)-3-(1-((3,5-dimethylisoxazol-4-yl)methyl)-1H-pyrazol-4-yl)imidazolidin-2,4-dione	0,051
10-36	 1-(benzo[d][1,3]dioxol-5-ylmethyl)-3-(1-((3,5-dimethylisoxazol-4-yl)methyl)-1H-pyrazol-4-yl)imidazolidin-2,4-dione	0,053

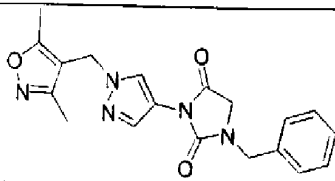
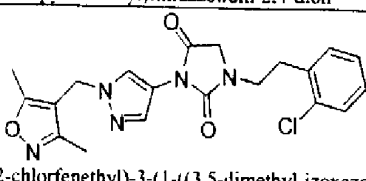
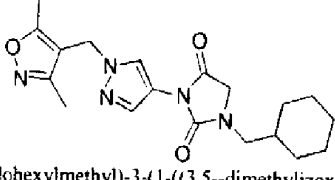
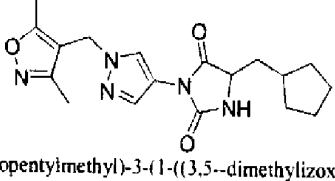
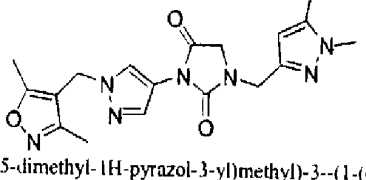
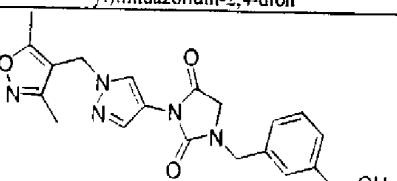
Sloučenina č.	Sloučenina	hT2R IC ₅₀ (μM)
10-92	 1-benzyl-4-(1-((3,5-dimethylizoxazol-4-yl)methyl)-1H-pyrazol-4-yl)-2-(2-methoxyethyl)-1,2,4-triazolidin-3,5-dion	0,057
10-27	 3-(1-((3,5-dimethylizoxazol-4-yl)methyl)-1H-pyrazol-4-yl)-1-(3-fluorobenzyl)imidazolidin-2,4-dion	0,058
10-18	 3-(1-((3,5-dimethylizoxazol-4-yl)methyl)-1H-pyrazol-4-yl)-1-(2-methoxybenzyl)imidazolidin-2,4-dion	0,060
10-93	 1-benzyl-4-(1-((3,5-dimethylizoxazol-4-yl)methyl)-1H-pyrazol-4-yl)-2-propyl-1,2,4-triazolidin-3,5-dion	0,062
10-5	 3-(1-((3,5-dimethylizoxazol-4-yl)methyl)-1H-pyrazol-4-yl)-1-(2-fenoxethyl)imidazolidin-2,4-dion	0,063
10-77	 3-(1-((3,5-dimethylizoxazol-4-yl)methyl)-1H-pyrazol-4-yl)-1-(3-fluorfenethyl)imidazolidin-2,4-dion	0,064

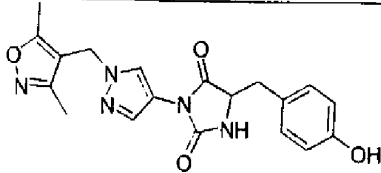
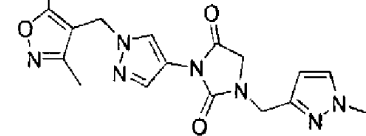
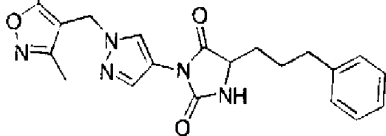
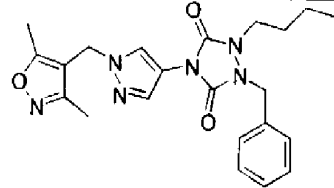
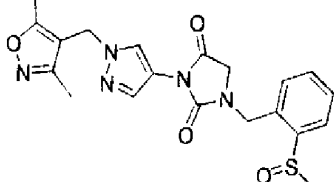
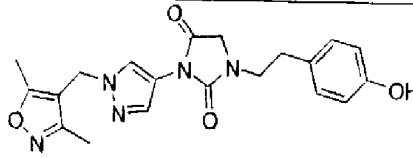
Sloučenina č.	Sloučenina	hT2R8 IC ₅₀ (μM)
10-30	 3-(1-((3,5-dimethylizoxazol-4-yl)methyl)-1H-pyrazol-4-yl)-1-(4-methylbenzyl)-imidazolidin-2,4-dion	0,065
10-94	 3-(1-((3,5-dimethylizoxazol-4-yl)methyl)-1H-pyrazol-4-yl)-1-(3-phenylpropyl)imidazolidin-2,4-dion	0,068
10-11	 3-(1-((3,5-dimethylizoxazol-4-yl)methyl)-1H-pyrazol-4-yl)-1-(2-hydroxybenzyl)imidazolidin-2,4-dion	0,069
10-6	 3-(1-((3,5-dimethylizoxazol-4-yl)methyl)-1H-pyrazol-4-yl)-1-(3-methoxybenzyl)imidazolidin-2,4-dion	0,073
10-23	 3-(1-((3,5-dimethylizoxazol-4-yl)methyl)-1H-pyrazol-4-yl)-1-(2-nitrobenzyl)imidazolidin-2,4-dion	0,081
10-76	 3-(1-((3,5-dimethylizoxazol-4-yl)methyl)-1H-pyrazol-4-yl)-1-(2-methoxyfenethyl)imidazolidin-2,4-dion	0,097

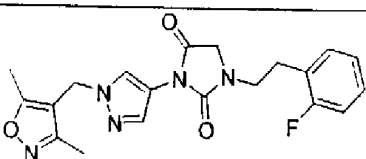
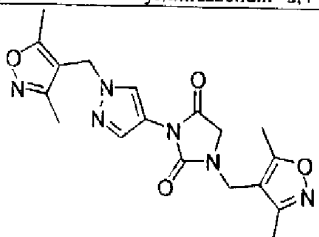
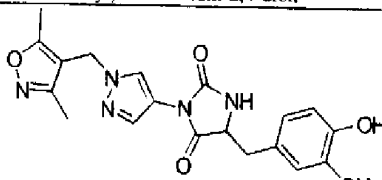
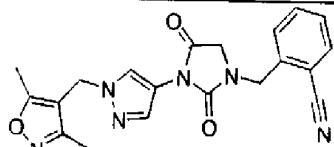
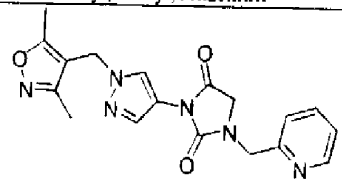
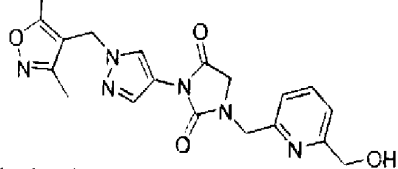
Sloučenina č.	Sloučenina	hT2R8 IC ₅₀ (μM)
10-13	 3-(1-((3,5-dimethylizoxazol-4-yl)methyl)-1H-pyrazol-4-yl)-1-(3-hydroxy-4-methoxy-benzyl)imidazolidin-2,4-dione	0,087
10-21	 3-(1-((3,5-dimethylizoxazol-4-yl)methyl)-1H-pyrazol-4-yl)-1-(2-fluorobenzyl)imidazolidin-2,4-dione	0,090
10-7	 methyl-(3-((1-((3,5-dimethylizoxazol-4-yl)methyl)-1H-pyrazol-4-yl)-2,4-dioxoimidazolidin-1-yl)methyl)benzoát	0,102
10-4	 (R)-5-benzyl-3-(1-((3,5-dimethylizoxazol-4-yl)methyl)-1H-pyrazol-4-yl)imidazolidin-2,4-dione	0,112
10-3	 (S)-5-benzyl-3-(1-((3,5-dimethylizoxazol-4-yl)methyl)-1H-pyrazol-4-yl)imidazolidin-2,4-dione	0,113
10-2	 5-benzyl-3-(1-((3,5-dimethylizoxazol-4-yl)methyl)-1H-pyrazol-4-yl)imidazolidin-2,4-dione	0,117

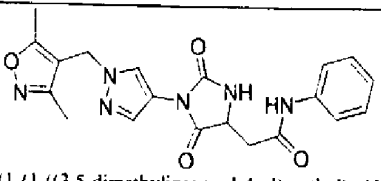
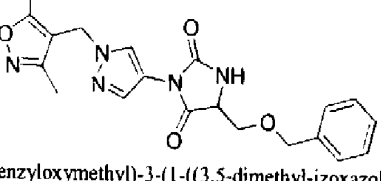
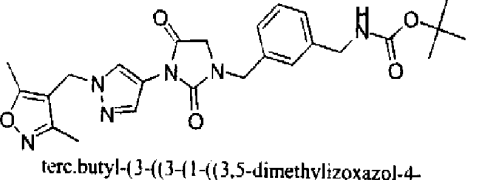
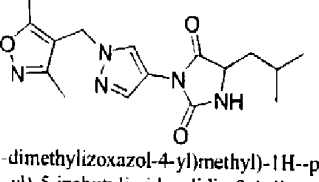
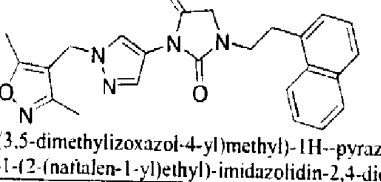
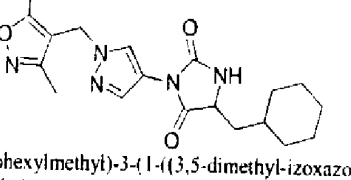
Sloučenina č.	Sloučenina	hT2R8 IC ₅₀ (μM)
10-16	 3-(1-((3,5-dimethylizoxazol-4-yl)methyl)-1H-pyrazol-4-yl)-1-(2-(2-methoxyethoxy)-benzyl)imidazolidin-2,4-dion	0,131
10-56	 3-(1-((3,5-dimethylizoxazol-4-yl)methyl)-1H-pyrazol-4-yl)-5-(3-methoxybenzyl)imidazolidin-2,4-dion	0,131
10-20	 3-(1-((3,5-dimethylizoxazol-4-yl)methyl)-1H-pyrazol-4-yl)-1-(2-methylbenzyl)imidazolidin-2,4-dion	0,133
10-87	 1-(3,4-dimethoxyfenethyl)-3-(1-((3,5-dimethylizoxazol-4-yl)methyl)-1H-pyrazol-4-yl)imidazolidin-2,4-dion	0,137
10-78	 3-(1-((3,5-dimethylizoxazol-4-yl)methyl)-1H-pyrazol-4-yl)-1-fenethylimidazolidin-2,4-dion	0,139
10-9	 3-(1-(3-(1-((3,5-dimethylizoxazol-4-yl)methyl)-1H-pyrazol-4-yl)-2,4-dioxoimidazolidin-1-yl)methyl)-N-methylbenzamid	0,141

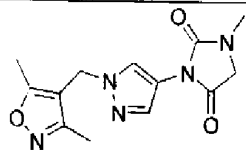
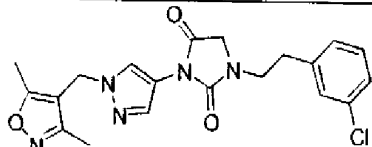
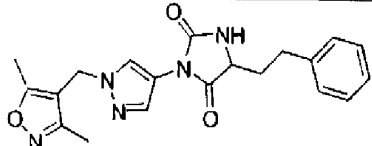
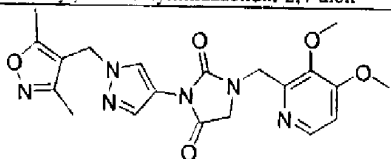
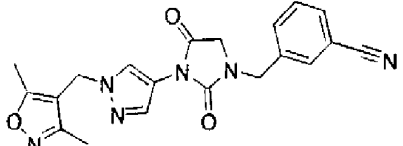
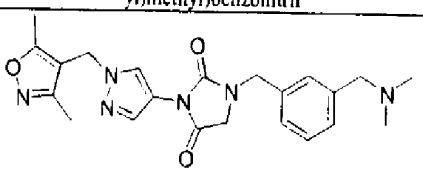
Sloučenina č.	Sloučenina	hT2R8 IC ₅₀ (μM)
10-85	 3-(1-((3,5-dimethylisoxazol-4-yl)methyl)-1H-pyrazol-4-yl)-1-(3-methoxyphenyl)-imidazolidin-2,4-dion	0,158
10-34	 1-(2-aminobenzyl)-3-(1-((3,5-dimethylisoxazol-4-yl)methyl)-1H-pyrazol-4-yl)-imidazolidin-2,4-dion	0,163
10-24	 3-(3-(1-((3,5-dimethylisoxazol-4-yl)methyl)-1H-pyrazol-4-yl)-2,4-dioxoimidazolidin-1-yl)-methylbenzaldehyd	0,201
10-90	 1-(1,3-dimethyl-1H-pyrazol-5-yl)methyl-3-(1-((3,5-dimethylisoxazol-4-yl)methyl)-1H-pyrazol-4-yl)imidazolidin-2,4-dion	0,215
10-22	 3-(1-((3,5-dimethylisoxazol-4-yl)methyl)-1H-pyrazol-4-yl)-1-(2-(trifluoromethyl)benzyl)-imidazolidin-2,4-dion	0,221
10-75	 3-(1-((3,5-dimethylisoxazol-4-yl)methyl)-1H-pyrazol-4-yl)-1-(6-methoxypyridin-2-yl)-methylimidazolidin-2,4-dion	0,229

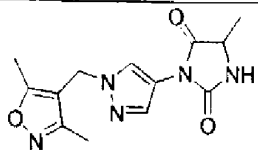
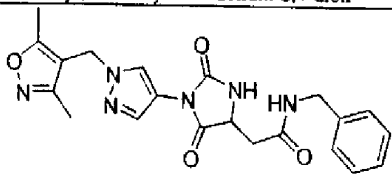
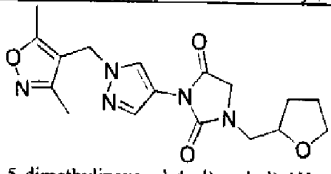
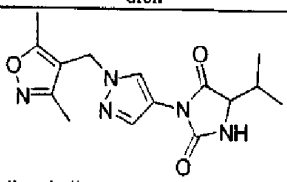
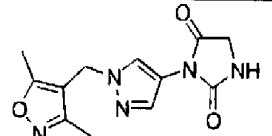
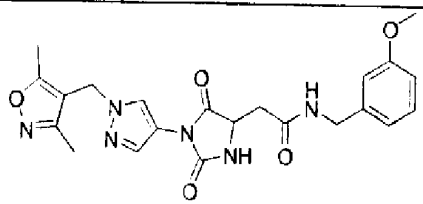
Sloučenina č.	Sloučenina	hT2R8 IC ₅₀ (μM)
10-53	 1-benzyl-3-(1-((3,5-dimethylisoxazol-4-yl)methyl)-1H-pyrazol-4-yl)imidazolidin-2,4-dion	0,257
10-81	 1-(2-chlorofenethyl)-3-(1-((3,5-dimethylisoxazol-4-yl)methyl)-1H-pyrazol-4-yl)imidazolidin-2,4-dion	0,248
10-74	 1-(cyklohexylmethyl)-3-(1-((3,5--dimethylisoxazol-4-yl)methyl)-1H-pyrazol-4-yl)imidazolidin-2,4-dion	0,276
10-58	 5-(cyklopentylmethyl)-3-(1-((3,5--dimethylisoxazol-4-yl)methyl)-1H-pyrazol-4-yl)imidazolidin-2,4-dion	0,316
10-28	 1-((1,5-dimethyl-1H-pyrazol-3-yl)methyl)-3-((1-((3,5-dimethylisoxazol-4-yl)methyl)-1H-pyrazol-4-yl)methyl)-1H-pyrazol-4-yl)imidazolidin-2,4-dion	0,322
10-33	 3-(1-((3,5-dimethylisoxazol-4-yl)methyl)-1H-pyrazol-4-yl)-1-(3-(hydroxymethyl)benzyl)-imidazolidin-2,4-dion	0,322

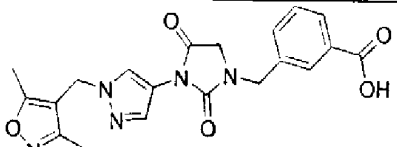
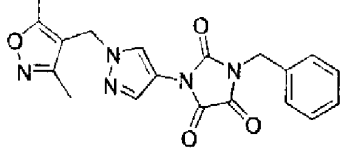
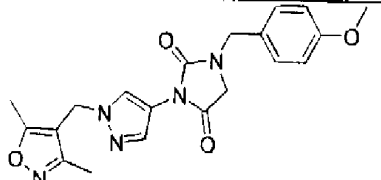
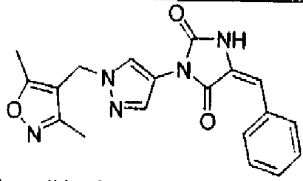
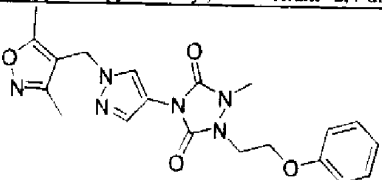
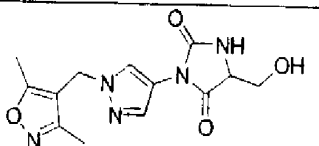
Sloučenina č.	Sloučenina	hT2R8 IC ₅₀ (μM)
10-59	 3-(1-((3,5-dimethylisoxazol-4-yl)methyl)-1H-pyrazol-4-yl)-5-(4-hydroxybenzyl)-imidazolidin-2,4-dione	0,327
10-38	 3-(1-((3,5-dimethylisoxazol-4-yl)methyl)-1H-pyrazol-4-yl)-1-((1-methyl-1H-pyrazol-3-yl)methyl)imidazolidin-2,4-dione	0,363
10-46	 3-(1-((3,5-dimethylisoxazol-4-yl)methyl)-1H-pyrazol-4-yl)-5-(3-phenylpropyl)imidazolidin-2,4-dione	0,484
10-95	 1-benzyl-2-butyl-4-(1-((3,5-dimethylisoxazol-4-yl)methyl)-1H-pyrazol-4-yl)-1,2,4-triazolidin-3,5-dione	0,409
10-17	 3-(1-((3,5-dimethylisoxazol-4-yl)methyl)-1H-pyrazol-4-yl)-1-(2-(methylsulfinyl)benzyl)imidazolidin-2,4-dione	0,412
10-86	 3-(1-((3,5-dimethylisoxazol-4-yl)methyl)-1H-pyrazol-4-yl)-1-(4-hydroxyphenethyl)imidazolidin-2,4-dione	0,412

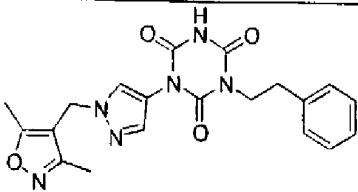
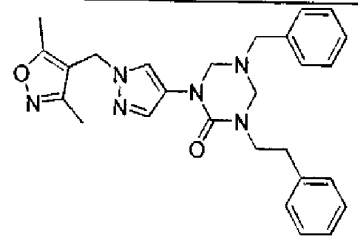
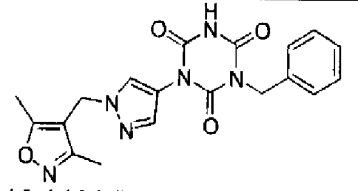
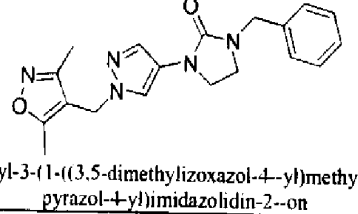
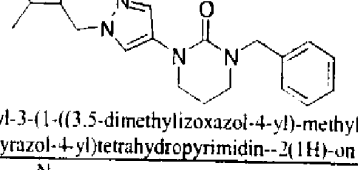
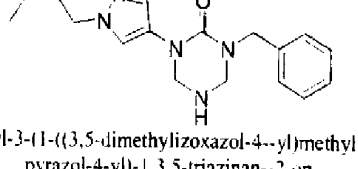
Sloučenina č.	Sloučenina	hT2R8 IC ₅₀ (μM)
10-83	 3-(1-((3,5-dimethylizoxazol-4-yl)methyl)-1H-pyrazol-4-yl)-1-(2-fluorophenyl)imidazolidin-2,4-dion	0,442
10-55	 1-((3,5-dimethylizoxazol-4-yl)methyl)-3-(1-((3,5-dimethylizoxazol-4-yl)methyl)-1H-pyrazol-4-yl)imidazolidin-2,4-dion	0,479
10-60	 5-(3,4-dihydroxybenzyl)-3-(1-((3,5-dimethylizoxazol-4-yl)methyl)-1H-pyrazol-4-yl)imidazolidin-2,4-dion	0,513
10-19	 2-((3-(1-((3,5-dimethylizoxazol-4-yl)methyl)-1H-pyrazol-4-yl)-2,4-dioximidazolidin-1-yl)methyl)benzonitril	0,550
10-54	 3-(1-((3,5-dimethylizoxazol-4-yl)methyl)-1H-pyrazol-4-yl)-1-(pyridin-2-ylmethyl)-imidazolidin-2,4-dion	0,609
10-71	 3-(1-((3,5-dimethylizoxazol-4-yl)methyl)-1H-pyrazol-4-yl)-1-(6-(hydroxymethyl)pyridin-2-yl)methylimidazolidin-2,4-dion	0,721

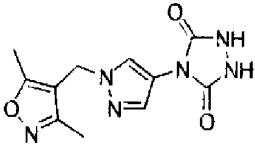
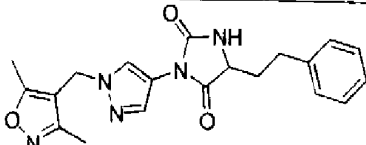
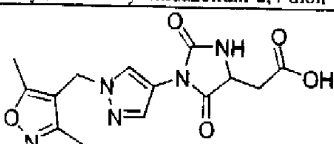
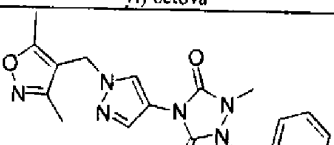
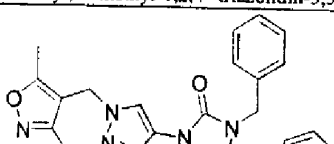
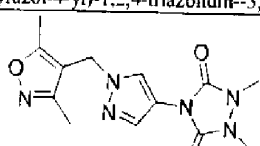
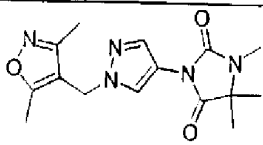
Sloučenina č.	Sloučenina	hT2R8 IC ₅₀ (μM)
10-48	 2-(1-(1-((3,5-dimethylisoxazol-4-yl)methyl)-1H-pyrazol-4-yl)-2,5-dioximidazolidin-4-yl)-N-tenylacetamid	0,747
10-47	 5-(benzyloxymethyl)-3-(1-((3,5-dimethylisoxazol-4-yl)methyl)-1H-pyrazol-4-yl)-imidazolidin-2,4-dion	0,766
10-96	 tert.butyl-(3-(1-((3,5-dimethylisoxazol-4-yl)methyl)-1H-pyrazol-4-yl)-2,4-dioximidazolidin-1-yl)methyl-benzylkarbamát	0,891
10-61	 3-(1-((3,5-dimethylisoxazol-4-yl)methyl)-1H-pyrazol-4-yl)-5-izobutylimidazolidin-2,4-dion	0,912
10-80	 3-(1-((3,5-dimethylisoxazol-4-yl)methyl)-1H-pyrazol-4-yl)-1-(2-(naitalen-1-yl)ethyl)-imidazolidin-2,4-dion	0,927
10-57	 5-(cyklohexylmethyl)-3-(1-((3,5-dimethylisoxazol-4-yl)methyl)-1H-pyrazol-4-yl)imidazolidin-2,4-dion	0,962

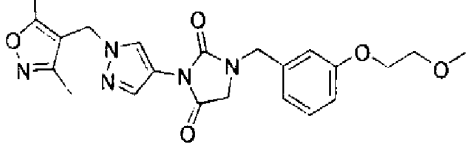
Sloučenina č.	Sloučenina	hT2R8 IC ₅₀ (μM)
10-51	 3-(1-((3,5-dimethylizoxazol-4-yl)methyl)-1H-pyrazol-4-yl)-1-methylimidazolidin-2,4-dione	0,966
10-82	 1-(3-chlorofenethyl)-3-(1-((3,5-dimethylizoxazol-4-yl)methyl)-1H-pyrazol-4-yl)imidazolidin-2,4-dione	0,982
10-45	 3-(1-((3,5-dimethylizoxazol-4-yl)methyl)-1H-pyrazol-4-yl)-5-fenethylimidazolidin-2,4-dione	0,793
10-72	 1-((3,4-dimethoxypyridin-2-yl)methyl)-3-(1-((3,5-dimethylizoxazol-4-yl)methyl)-1H-pyrazol-4-yl)imidazolidin-2,4-dione	0,999
10-25	 3-(1-((3,5-dimethylizoxazol-4-yl)methyl)-1H-pyrazol-4-yl)-2,4-dioxoimidazolidin-1-yl)methyl)benzonitril	1,003
10-37	 1-(3-((dimethylamino)methyl)benzyl)-3-(1-((3,5-dimethylizoxazol-4-yl)methyl)-1H-pyrazol-4-yl)imidazolidin-2,4-dione	1,220

Sloučenina č.	Sloučenina	hT2R8 IC ₅₀ (μM)
10-41	 3-(1-((3,5-dimethylisoxazol-4-yl)methyl)-1H-pyrazol-4-yl)-5-methylimidazolidin-2,4-dione	1,285
10-49	 N-benzyl-2-(1-(1-((3,5-dimethylisoxazol-4-yl)methyl)-1H-pyrazol-4-yl)-2,5-dioxoimidazolidin-4-yl)acetamid	1,329
10-73	 3-(1-((3,5-dimethylisoxazol-4-yl)methyl)-1H-pyrazol-4-yl)-1-((tetrahydrofuran-2-yl)-methyl)imidazolidin-2,4-dion	1,362
10-62	 3-(1-((3,5-dimethylisoxazol-4-yl)methyl)-1H-pyrazol-4-yl)-5-izopropylimidazolidin-2,4-dion	1,440
10-1	 3-(1-((3,5-dimethylisoxazol-4-yl)methyl)-1H-pyrazol-4-yl)imidazolidin-2,4-dion	1,696
10-50	 2-(1-(1-((3,5-dimethylisoxazol-4-yl)methyl)-1H-pyrazol-4-yl)-2,5-dioxoimidazolidin-4-yl)-N-(3-methoxybenzyl)acetamid	1,773

Sloučenina č.	Sloučenina	hT2R8 IC ₅₀ (μM)
10-8	 3-((1-((3,5-dimethylisoxazol-4-yl)methyl)-1H-pyrazol-4-yl)-2,4-dioxoimidazolidin-1-yl)-methyl)benzoová	1,798
9-5	 1-benzyl-3-((1-((3,5-dimethylisoxazol-4-yl)methyl)-1H-pyrazol-4-yl)imidazolidin-2,4,5-trion	2,493
10-29	 3-((1-((3,5-dimethylisoxazol-4-yl)methyl)-1H-pyrazol-4-yl)-1-(4-methoxybenzyl)-imidazolidin-2,4-dion	3,117
10-63	 (E)-5-benzyliden-3-((1-((3,5-dimethylisoxazol-4-yl)methyl)-1H-pyrazol-4-yl)imidazolidin-2,4-dion	
10-67	 4-((1-((3,5-dimethylisoxazol-4-yl)methyl)-1H-pyrazol-4-yl)-1-methyl-2-(2-fenoxylethyl)-1,2,4-triazolidin-3,5-dion	
10-97	 3-((1-((3,5-dimethylisoxazol-4-yl)methyl)-1H-pyrazol-4-yl)-5-(hydroxymethyl)imidazolidin-2,4-dion	

Sloučenina č.	Sloučenina	hT2R8 IC ₅₀ (μM)
9-8	 1-((3,5-dimethylisoxazol-4-yl)methyl)-1H-pyrazol-4-yl)-3-phenethyl-1,3,5-triazinan-2,4,6-trion	6,151
9-7	 5-benzyl-1-((3,5-dimethylisoxazol-4-yl)methyl)-1H-pyrazol-4-yl)-3-phenethyl-1,3,5-triazinan-2-on	6,580
9-9	 1-benzyl-3-((3,5-dimethylisoxazol-4-yl)methyl)-1H-pyrazol-4-yl)-1,3,5-triazinan-2,4,6-trion	1,562
10-88	 1-benzyl-3-((3,5-dimethylisoxazol-4-yl)methyl)-1H-pyrazol-4-yl)imidazolidin-2-on	1,250
9-5	 1-benzyl-3-((3,5-dimethylisoxazol-4-yl)methyl)-1H-pyrazol-4-yl)tetrahydropyrimidin-2(1H)-on	3,434
9-6	 1-benzyl-3-((3,5-dimethylisoxazol-4-yl)methyl)-1H-pyrazol-4-yl)-1,3,5-triazinan-2-on	6,029

Sloučenina č.	Sloučenina	hT2R8 IC ₅₀ (μM)
10-68	 4-(1-((3,5-dimethylisoxazol-4-yl)methyl)-1H-pyrazol-4-yl)-1,2,4-triazolidin-3,5-dion	
10-45	 3-(1-((3,5-dimethylisoxazol-4-yl)methyl)-1H-pyrazol-4-yl)-5-phenethylimidazolidin-2,4-dion	0,793
10-44	 kyselina 2-(1-((3,5-dimethylisoxazol-4-yl)methyl)-1H-pyrazol-4-yl)-2,5-dioximidazolidin-4-yl octová	
10-65	 1-benzyl-4-(1-((3,5-dimethylisoxazol-4-yl)methyl)-1H-pyrazol-4-yl)-2-methyl-1,2,4-triazolidin-3,5-dion	0,019
10-70	 1,2-dibenzyl-4-(1-((3,5-dimethylisoxazol-4-yl)methyl)-1H-pyrazol-4-yl)-1,2,4-triazolidin-3,5-dion	1,799
10-69	 4-(1-((3,5-dimethylisoxazol-4-yl)methyl)-1H-pyrazol-4-yl)-1,2-dimethyl-1,2,4-triazolidin-3,5-dion	0,707
10-52	 3-(1-((3,5-dimethylisoxazol-4-yl)methyl)-1H-pyrazol-4-yl)-1,5,5-trimethylimidazolidin-2,4-dion	0,810

Sloučenina č.	Sloučenina	hT2R8 IC ₅₀ (μM)
10-14	 3-(1-((3,5-dimethylisoxazol-4-yl)methyl)-1H-pyrazol-4-yl)-1-(3-(2-methoxyethoxy)-benzyl)imidazolidin-2,4-dione	0,071

Příklad 11. hT2R8 přispívá k hořkosti sacharinu u lidí s “netasterovými”

(neochutnávajícími) verzemi hT2R43 a hT2R44 genů

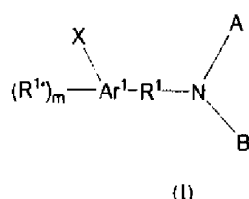
Obr. 6 ukazuje vzájemné vztahy dávkových odpovědí a účinků sacharinu na aktivity receptoru v transfektované buňce exprimující varianty hT2R43, hT2R44 a hT2R8. hT2R8 je méně citlivý na sacharin v *in vitro* zkoušce, než tasterové hT2R43-W35 a hT2R44-W35 alely, ale je citlivější, než netasterové hT2R43-S35 a hT2R44-R35 alely. Pronin a kol., *Curr. Biol.* 17: 1403–8 (2007). Na základě genotypové analýzy se vybralo pět jednotlivců s “tasterovými” alelami (hT2R43-W35 a/nebo hT2R44-W35) a pět s “netasterovými” alelami (hT2R43-S35 a hT2R44-R35). Každému subjektu bylo představeno 6 párů roztoků a měli určit, který ze vzorků v páru je více hořký. Výsledek je ukázán v Tabulce 8 níže, přičemž ukazuje, že hT2R8 blokátor Cpd-D snižuje hořkou chuť sacharinu u lidí s “netasterovými” alelami hT2R43 a hT2R44, ale nemá vliv na lidi s “tasterovými” alelami těchto genů.

Tabulka 8: Výsledky chuťového testu

chuťový test	agonista hořkosti	genotypová skupina	vybraný jako více hořký		P hodnota
			bez	+ Cpd-D	
1	sacharin	hT2R43-W35 a/nebo hT2R44-W35	13	17	0,82
2	sacharin	hT2R43-S35 a hT2R44-R35	27	3	<0,001

[00605] Jiné příklady sloučenin, které jsou poskytnuty podle vynálezu a/nebo vhodné k použití ve způsobech podle stávajícího vynálezu, zahrnují sloučeniny dle následujícího vzorce.

[00606] Podle prvního aspektu je poskytnuta sloučenina dle strukturního vzorce (I):



nebo její sůl, hydrát, solvát nebo N-oxid, kde:

Ar^1 pěti- nebo šestičlenný arylový, heteroarylový nebo cykloalkylový kruh;

m je 0, 1, 2 nebo 3;

R^1 je SO_2 ; $\text{C}=\text{O}$; $\text{C}=\text{S}$; nebo $\text{C}=\text{NOR}^4$;

X je vybrán ze skupiny sestávající z vodíku, halogenu, alkylu, substituovaného alkylu, arylu, substituovaného arylu, arylalkylu, substituovaného arylalkylu, acylu, substituovaného acylu, heteroalkylu, substituovaného heteroalkylu, heteroarylu, substituovaného heteroarylu, heteroarylalkylu, substituovaného heteroarylalkylu, CN , NO_2 , OR^6 , $\text{S}(\text{O})_b\text{R}^6$, NR^6R^7 , CONR^6R^7 , CO_2R^6 , $\text{NR}^6\text{CO}_2\text{R}^7$, $\text{NR}^6\text{CONR}^7\text{R}^8$, $\text{NR}^6\text{CSNR}^7\text{R}^8$, $\text{NR}^6\text{C}(=\text{NH})\text{NR}^7\text{R}^8$, $\text{SO}_2\text{NR}^5\text{R}^6$, $\text{NR}^5\text{SO}_2\text{R}^6$, $\text{NR}^5\text{SO}_2\text{NR}^6\text{R}^7$, $\text{B}(\text{OR}^5)(\text{OR}^6)$, $\text{P}(\text{O})(\text{OR}^5)(\text{OR}^6)$ a $\text{P}(\text{O})(\text{R}^5)(\text{OR}^6)$;

každý R^1 je nezávisle vybrán ze skupiny sestávající z vodíku, halogenu, alkylu, substituovaného alkylu, arylu, substituovaného arylu, arylalkylu, substituovaného arylalkylu, acylu, substituovaného acylu, heteroalkylu, substituovaného heteroalkylu, heteroarylu, substituovaného heteroarylu, heteroarylalkylu, substituovaného heteroarylalkylu, CN , NO_2 , OR^6 , $\text{S}(\text{O})_b\text{R}^6$, NR^6R^7 , CONR^6R^7 , CO_2R^6 , $\text{NR}^6\text{CO}_2\text{R}^7$, $\text{NR}^6\text{CONR}^7\text{R}^8$, $\text{NR}^6\text{CSNR}^7\text{R}^8$, $\text{NR}^6\text{C}(=\text{NH})\text{NR}^7\text{R}^8$, $\text{SO}_2\text{NR}^5\text{R}^6$, $\text{NR}^5\text{SO}_2\text{R}^6$, $\text{NR}^5\text{SO}_2\text{NR}^6\text{R}^7$, $\text{B}(\text{OR}^5)(\text{OR}^6)$, $\text{P}(\text{O})(\text{OR}^5)(\text{OR}^6)$ a $\text{P}(\text{O})(\text{R}^5)(\text{OR}^6)$;

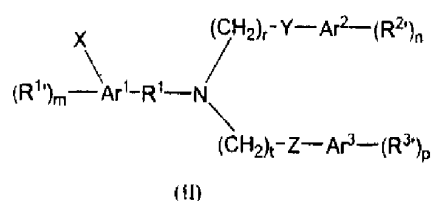
nebo případně X a/nebo alespoň jeden R^1 spolu s atomy, ke kterým jsou připojeny, tvoří aryl, substituovaný aryl, heteroaryl, substituovaný heteroaryl, cykloalkyl, substituovaný cykloalkyl, cykloheteroalkylu nebo substituovaný cykloheteroalkylový kruh, kde kruh je případně kondenzovaný s jiným arylem, substituovaným arylem, heteroarylem, substituovaným heteroarylem, cykloalkylem, substituovaným cykloalkylem, cykloheteroalkylem nebo substituovaným cykloheteroalkylovým kruhem;

R^4 - R^8 jsou nezávisle vybrány ze skupiny sestávající z vodíku, alkylu, substituovaného alkylu, arylu, substituovaného arylu, arylalkylu, substituovaného arylalkylu, heteroalkylu, substituovaného heteroalkylu, heteroarylu, substituovaného heteroarylu, heteroarylalkylu a substituovaného heteroarylalkylu nebo případně R^5 a R^6 , R^6 a R^7 , R^7 a R^8 , spolu s atomy, ke kterým jsou připojeny, tvoří cykloheteroalkylový nebo substituovaný cykloheteroalkylový kruh;

A a B jsou nezávisle vybrány ze skupiny sestávající z vodíku, alkylu, substituovaného alkylu, arylu, substituovaného arylu, arylalkylu, substituovaného arylalkylu, acylu, substituovaného acylu, heteroalkylu, substituovaného heteroalkylu, heteroarylu, substituovaného heteroarylu, heteroarylalkylu, substituovaného heteroarylalkylu; a

b je 0, 1, nebo 2;

[00607] Podle druhého aspektu je poskytnuta sloučenina dle strukturního vzorce (II) znázorněného níže:



nebo její sůl, hydrát, solvát nebo N-oxid, kde:

Ar^1 , Ar^2 a Ar^3 jsou nezávisle pěti- nebo šestičlenné arylové, heteroarylové nebo cykloalkylové kruhy;

m je 0, 1, 2 nebo 3;

n a p jsou nezávisle 0, 1, 2, 3 nebo 4;

r a t jsou nezávisle 0, 1 nebo 2;

Y a Z jsou nezávisle vybrány ze skupiny sestávající z CR^6R^7 , $\text{C}=\text{O}$, $\text{C}=\text{S}$, $\text{C}=\text{NOR}^6$, O , NR^6 a $\text{S}(\text{O})_b$;

R^1 je vybrán ze skupiny sestávající z SO_2 , $\text{C}=\text{O}$, $\text{C}=\text{S}$ a $\text{C}=\text{NOR}^1$;

X může být vybrán ze skupiny sestávající z vodíku, alkylu, substituovaného alkylu, arylu, substituovaného arylu, arylalkylu, substituovaného arylalkylu, acylu, substituovaného acylu, heteroalkylu, substituovaného heteroalkylu, heteroarylu, substituovaného heteroarylu, heteroarylalkylu, substituovaného heteroarylalkylu, CN, NO₂, -OR⁶, S(O)₆R⁶, NR⁶R⁷, CONR⁶R⁷, CO₂R⁶, NR⁶CO₂R⁷, NR⁶CONR⁷R⁸, NR⁶CSNR⁷R⁸, NR⁶C(=NH)NR⁷R⁸, SO₂NR⁵R⁶, NR⁵SO₂R⁶, NR⁵SO₂NR⁶R⁷, B(OR⁵)(OR⁶), P(O)(OR⁵)(OR⁶) a P(O)(R⁵)(OR⁶);

X je s výhodou vybrán ze skupiny sestávající z vodíku, heteroalkylu, substituovaného heteroalkylu, heteroarylu, substituovaného heteroarylu, heteroarylalkylu, substituovaného heteroarylalkylu, CN, S(O)₆R⁶, CONR⁶R⁷, -CO₂R⁶, SO₂NR⁵R⁶, NR⁵SO₂R⁶, NR⁵SO₂NR⁶R⁷, B(OR⁵)(OR⁶), P(O)(OR⁵)(OR⁶) a P(O)(R⁵)(OR⁶).

každý R^{1a} je nezávisle vybrán ze skupiny sestávající z vodíku, halogenu, alkylu, substituovaného alkylu, arylu, substituovaného arylu, arylalkylu, substituovaného arylalkylu, acylu, substituovaného acylu, heteroalkylu, substituovaného heteroalkylu, heteroarylu, substituovaného heteroarylu, heteroarylalkylu, substituovaného heteroarylalkylu, CN, NO₂, OR⁶, S(O)₆R⁶, NR⁶R⁷, CONR⁶R⁷, CO₂R⁶, NR⁶CO₂R⁷, NR⁶CONR⁷R⁸, NR⁶CSNR⁷R⁸, NR⁶C(=NH)NR⁷R⁸, SO₂NR⁵R⁶, NR⁵SO₂R⁶, NR⁵SO₂NR⁶R⁷, B(OR⁵)(OR⁶), P(O)(OR⁵)(OR⁶) a P(O)(R⁵)(OR⁶);

každý R^{2a} je nezávisle vybrán ze skupiny sestávající z vodíku, halogenu, alkylu, substituovaného alkylu, arylu, substituovaného arylu, arylalkylu, substituovaného arylalkylu, acylu, substituovaného acylu, heteroalkylu, substituovaného heteroalkylu, heteroarylu, substituovaného heteroarylu, heteroarylalkylu, substituovaného heteroarylalkylu, CN, NO₂, OR⁶, S(O)₆R⁶, NR⁶R⁷, CONR⁶R⁷, CO₂R⁶, NR⁶CO₂R⁷, NR⁶CONR⁷R⁸, NR⁶CSNR⁷R⁸, NR⁶C(=NH)NR⁷R⁸, SO₂NR⁵R⁶, NR⁵SO₂R⁶, NR⁵SO₂NR⁶R⁷, B(OR⁵)(OR⁶) a P(O)(OR⁵)(OR⁶);

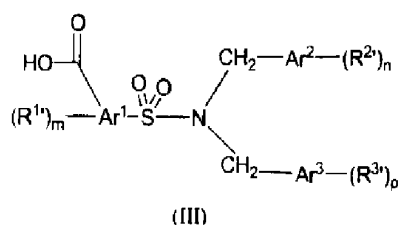
každý R^{3a} je nezávisle vybrán ze skupiny sestávající z vodíku, halogenu, alkylu, substituovaného alkylu, arylu, substituovaného arylu, arylalkylu, substituovaného arylalkylu, acylu, substituovaného acylu, heteroalkylu, substituovaného heteroalkylu, heteroarylu, substituovaného heteroarylu, heteroarylalkylu, substituovaného heteroarylalkylu, CN, NO₂, OR⁶, S(O)₆R⁶, NR⁶R⁷, CONR⁶R⁷, CO₂R⁶, NR⁶CO₂R⁷, NR⁶CONR⁷R⁸, NR⁶CSNR⁷R⁸, NR⁶C(=NH)NR⁷R⁸, SO₂NR⁵R⁶, NR⁵SO₂R⁶, NR⁵SO₂NR⁶R⁷, B(OR⁵)(OR⁶), P(O)(OR⁵)(OR⁶) a P(O)(R⁵)(OR⁶);

nebo případně X a/nebo alespoň jeden R^{11} spolu s atomy, ke kterým jsou připojeny, tvoří aryl, substituovaný aryl, heteroaryl, substituovaný heteroaryl, cykloalkyl, substituovaný cykloalkyl, cykloheteroalkyl nebo substituovaný cykloheteroalkylový kruh, kde kruh je případně kondenzovaný s jiným arylem, substituovaným arylem, heteroarylem, substituovaným heteroarylem, cykloalkylem, substituovaným cykloalkylem, cykloheteroalkylem nebo substituovaným cykloheteroalkylovým kruhem;

R^4 - R^8 jsou nezávisle vodík, alkyl, substituovaný alkyl, aryl, substituovaný aryl, arylalkyl, substituovaný arylalkyl, heteroalkyl, substituovaný heteroalkyl, heteroaryl, substituovaný heteroaryl, heteroarylalkyl nebo substituovaný heteroarylalkyl nebo případně R^5 a R^6 , R^6 a R^7 , R^7 a R^8 , spolu s atomy, ke kterým jsou připojeny, tvoří cykloheteroalkylový nebo substituovaný cykloheteroalkylový kruh;

b je 0, 1, nebo 2.

[00608] Podle jiného aspektu vynález poskytuje sloučeniny mající strukturní vzorec (III) znázorněný níže:



nebo její sůl, hydrát, solvát nebo N-oxid, kde:

Ar^1 , Ar^2 a Ar^3 jsou nezávisle pěti- nebo šestičlenný aryl, heteroaryl nebo cykloalkylový kruh a Ar^2 a Ar^3 mohou být případně vynechány;

m je 0, 1, 2 nebo 3;

n a p jsou nezávisle 0, 1, 2, 3 nebo 4;

každý R^{11} je nezávisle vybrán ze skupiny sestávající z vodíku, halogenu, alkylu, substituovaného alkylu, arylu, substituovaného arylu, arylalkylu, substituovaného arylalkylu, acylu, substituovaného acylu, heteroalkylu, substituovaného heteroalkylu, heteroarylu,

substituovaného heteroarylu, heteroarylalkylu, substituovaného heteroarylalkylu, CN, NO₂, OR⁶, S(O)_bR⁶, NR⁶R⁷, CONR⁶R⁷, CO₂R⁶, NR⁶CO₂R⁷, NR⁶CONR⁷R⁸, NR⁶CSNR⁷R⁸, NR⁶C(=NH)NR⁷R⁸, SO₂NR⁵R⁶, NR⁵SO₂R⁶, NR⁵SO₂NR⁶R⁷, B(OR⁵)(OR⁶), P(O)(OR⁵)(OR⁶) a P(O)(R⁵)(OR⁶);

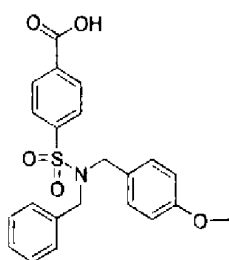
každý R²ⁱ je nezávisle vybrán ze skupiny sestávající z vodíku, halogenu, alkylu, substituovaného alkylu, arylu, substituovaného arylu, arylalkylu, substituovaného arylalkylu, acylu, substituovaného acylu, heteroalkylu, substituovaného heteroalkylu, heteroarylu, substituovaného heteroarylu, heteroarylalkylu, substituovaného heteroarylalkylu, CN, NO₂, OR⁶, S(O)_bR⁶, NR⁶R⁷, CONR⁶R⁷, CO₂R⁶, NR⁶CO₂R⁷, NR⁶CONR⁷R⁸, NR⁶CSNR⁷R⁸, NR⁶C(=NH)NR⁷R⁸, SO₂NR⁵R⁶, NR⁵SO₂R⁶, NR⁵SO₂NR⁶R⁷, B(OR⁵)(OR⁶), P(O)(OR⁵)(OR⁶) a P(O)(R⁵)(OR⁶);

každý R³ⁱ je nezávisle vybrán ze skupiny sestávající z vodíku, halogenu, alkylu, substituovaného alkylu, arylu, substituovaného arylu, arylalkylu, substituovaného arylalkylu, acylu, substituovaného acylu, heteroalkylu, substituovaného heteroalkylu, heteroarylu, substituovaného heteroarylu, heteroarylalkylu, substituovaného heteroarylalkylu, CN, NO₂, OR⁶, S(O)_bR⁶, NR⁶R⁷, CONR⁶R⁷, CO₂R⁶, NR⁶CO₂R⁷, NR⁶CONR⁷R⁸, NR⁶CSNR⁷R⁸, NR⁶C(=NH)NR⁷R⁸, SO₂NR⁵R⁶, NR⁵SO₂R⁶, NR⁵SO₂NR⁶R⁷, B(OR⁵)(OR⁶), P(O)(OR⁵)(OR⁶) a P(O)(R⁵)(OR⁶);

R⁵R⁸ jsou nezávisle vodík, alkyl, substituovaný alkyl, aryl, substituovaný aryl, arylalkyl, substituovaný arylalkyl, heteroalkyl, substituovaný heteroalkyl, heteroaryl, substituovaný heteroaryl, heteroarylalkyl nebo substituovaný heteroarylalkyl nebo případně R⁵ a R⁶, R⁶ a R⁷, R⁷ a R⁸, spolu s atomy, ke kterým jsou připojeny, tvoří cykloheteroalkylový nebo substituovaný cykloheteroalkylový kruh;

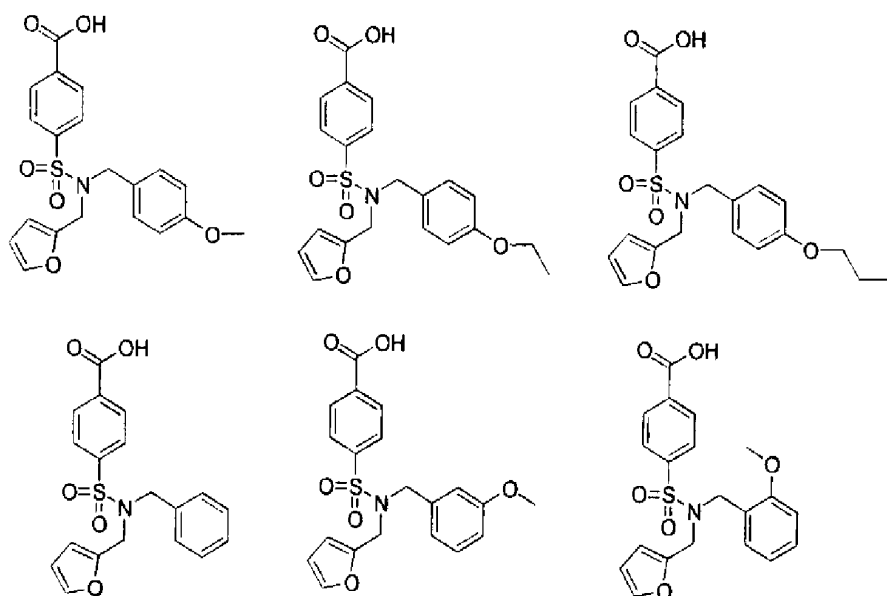
b je 0, 1, nebo 2.

[00609] Podle ještě dalšího aspektu vynález poskytuje sloučeninu mající strukturu:



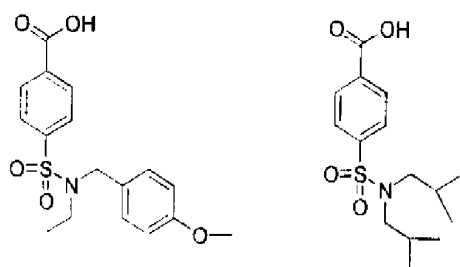
nebo její sůl, hydrát, solvát nebo N-oxid.

[00610] Podle ještě dalšího aspektu vynález poskytuje sloučeninu mající strukturu:



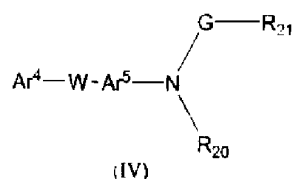
nebo její sůl, hydrát, solvát nebo N-oxid.

[00611] Podle ještě jiných provedení vynález poskytuje sloučeniny mající strukturu:



nebo jejich sůl, hydrát, solvát nebo N-oxid.

[00612] Podle souvisejícího aspektu je poskytnuta sloučenina dle vzorce (IV):



nebo její sůl, hydrát, solvát nebo N-oxid, kde:

Ar^4 a Ar^5 jsou nezávisle pěti- nebo šestičlenný arylu nebo heteroarylový kruh;

W je vybrán ze skupiny sestávající z CR^6R^7 , $\text{C}=\text{O}$, $\text{C}=\text{S}$, $\text{C}=\text{NOR}^6$, O, NR^6 , S, SO , SO_2 a $(\text{CH}_2)_n$;

n je 0, 1, 2, nebo 3;

G je vybrán ze skupiny sestávající z CR^6R^7 , $\text{C}=\text{O}$, $\text{C}=\text{S}$, $\text{C}=\text{NOR}^6$ a $\text{S}(\text{O})_b$;

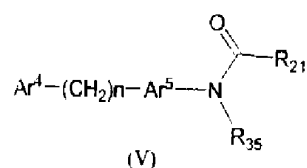
R^{20} je vybrán ze skupiny sestávající z vodíku, arylalkenylu, heteroarylalkenylu, arylalkylu, heteroarylalkylu, arylu, heteroarylu, alkylu, alkoxy-alkylu, alkenylu, cykloalkylu, cykloalkenylu a substituovaných derivátů;

R^{21} je vybrán ze skupiny sestávající z arylalkenylu, heteroarylalkenylu, arylalkylu, heteroarylalkylu, arylu, heteroarylu, alkylu, alkoxy-alkylu, alkenylu, cykloalkylu, cykloalkenylu a substituovaných derivátů;

R^6 a R^7 jsou nezávisle vybrány ze skupiny sestávající z vodíku, alkylu, substituovaného alkylu, arylu, substituovaného arylu, arylalkylu, substituovaného arylalkylu, heteroalkylu, substituovaného heteroalkylu, heteroarylu, substituovaného heteroarylu, heteroarylalkylu nebo substituovaného heteroarylalkylu nebo alternativně R^6 a R^7 , spolu s atomy, ke kterým jsou připojeny, tvoří cykloheteroalkylový nebo substituovaný cykloheteroalkylový kruh; a

b je 0, 1, nebo 2.

[00613] Podle jiného aspektu je poskytnuta sloučenina dle strukturního vzorce (V):



nebo její sůl, hydrát, solvát nebo N-oxid, kde:

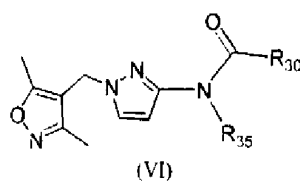
Ar^4 a Ar^5 jsou nezávisle pěti- nebo šestičlenný arylu nebo heteroarylový kruh;

n je 0, 1, 2, nebo 3;

R^{21} je vybrán ze skupiny sestávající z arylalkenylu, heteroarylalkenylu, arylalkylu, heteroarylalkylu, arylu, heteroarylu, alkylu, alkoxy-alkylu, alkenylu, cykloalkylu, cykloalkenylu a substituovaných derivátů;

R^{35} je vybrán ze skupiny sestávající z vodíku, alkylu a substituovaného alkylu.

[00614] Podle ještě dalších provedení vynález poskytuje sloučeninu dle strukturního vzorce (VI)

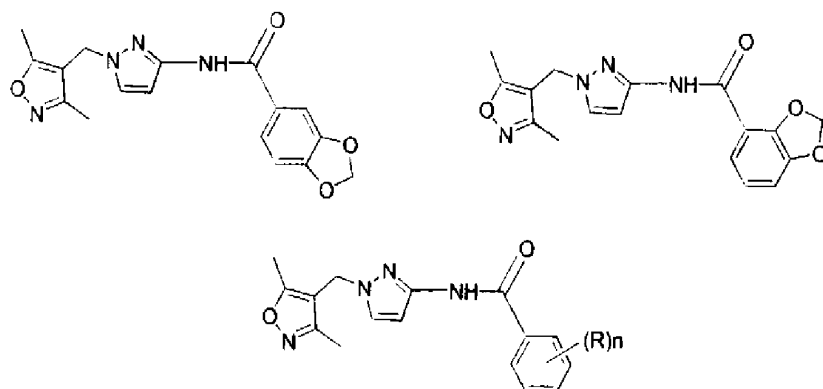


nebo jejich sůl, hydrát, solvát nebo N-oxid, kde

R^{30} je vybrán ze skupiny sestávající z arylalkenylu, heteroarylalkenylu, arylalkylu, heteroarylalkylu, arylu, heteroarylu, alkylu, alkoxy-alkylu, alkenylu, cykloalkylu, cykloalkenylu a substituovaných derivátů;

R^{35} je vybrán ze skupiny sestávající z vodíku, alkylu a substituovaného alkylu.

[00615] Podle ještě dalších provedení vynález poskytuje sloučeniny mající strukturu:

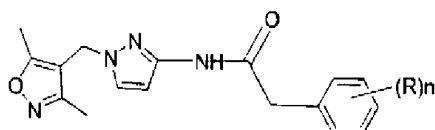


nebo jejich sůl, solvát nebo N-oxid,

kde každý R je nezávisle Cl, MeO, CN, EtO, OH, Me, $-\text{SO}_2\text{Me}$, F, nebo H a

n je 0, 1, 2, 3 nebo 4.

[00616] Podle ještě dalších provedení vynález poskytuje sloučeniny mající strukturu:

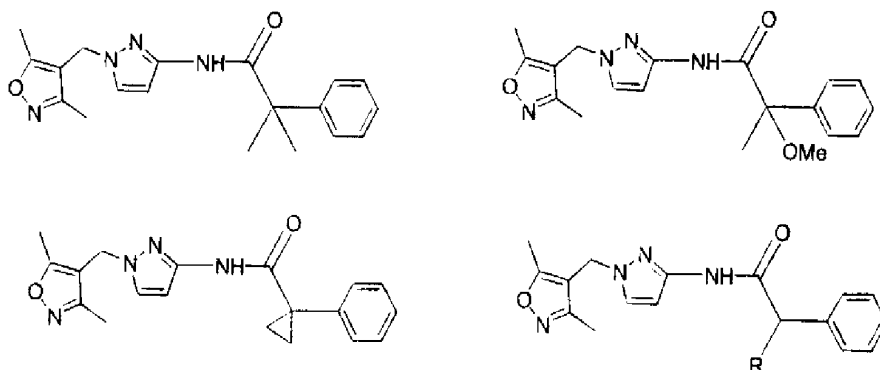


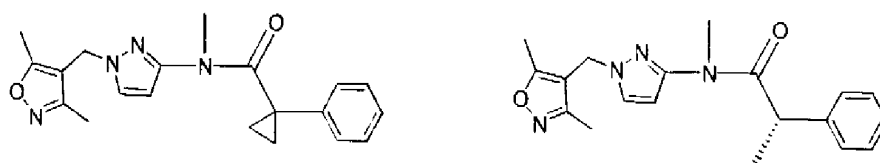
nebo jejich sůl, solvát nebo N-oxid,

kde každý R je nezávisle MeO nebo OH, a

n je 0, 1, 2, 3 nebo 4.

[00617] Podle ještě dalších provedení vynález poskytuje sloučeniny mající strukturu:

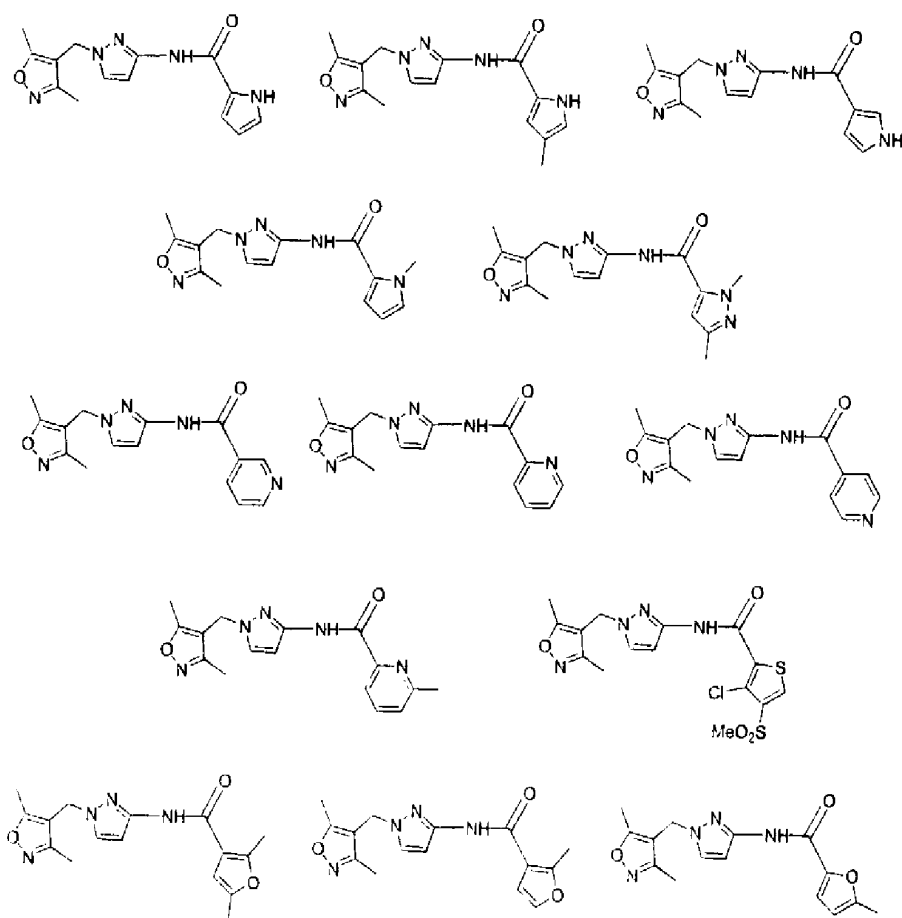




nebo jejich sůl, solvát nebo N-oxid,

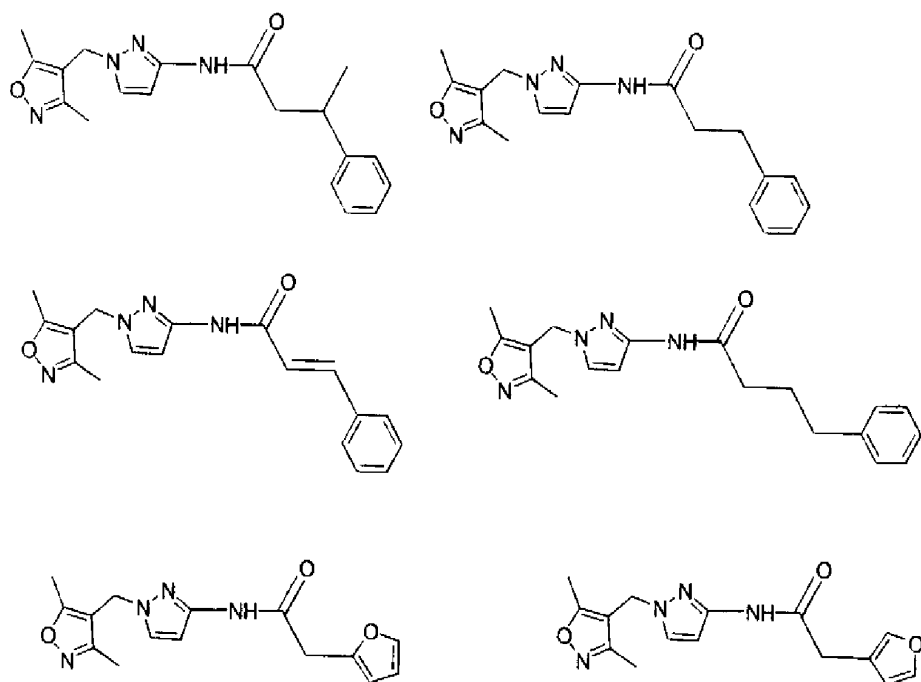
kde R je H, Me, Et, OCOMe, CH₂OH, OMe nebo Ph.

[00618] Podle ještě dalších provedení vynález poskytuje sloučeniny mající strukturu:



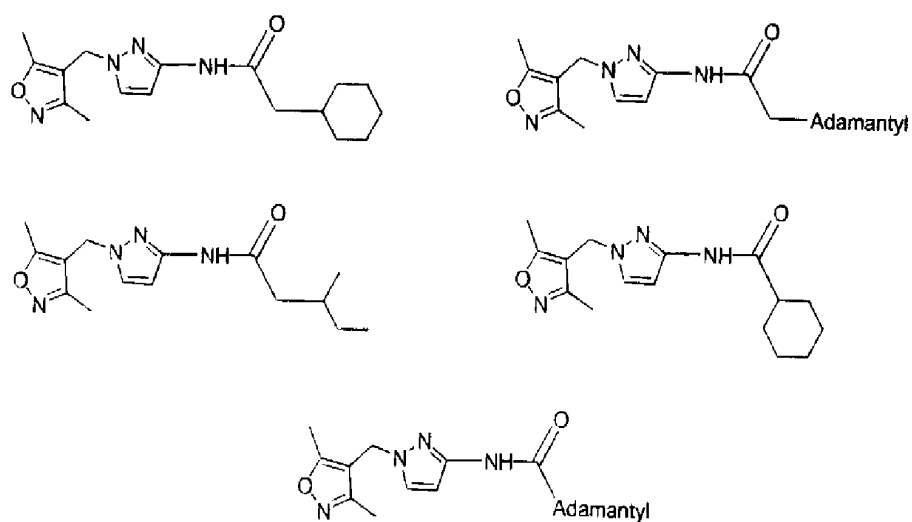
nebo jejich sůl, solvát nebo N-oxid.

[00619] Podle ještě dalších provedení vynález poskytuje sloučeniny mající strukturu:



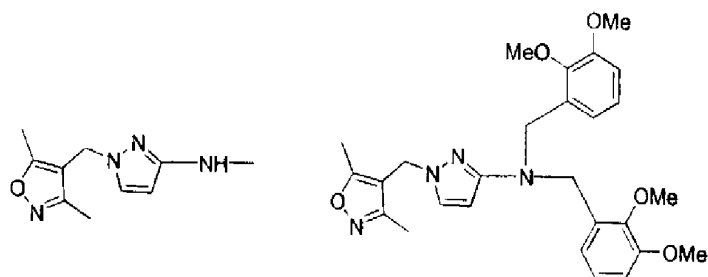
nebo jejich sůl, solvát nebo N-oxid.

[00620] Podle ještě dalších provedení vynález poskytuje sloučeniny mající strukturu:

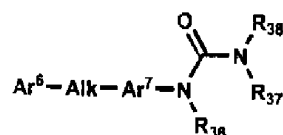


nebo jejich sůl, solvát nebo N-oxid.

[00621] V ještě dalších provedeních vynález poskytuje sloučeniny mající strukturu:



[00622] V jednom aspektu vynález poskytuje sloučeninu dle vzorce:



nebo jejich sůl, solvát, N-oxid nebo prolečivo,

kde Ar^6 a Ar^7 jsou stejné nebo na sobě vzájemně nezávislé a pěti- nebo šestičlenná skupina nebo pěti- nebo šestičlenná heteroarylová skupina;

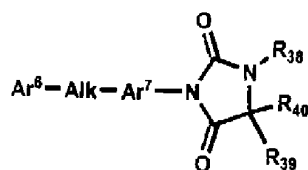
alk je alkylová skupina, případně přerušená heteroatomem;

R_{36} a R_{37} jsou stejné nebo na sobě vzájemně nezávislé, H, alkyl, nebo, R_{36} a R_{37} , spolu s atomy, ke kterým jsou připojeny, tvoří případně substituovaný pěti- nebo šestičlenný heterocyklus; a

R_{38} je H, substituovaný nebo nesubstituovaný alkyl, substituovaný nebo nesubstituovaný cykloalkylalkyl, substituovaný nebo nesubstituovaný heterocykloalkylalkyl, substituovaný nebo nesubstituovaný aryl, substituovaný nebo nesubstituovaný arylamidoalkyl, substituovaný nebo nesubstituovaný heteroarylamidoalkyl, substituovaný nebo nesubstituovaný arylalkyl, substituovaný nebo nesubstituovaný arylalkoxy, substituovaný nebo nesubstituovaný heteroaryl, substituovaný nebo nesubstituovaný heteroarylalkyl, nebo halogenalkyl.

[00623] Podle jednoho aspektu sloučeniny podle vynálezu obsahují pětičlenný heterocyklus. V jednom provedení je pětičlenným heterocyklem hydantoin nebo substituovaná nebo nesubstituovaná cyklická močovina.

[00624] Podle jednoho provedení je hydantoinem hydantoin dle vzorce:



nebo jeho sůl, hydrát, solvát, N-oxid nebo prolečivo,

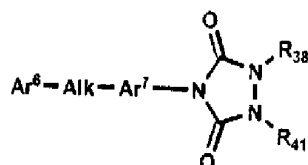
kde Ar^6 a Ar^7 jsou stejné nebo různé vzájemně na sobě nezávislé pěti- nebo šestičlenné arylové skupiny nebo pěti- nebo šestičlenná heteroarylová skupina;

Alk je alkylová skupina, případně přerušená heteroatomem;

R_{38} je H, substituovaný nebo nesubstituovaný alkyl, substituovaný nebo nesubstituovaný cykloalkylalkyl, substituovaný nebo nesubstituovaný heterocykloalkylalkyl, substituovaný nebo nesubstituovaný aryl, substituovaný nebo nesubstituovaný arylamidoalkyl, substituovaný nebo nesubstituovaný heteroarylamidoalkyl, substituovaný nebo nesubstituovaný arylalkyl, substituovaný nebo nesubstituovaný arylalkoxy, substituovaný nebo nesubstituovaný heteroaryl, substituovaný nebo nesubstituovaný heteroarylalkyl, nebo halogenalkyl; a

R_{39} a R_{40} jsou stejné nebo různé vzájemně na sobě nezávislé H, substituovaný nebo nesubstituovaný alkyl, substituovaný nebo nesubstituovaný cykloalkylalkyl, substituovaný nebo nesubstituovaný heterocykloalkylalkyl, substituovaný nebo nesubstituovaný aryl, substituovaný nebo nesubstituovaný arylamidoalkyl, substituovaný nebo nesubstituovaný arylalkylamidoalkyl, substituovaný nebo nesubstituovaný heteroarylamidoalkyl, substituovaný nebo nesubstituovaný heteroarylalkylamidoalkyl, substituovaný nebo nesubstituovaný arylalkyl, substituovaný nebo nesubstituovaný arylalkoxy, substituovaný nebo nesubstituovaný heteroaryl, substituovaný nebo nesubstituovaný heteroarylalkyl, halogenalkyl, nebo R_{39} a R_{40} spolu s uhlíkovým atomem, ke kterému jsou připojeny, tvoří C=O skupinu nebo substituovanou nebo nesubstituovanou alkenylovou skupinu.

[00625] Podle jiného aspektu sloučeniny podle vynálezu obsahují pětičlenný heterocyklus, kterým je urazol. V jednom provedení je urazolem urazol dle vzorce:



nebo jeho sůl, hydrát, solvát, N-oxid nebo prolečivo,

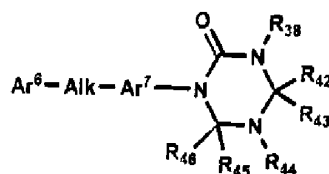
kde Ar^6 a Ar^7 jsou stejné nebo různé vzájemně na sobě nezávislé pěti- nebo šestičlenná arylová skupina nebo pěti- nebo šestičlenná heteroarylová skupina;

Alk je alkylová skupina, případně přerušená heteroatomem;

R_{38} je H, substituovaný nebo nesubstituovaný alkyl, substituovaný nebo nesubstituovaný cykloalkylalkyl, substituovaný nebo nesubstituovaný heterocykloalkylalkyl, substituovaný nebo nesubstituovaný aryl, substituovaný nebo nesubstituovaný arylamidoalkyl, substituovaný nebo nesubstituovaný heteroarylamidoalkyl, substituovaný nebo nesubstituovaný arylalkyl, substituovaný nebo nesubstituovaný arylalkoxy, substituovaný nebo nesubstituovaný heteroaryl, substituovaný nebo nesubstituovaný heteroarylalkyl, nebo halogenalkyl; a

R_{41} je H, substituovaný nebo nesubstituovaný alkyl, substituovaný nebo nesubstituovaný cykloalkylalkyl, substituovaný nebo nesubstituovaný heterocykloalkylalkyl, substituovaný nebo nesubstituovaný aryl, substituovaný nebo nesubstituovaný arylamidoalkyl, substituovaný nebo nesubstituovaný arylalkylamidoalkyl, substituovaný nebo nesubstituovaný heteroarylamidoalkyl, substituovaný nebo nesubstituovaný heteroarylalkylamidoalkyl, substituovaný nebo nesubstituovaný arylalkyl, substituovaný nebo nesubstituovaný arylalkoxy, substituovaný nebo nesubstituovaný heteroaryl, substituovaný nebo nesubstituovaný heteroarylalkyl nebo halogenalkyl.

[00626] Podle jiného aspektu sloučeniny podle vynálezu obsahují šestičlenný heterocyklus. V jednom provedení je šestičlenným heterocyklem šestičlenný heterocyklus dle vzorce:

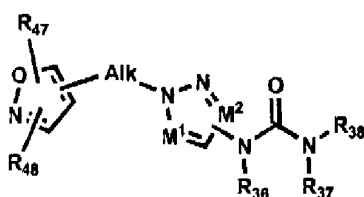


nebo jeho sůl, hydrát, solvát, N-oxide nebo prolečivo,

kde R_{38} je H, substituovaný nebo nesubstituovaný alkyl, substituovaný nebo nesubstituovaný cykloalkylalkyl, substituovaný nebo nesubstituovaný heterocykloalkylalkyl, substituovaný nebo nesubstituovaný aryl, substituovaný nebo nesubstituovaný arylamidoalkyl, substituovaný nebo nesubstituovaný heteroarylamidoalkyl, substituovaný nebo nesubstituovaný arylalkyl, substituovaný nebo nesubstituovaný arylalkoxy, substituovaný nebo nesubstituovaný heteroaryl, substituovaný nebo nesubstituovaný heteroarylalkyl, nebo halogenalkyl; a

R_{42} , R_{43} , R_{44} , R_{45} a R_{46} jsou stejné nebo různé vzájemně na sobě nezávislé H, substituovaný nebo nesubstituovaný alkyl, substituovaný nebo nesubstituovaný cykloalkylalkyl, substituovaný nebo nesubstituovaný arylalkyl, substituovaný nebo nesubstituovaný arylalkoxy, substituovaný nebo nesubstituovaný heteroaryl, substituovaný nebo nesubstituovaný heteroarylalkyl, nebo R_{42} a R_{43} , nebo R_{45} a R_{46} , spolu s uhlíkovými atomy, ke kterým je každý připojen, tvoří C=O skupinu.

[00627] Podle ještě jiného aspektu se vynález týká sloučeniny dle vzorce:



nebo její soli, hydrátu, solvátu, N-oxidu nebo proléčiva,

kde Alk je alkylová skupina, případně přerušená heteroatomem;

M^1 je N nebo CR_{49} , kde R_{49} je H nebo substituovaný nebo nesubstituovaný alkyl;

M^2 je N nebo CR_{50} , kde R_{50} je H nebo substituovaný nebo nesubstituovaný alkyl;

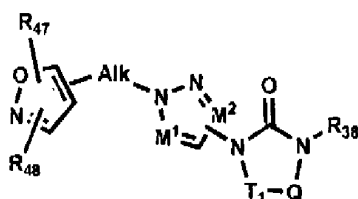
R_{36} a R_{37} jsou stejné nebo různé vzájemně na sobě nezávislé H, alkylu nebo R_{36} a R_{37} , spolu s atomy, ke kterým jsou připojeny, tvoří případně substituovaný pěti- nebo šestičlenný heterocyklus; a

R_{38} je H, substituovaný nebo nesubstituovaný alkyl, substituovaný nebo nesubstituovaný cykloalkylalkyl, substituovaný nebo nesubstituovaný heterocykloalkylalkyl, substituovaný nebo nesubstituovaný aryl, substituovaný nebo nesubstituovaný arylamidoalkyl, substituovaný nebo nesubstituovaný heteroarylamidoalkyl, substituovaný nebo nesubstituovaný arylalkyl, substituovaný nebo nesubstituovaný arylalkoxy, substituovaný nebo nesubstituovaný heteroaryl, substituovaný nebo nesubstituovaný heteroarylalkyl, nebo halogenalkyl;

R_{47} je H, substituovaný nebo nesubstituovaný alkyl, substituovaný nebo nesubstituovaný alkoxy, substituovaný nebo nesubstituovaný aryl, substituovaný nebo nesubstituovaný arylalkyl, nebo halogen; a

R_{48} je H, substituovaný nebo nesubstituovaný alkyl, substituovaný nebo nesubstituovaný alkoxy, substituovaný nebo nesubstituovaný aryl, substituovaný nebo nesubstituovaný arylalkyl nebo halogen.

[00628] Podle ještě jiného aspektu se vynález týká sloučeniny dle vzorce:



nebo její soli, hydrátu, solvátu, N-oxidu nebo proléčiva,

kde Alk je alkylová skupina případně přerušená heteroatomem;

T_1 je $C=O$ a Q je $CR_{51}R_{52}$ nebo NR_{51} , kde R_{51} a R_{52} jsou stejné nebo různé vzájemně na sobě nezávislé H, substituovaný nebo nesubstituovaný alkyl, substituovaný nebo nesubstituovaný cykloalkylalkyl, substituovaný nebo nesubstituovaný heterocykloalkylalkyl, substituovaný nebo nesubstituovaný aryl, substituovaný nebo nesubstituovaný arylamidoalkyl, substituovaný nebo nesubstituovaný arylalkylamidoalkyl, substituovaný nebo nesubstituovaný heteroarylamidoalkyl, substituovaný nebo nesubstituovaný heteroarylalkylamidoalkyl, substituovaný nebo nesubstituovaný arylalkyl, substituovaný nebo nesubstituovaný arylalkoxy, substituovaný nebo nesubstituovaný heteroaryl, substituovaný nebo nesubstituovaný heteroarylalkyl, halogenalkyl, nebo R_{51} a R_{52} , spolu s uhlíkovým atomem, ke kterému jsou připojeny, tvoří $C=O$ skupinu nebo substituovanou nebo nesubstituovanou alkenylovou skupinu;

M^1 je N nebo CR_{49} , kde R_{49} je H nebo substituovaný nebo nesubstituovaný alkyl;

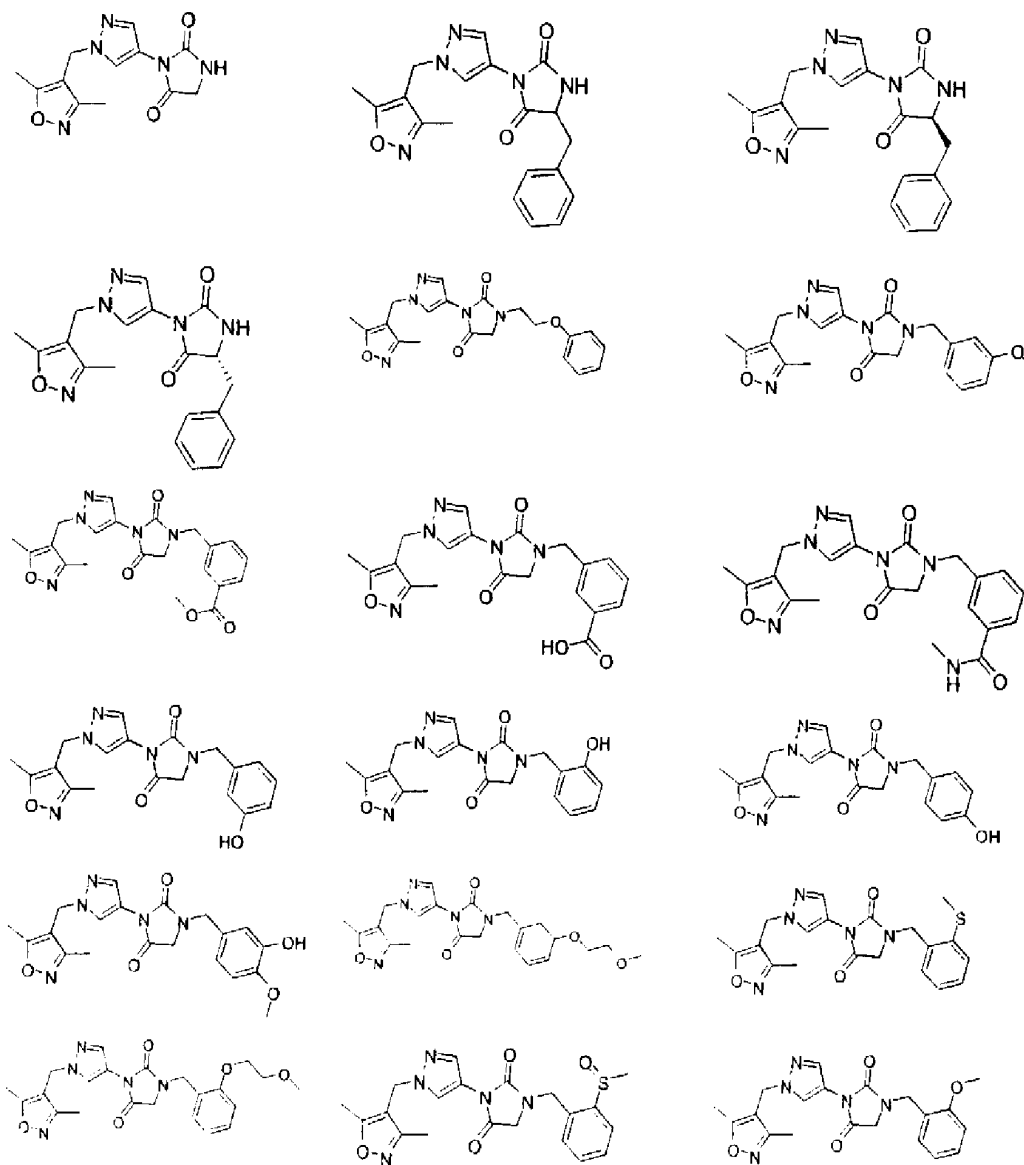
M^2 je N nebo CR_{50} , kde R_{50} je H nebo substituovaný nebo nesubstituovaný alkyl;

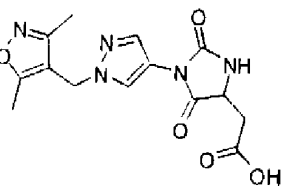
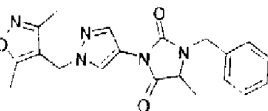
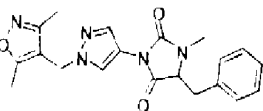
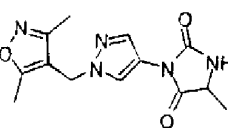
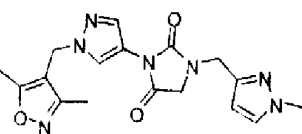
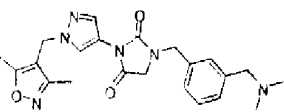
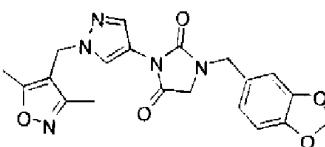
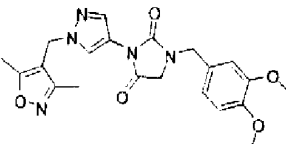
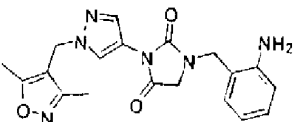
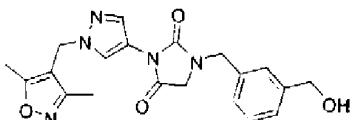
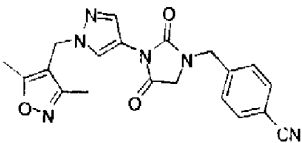
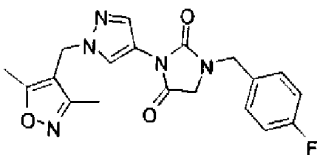
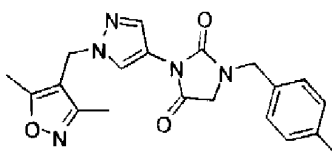
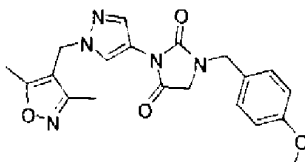
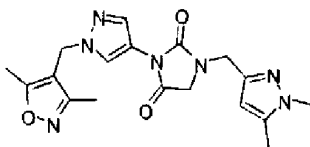
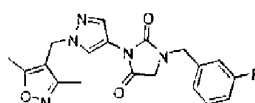
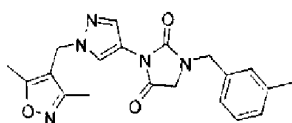
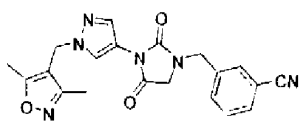
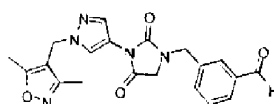
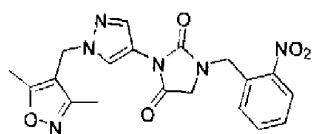
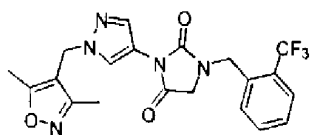
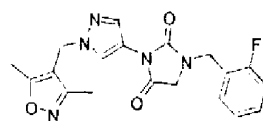
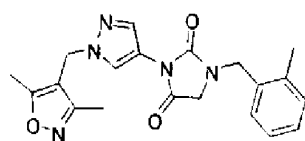
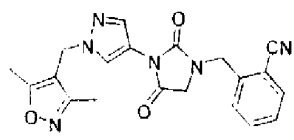
R_{38} je H, substituovaný nebo nesubstituovaný alkyl, substituovaný nebo nesubstituovaný cykloalkylalkyl, substituovaný nebo nesubstituovaný heterocykloalkylalkyl, substituovaný nebo nesubstituovaný aryl, substituovaný nebo nesubstituovaný arylamidoalkyl, substituovaný nebo nesubstituovaný heteroarylamidoalkyl, substituovaný nebo nesubstituovaný arylalkyl, substituovaný nebo nesubstituovaný arylalkoxy, substituovaný nebo nesubstituovaný heteroaryl, substituovaný nebo nesubstituovaný heteroarylalkyl, nebo halogenalkyl;

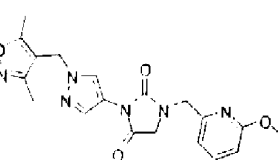
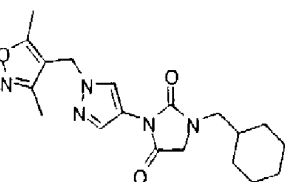
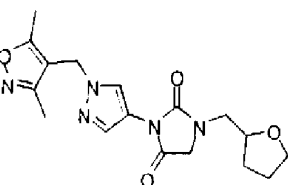
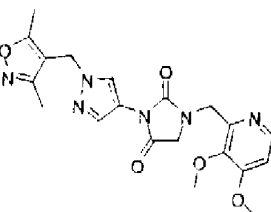
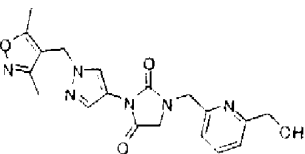
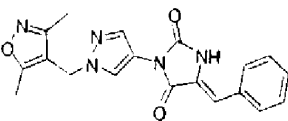
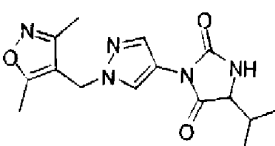
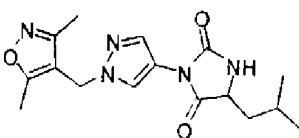
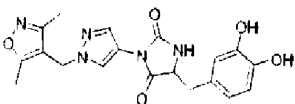
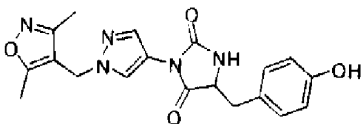
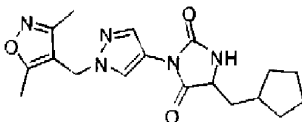
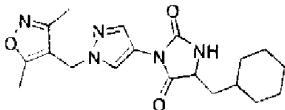
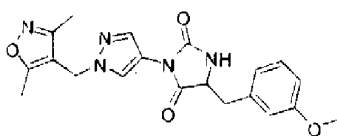
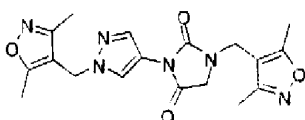
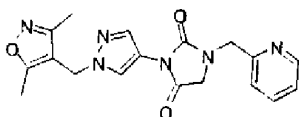
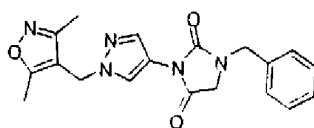
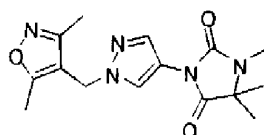
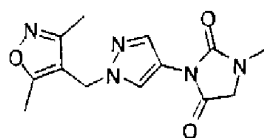
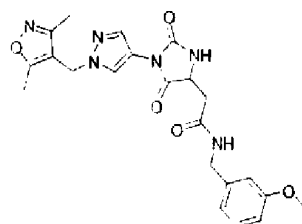
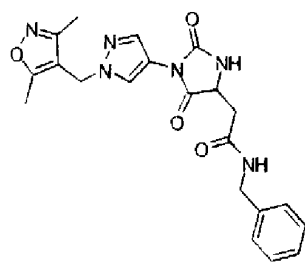
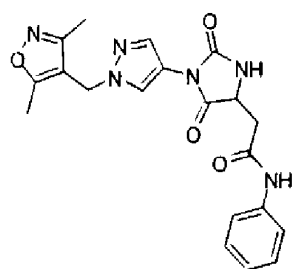
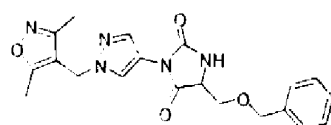
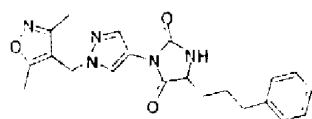
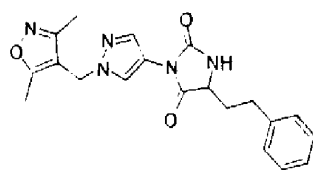
R_{47} je H, substituovaný nebo nesubstituovaný alkyl, substituovaný nebo nesubstituovaný alkoxy, substituovaný nebo nesubstituovaný aryl, substituovaný nebo nesubstituovaný arylalkyl nebo halogen; a

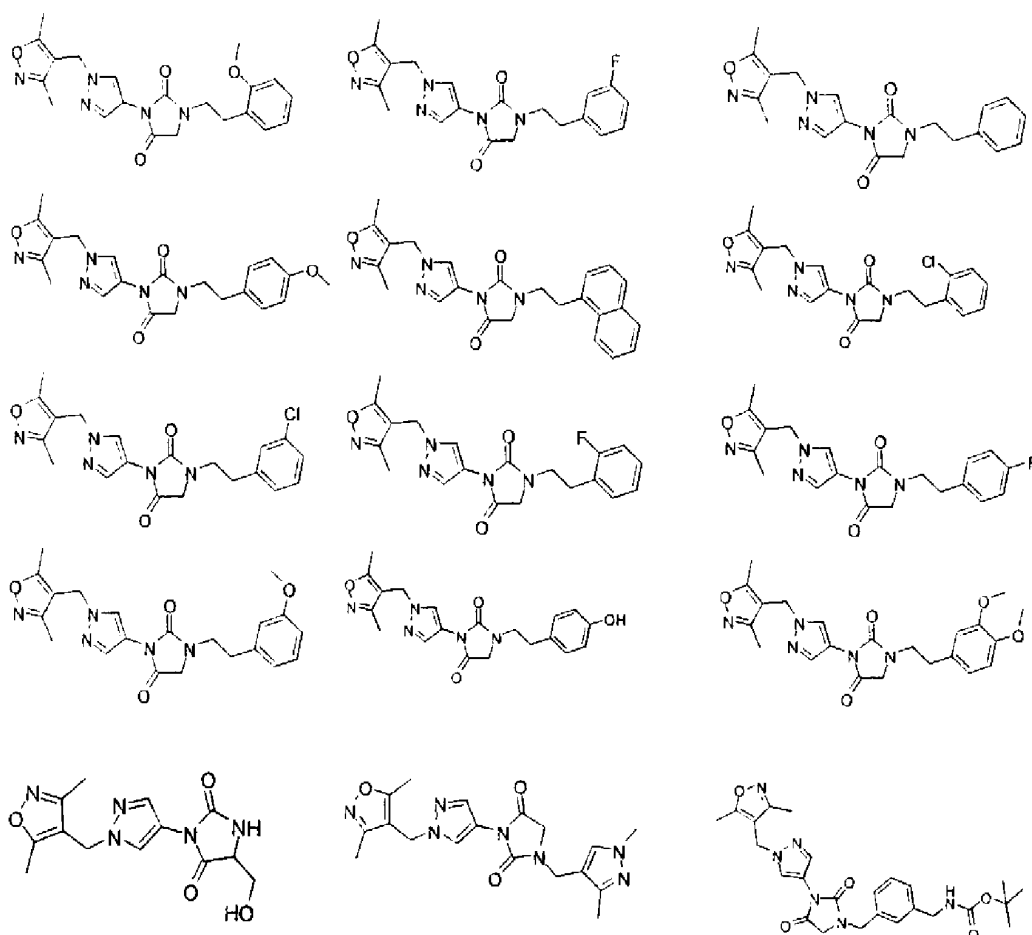
R_{4k} je H, substituovaný nebo nesubstituovaný alkyl, substituovaný nebo nesubstituovaný alkoxy, substituovaný nebo nesubstituovaný aryl, substituovaný nebo nesubstituovaný arylalkyl nebo halogen.

[00629] Podle ještě jiného aspektu se vynález týká sloučeniny dle vzorce:



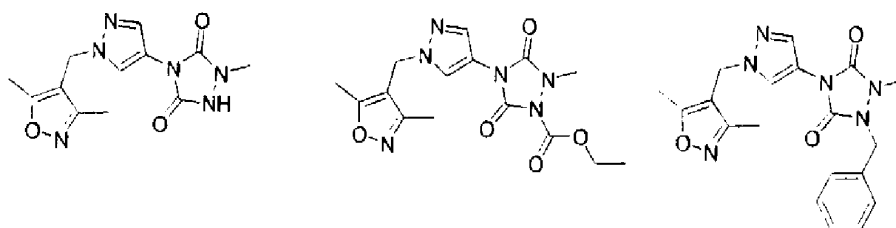


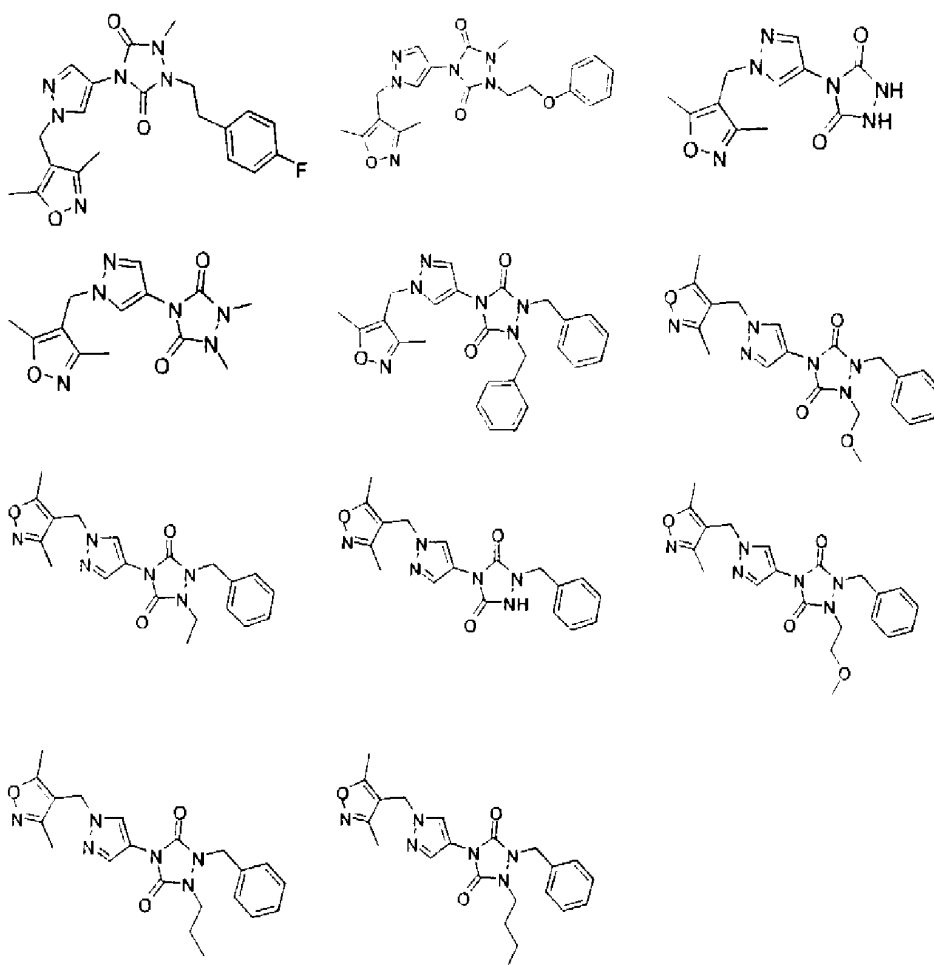




nebo její soli, hydrátu, solvátu, N-oxidu nebo proléčiva.

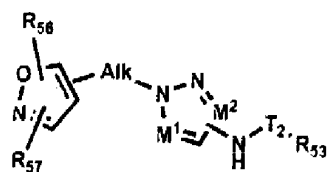
[00630] Podle ještě dalšího aspektu se vynález týká sloučeniny dle vzorce:





nebo její soli, hydrátu, solvátu, N-oxidu nebo proléčiva,

[00631] Podle ještě jiného aspektu se vynález týká způsobu přípravy sloučeniny dle vzorce:



nebo její soli, hydrátu, solvátu, N-oxidu nebo proléčiva,

kde Alk je alkylová skupina, případně přerušená heteroatomem;

T₂ je C=S, C=O, nebo S(O)₂.

R_{53} je substituovaný nebo nesubstituovaný alkyl, substituovaný nebo nesubstituovaný cykloalkyl, substituovaný nebo nesubstituovaný heteroaryl, substituovaný nebo nesubstituovaný aryl, nebo substituovaný nebo nesubstituovaný arylalkyl;

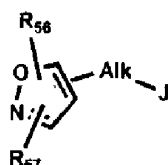
M^1 je N nebo CR_{54} , kde R_{54} je H nebo substituovaný nebo nesubstituovaný alkyl;

M^2 je N nebo CR_{55} , kde R_{55} je H nebo substituovaný nebo nesubstituovaný alkyl;

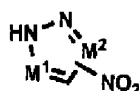
R_{56} je H, substituovaný nebo nesubstituovaný alkyl, substituovaný nebo nesubstituovaný alkoxy, substituovaný nebo nesubstituovaný aryl, substituovaný nebo nesubstituovaný arylalkyl, nebo halogen; a

R_{57} je H, substituovaný nebo nesubstituovaný alkyl, substituovaný nebo nesubstituovaný alkoxy, substituovaný nebo nesubstituovaný aryl, substituovaný nebo nesubstituovaný arylalkyl nebo halogen;

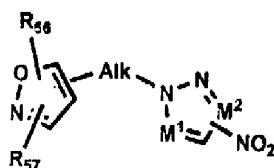
kde způsob zahrnuje reakci sloučeniny dle vzorce:



kde R_{56} , R_{57} a Alk jsou definovány výše a J je odstupující skupina;
se sloučeninou dle vzorce:



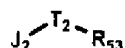
kde M^1 a M^2 jsou definovány výše, což dá sloučeninu dle vzorce



mající NO_2 skupinu;

redukce NO_2 skupiny za vzniku sloučeniny mající NH_2 skupinu; a

reakci sloučeniny mající NH_2 skupinu se sloučeninou dle vzorce



kde J_2 je odstupující skupina a T_2 a R_{53} jsou definovány výše.

[00632] Podle ještě jiného aspektu se vynález týká způsobu výroby sloučeniny dle vzorce:

R_{51} je substituovaný nebo nesubstituovaný alkyl, substituovaný nebo nesubstituovaný cykloalkyl, substituovaný nebo nesubstituovaný heteroaryl, substituovaný nebo nesubstituovaný aryl, nebo substituovaný nebo nesubstituovaný arylalkyl;

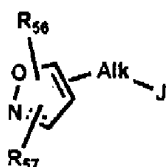
M^1 je N nebo CR_{54} , kde R_{54} je H nebo substituovaný nebo nesubstituovaný alkyl;

M^2 je N nebo CR_{55} , kde R_{55} je H nebo substituovaný nebo nesubstituovaný alkyl;

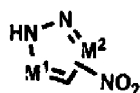
R_{56} je H, substituovaný nebo nesubstituovaný alkyl, substituovaný nebo nesubstituovaný alkoxy, substituovaný nebo nesubstituovaný aryl, substituovaný nebo nesubstituovaný arylalkyl, nebo halogen; a

R_{57} je H, substituovaný nebo nesubstituovaný alkyl, substituovaný nebo nesubstituovaný alkoxy, substituovaný nebo nesubstituovaný aryl, substituovaný nebo nesubstituovaný arylalkyl nebo halogen;

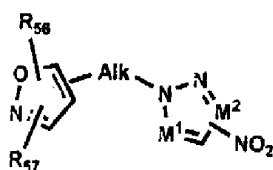
kde způsob zahrnuje reakci sloučeniny dle vzorce:



kde R_{56} , R_{57} a Alk jsou definovány výše a J je odstupující skupina;
se sloučeninou dle vzorce:



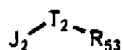
kde M^1 a M^2 jsou definovány výše, což dá sloučeninu dle vzorce



mající NO_2 skupinu;

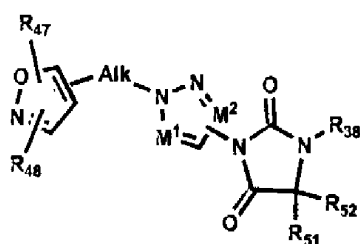
redukce NO_2 skupiny za vzniku sloučeniny mající NH_2 skupinu; a

reakci sloučeniny mající NH_2 skupinu se sloučeninou dle vzorce



kde J_2 je odstupující skupina a T_2 a R_{53} jsou definovány výše.

[00632] Podle ještě jiného aspektu se vynález týká způsobu výroby sloučeniny dle vzorce:



nebo její soli, hydrátu, solvátu, N-oxidu nebo prolečiva,

kde Alk je alkylová skupina, případně přerušená heteroatomem;

R_{51} a R_{52} jsou stejné nebo různé navzájem na sobě nezávislé, H, substituovaný nebo nesubstituovaný alkyl, substituovaný nebo nesubstituovaný cykloalkylalkyl, substituovaný nebo nesubstituovaný heterocykloalkylalkyl, substituovaný nebo nesubstituovaný aryl, substituovaný nebo nesubstituovaný arylamidoalkyl, substituovaný nebo nesubstituovaný arylalkylamidoalkyl, substituovaný nebo nesubstituovaný heteroarylamidoalkyl, substituovaný nebo nesubstituovaný heteroarylalkylamidoalkyl, substituovaný nebo nesubstituovaný arylalkyl, substituovaný nebo nesubstituovaný arylalkoxy, substituovaný nebo nesubstituovaný heteroaryl, substituovaný nebo nesubstituovaný heteroarylalkyl, halogenalkyl, nebo R_{51} a R_{52} , spolu s uhlíkovým atomem, ke kterému jsou připojeny, tvoří substituované nebo nesubstituované alkenylové skupiny;

M^1 je N nebo CR_{49} , kde R_{49} je H nebo substituovaný nebo nesubstituovaný alkyl;

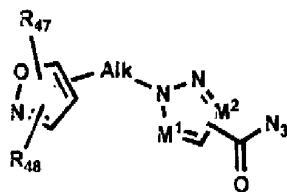
M^2 je N nebo CR_{50} , kde R_{50} je H nebo substituovaný nebo nesubstituovaný alkyl;

R_{38} je H, substituovaný nebo nesubstituovaný alkyl, substituovaný nebo nesubstituovaný cykloalkylalkyl, substituovaný nebo nesubstituovaný heterocykloalkylalkyl, substituovaný nebo nesubstituovaný aryl, substituovaný nebo nesubstituovaný arylamidoalkyl, substituovaný nebo nesubstituovaný heteroarylamidoalkyl, substituovaný nebo nesubstituovaný arylalkyl, substituovaný nebo nesubstituovaný arylalkoxy, substituovaný nebo nesubstituovaný heteroaryl, substituovaný nebo nesubstituovaný heteroarylalkyl nebo halogenalkyl;

R_{47} je H, substituovaný nebo nesubstituovaný alkyl, substituovaný nebo nesubstituovaný alkoxy, substituovaný nebo nesubstituovaný aryl, substituovaný nebo nesubstituovaný arylalkyl nebo halogen; a

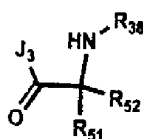
R_{48} je H, substituovaný nebo nesubstituovaný alkyl, substituovaný nebo nesubstituovaný alkoxy, substituovaný nebo nesubstituovaný aryl, substituovaný nebo nesubstituovaný arylalkyl nebo halogen;

kde způsob zahrnuje zahřátí sloučeniny dle vzorce:



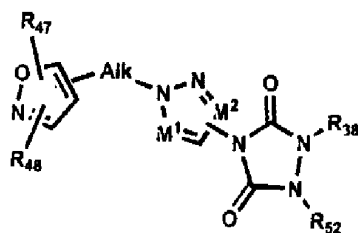
kde R_{47} , R_{48} , Alk, M^1 a M^2 jsou definovány výše;

aby se přeměnila $-CON_3$ skupina na $-N=C=O$ skupinu a pak reagovala se sloučeninou dle vzorce:



kde J_3 je odstupující skupina a R_{38} , R_{51} a R_{52} jsou definovány výše.

[00633] Podle ještě jiného aspektu se vynález týká výroby sloučeniny dle vzorce:



nebo její soli, hydrátu, solvátu, N-oxidu nebo proléčiva,

kde Alk je alkylová skupina, případně přerušená heteroatomem;

R_{52} je H, substituovaný nebo nesubstituovaný alkyl, substituovaný nebo nesubstituovaný cykloalkylalkyl, substituovaný nebo nesubstituovaný heterocykloalkylalkyl, substituovaný nebo nesubstituovaný aryl, substituovaný nebo nesubstituovaný arylamidoalkyl, substituovaný nebo nesubstituovaný arylalkylamidoalkyl, substituovaný nebo nesubstituovaný heteroarylalkylamidoalkyl, substituovaný nebo nesubstituovaný arylalkyl, substituovaný nebo nesubstituovaný arylalkoxy, substituovaný nebo nesubstituovaný heteroaryl, substituovaný nebo nesubstituovaný heteroarylalkyl, halogenalkyl;

M^1 je N nebo CR_{49} , kde R_{49} je H nebo substituovaný nebo nesubstituovaný alkyl;

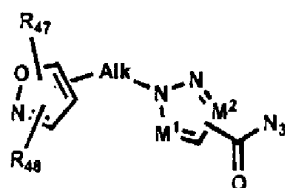
M^2 je N nebo CR_{50} , kde R_{50} je H nebo substituovaný nebo nesubstituovaný alkyl;

R_{38} je H, substituovaný nebo nesubstituovaný alkyl, substituovaný nebo nesubstituovaný cykloalkylalkyl, substituovaný nebo nesubstituovaný heterocykloalkylalkyl, substituovaný nebo nesubstituovaný aryl, substituovaný nebo nesubstituovaný ariamidoalkyl, substituovaný nebo nesubstituovaný heteroarylamidoalkyl, substituovaný nebo nesubstituovaný arylalkyl, substituovaný nebo nesubstituovaný arylalkoxy, substituovaný nebo nesubstituovaný heteroaryl, substituovaný nebo nesubstituovaný heteroarylalkyl nebo halogenalkyl;

R_{47} je H, substituovaný nebo nesubstituovaný alkyl, substituovaný nebo nesubstituovaný alkoxy, substituovaný nebo nesubstituovaný aryl, substituovaný nebo nesubstituovaný arylalkyl nebo halogen; a

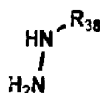
R_{48} je H, substituovaný nebo nesubstituovaný alkyl, substituovaný nebo nesubstituovaný alkoxy, substituovaný nebo nesubstituovaný aryl, substituovaný nebo nesubstituovaný arylalkyl nebo halogen;

kde způsob zahrnuje sloučeninu dle vzorce:



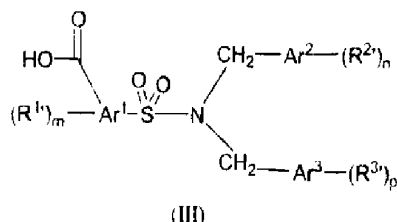
kde R_{47} , R_{48} , Alk, M^1 a M^2 jsou definovány výše;

aby se přeměnila $-CON_3$ skupina na $-N=C=O$ skupinu a pak reagovala s hydrazinem dle vzorce:



kde R_{38} je definován výše.

[00634] Podle ještě jiného aspektu se vynález týká způsobu výroby sloučeniny dle vzorce:



nebo její soli, hydrátu, solvátu nebo N-oxidu, kde:

Ar^1 , Ar^2 a Ar^3 jsou nezávisle pěti- nebo šestičlenné aryly, heteroaryly nebo cykloalkylový kruh a Ar^2 a Ar^3 mohou být případně vynechány;

m je 0, 1, 2 nebo 3;

n a p jsou nezávisle 0, 1, 2, 3 nebo 4;

každý R^{1i} je nezávisle vybrán ze skupiny sestávající z vodíku, halogenu, alkylu, substituovaného alkylu, arylu, substituovaného arylu, arylalkylu, substituovaného arylalkylu, acylu, substituovaného acylu, heteroalkylu, substituovaného heteroalkylu, heteroarylu, substituovaného heteroarylu, heteroarylalkylu, substituovaného heteroarylalkylu, CN , NO_2 , OR^6 , $S(O)_6R^6$, NR^6R^7 , $CONR^6R^7$, CO_2R^6 , $NR^6CO_2R^7$, $NR^6CONR^7R^8$, $NR^6CSNR^7R^8$, $NR^6C(=NH)NR^7R^8$, $SO_2NR^5R^6$, $NR^5SO_2R^6$, $NR^5SO_2NR^6R^7$, $B(OR^5)(OR^6)$, $P(O)(OR^5)(OR^6)$ a $P(O)(R^5)(OR^6)$;

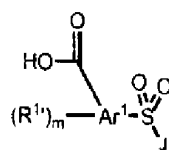
každý R^{2i} je nezávisle vybrán ze skupiny sestávající z vodíku, halogenu, alkylu, substituovaných alkylu, arylu, substituovaného arylu, arylalkylu, substituovaného arylalkylu, acylu, substituovaného acylu, heteroalkylu, substituovaných heteroalkylu, heteroarylu, substituovaného heteroarylu, heteroarylalkylu, substituovaného heteroarylalkylu, CN , NO_2 , OR^6 , $S(O)_6R^6$, NR^6R^7 , $CONR^6R^7$, CO_2R^6 , $NR^6CO_2R^7$, $NR^6CONR^7R^8$, $NR^6CSNR^7R^8$, $NR^6C(=NH)NR^7R^8$, $SO_2NR^5R^6$, $NR^5SO_2R^6$, $NR^5SO_2NR^6R^7$, $B(OR^5)(OR^6)$, $P(O)(OR^5)(OR^6)$ a $P(O)(R^5)(OR^6)$;

každý R^{3i} je nezávisle vybrán ze skupiny sestávající z vodíku, halogenu, alkylu, substituovaného alkylu, arylu, substituovaného arylu, arylalkyl, substituovaného arylalkylu, acylu, substituovaného acylu, heteroalkylu, substituovaného heteroalkylu, heteroarylu, substituovaného heteroarylu, heteroarylalkylu, substituovaného heteroarylalkylu, CN , NO_2 , OR^6 , $S(O)_6R^6$, NR^6R^7 , $CONR^6R^7$, CO_2R^6 , $NR^6CO_2R^7$, $NR^6CONR^7R^8$, $NR^6CSNR^7R^8$, $NR^6C(=NH)NR^7R^8$, $SO_2NR^5R^6$, $NR^5SO_2R^6$, $NR^5SO_2NR^6R^7$, $B(OR^5)(OR^6)$, $P(O)(OR^5)(OR^6)$ a $P(O)(R^5)(OR^6)$;

$R^{5i}R^{8i}$ jsou nezávisle vodík, alkyl, substituovaný alkyl, aryl, substituovaný aryl, arylalkyl, substituovaný arylalkyl, heteroalkyl, substituovaný heteroalkyl, heteroaryl, substituovaný heteroaryl, heteroarylalkyl nebo substituovaný heteroarylalkyl nebo případně R^6 a R^7 , R^7 a R^8 , spolu s atomy, ke kterým jsou připojeny, tvoří cykloheteroalkylový nebo substituovaných cykloheteroalkylový kruh;

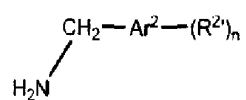
b je 0, 1, nebo 2;

kde způsob zahrnuje sloučeninu dle vzorce:



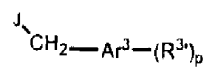
kde J je odstupující skupina;

se sloučeninou dle vzorce:



za vzniku produktu; a

reakce produktu se sloučeninou dle vzorce:



kde J je odstupující skupina.

SEKVENCE CHIMÉRNÍHO G PROTEINU A hT2R GENŮ A POLYPEPTIDŮ

[00635] Sekvence proteinu Rhodopsin tag: (SEQ ID NO:1)

MNGTEGPNFYVPFSNKTGVVRSFPFAPQYYLAEPW

[00636] Sekvence proteinu G16gust44: (SEQ ID NO:2)

MARSLTWRCCPWCLTEDEKAAARVDQENRILLEQKKQDRGELKLLLLGPGESGKST
FIKQMRIIHGAGYSEEERKGFRPLVYQNIFVSMRAMIEAMERLQIPFSRPESKHHASLV
MSQDPYKVTTFEKRYAAAMQWLWRDAGIRACYERRREFHLLDSAVYYLSHLERITE
EGYVPTAQDVLRSRMPTTGINEYCFVQKTNLRIVDVGGQKSERKKWIHCFENPOMO
CÍLIYLASLSEYDQCLEENNQENRMKESLALFGTILELPWFKSTSVILFLNKTDILEEKI
PTSHLATYFPSFQGPQDAEAAKRIFLDMYTRMYTGCVDGPEGSNLKKEDKEIYSHM
TCATDTQNVKFVFDVAVTDIIKENLKDCGLF

[00637] hT2R8 sekvence:

DNA-(SEQ	ID	NO:3)
ATGTTCACTCCTGCAGATAACATCTTTATAATCCTAATAACTGGAGAATTCATACT		
AGGAATATTGGGGAATGGATACAT		
TGCACTAGTCAACTGGATTGACTGGATTAAGAAGAAAAAGATTTCCACAGTTGAC		
TACATCCTTACCAATTTAGTTATCG		
CCAGAATTTGTTTGATCAGTGTAATGGTTGTAAATGGCATTGTAATAGTACTGAA		
CCCAGATGTTTATACAAAAAATAAA		
CAACAGATAGTCATTTTACCTTCTGGACATTTGCCAACTACTTAAATATGTGGAT		
TACCACCTGCCTTAATGTCTTCTA		
TTTCTGAAGATAGCCAGTTCCTCTCATCCACTTTTCTCTGGCTGAAGTGGAAAA		
TTGATATGGTGGTGCCTGGATCC		
TGCTGGGATGCTTTGCCATTTCTTGTGGTCAGCCTTATAGCAGCAATAGTACTG		
AGTTGTGATTATAGGTTTCATGCA		
ATTGCCAAACATAAAAGAAACATTACTGAAATGTTCCATGTGAGTAAAATACCAT		
ACTTTGAACCCCTTACTCTCTTTAA		
CCTGTTTGCAATTGTCCCATTTATTGTGTCCTGATATCATTTTTCTTTTAGTAAG		
ATCTTTATGGAGACATACCAAGC		
AAATAAACTCTATGCTACCGGCAGTAGAGACCCCAGCACAGAAGTTCATGTGA		
GAGCCATTAAACTATGACTTCATT		

ATCTTCTTTTTTCTTACTATAATTCTTCTATTTTGATGACCTTAGCTATCTTA
 TGACAAAATACAAGTTAGCTGT
 GGAGTTTGGAGAGATTGCAGCAATTCTCTACCCCTTGGGTCACTCACTTATTTAA
 TTGTTTTAAATAATAAACTGAGGC
 AGACATTTGTCAGAATGCTGACATGTAGAAAAATTGCCTGCATGATATGA

Protein-(SEQ ID NO:4)

MFSPADNIFILLITGEFILGILGNGYIALVNWIDWIKKKKISTVDYILTNPOMOCIRICLI
 SVMVVGIVIVLNPVYTKNK
 QQIVFTFWTFANYLNMWITTCNLVIFYFLKIASSSHPLFLWLKWKIDMVVHWILLGCF
 AISLLVSLIAAIVLSCDYRFHA
 IAKHKRNITEMFHVSKIPYFEPLTLFNLFAIVPFIVSLISFFLLVRSLWRHTKQIKLYATG
 SRDPSTEVHVRAIKTMTSF
 IFFFFLYYISSILMTFSYLMTKYKLAVEFGEIAAILYPLGHSLILIVLNNKLRQTFVRML
 TCRKIACMI

[00638] hT2R14 sekvence:

DNA-(SEQ	ID	NO:5)
ATGGGTGGTGTGCATAAAGAGCATATTTACATTCGTTTTAATTGTGGAATTTATAAT		
TGGAAATTTAGGAAATAGTTTCAT		
AGCACTGGTGAAGTGTATTGACTGGGTCAAGGGAAGAAAGATCTCTTCGGTTGAT		
CGGATCCTCACTGCTTTGGCAATCT		
CTCGAATTAGCCTGGTTTGGTTAATATTCGGAAGCTGGTGTGTGTCTGTGTTTTTC		
CCAGCTTTATTTGCCACTGAAAAA		
ATGTTCAAGATGCTTACTAATATCTGGACAGTGATCAATCATTTTAGTGTCTGGTT		
AGCTACAGGCCTCGGTACTTTTTA		
TTTTCTCAAGATAGCCAATTTTTCTAACTCTATTTTTCTCTACCTAAAGTGGAGaGT		
TAAAAAGGTGGTTTTTGGTGCTGC		
TTCTTGAGACTTCGGTCTTCTTGTTTTTAAATATTGCACTGATAAACAATCCATATA		
AATGCCAGTATCAATGGATACAGA		
AGAAACAAGACTTGCAGTTCTGATTCAAGTAACTTTACACGATTTTCCAGTCTTAT		
TGTATTAACCAGCACTGTGTTTCAT		
TTTCATACCCTTTACTTTGICCTGGCAATGTTTCTTCTCCTCACTTCTCCATGTG		
GAAACATCGCAAGAAGATGCAGC		

ACACTGTCAAAATATCCGGAGACGCCAGCACCAAAGCCACAGAGGAGTTAAAA
GTGTGATCACTTTCTTCCTACTCTAT
GCCATTTTCTCTCTGTCTTTTTTCATATCAGTTTGGACCTCTGAAAGGTTGGAGGA
AAATCTAATTATTCTTTCCCAGGT
GATGGGAATGGCTTATCCTTCATGTCACCTCATGTGTTCTGATTCTTGGAACAAGA
AGCTGAGACAGGCCTCTCTGTCAG
TGCTACTGTGGCTGAGGTACATGTTCAAAGATGGGGAGCCCTCAGGTCACAAAGA
ATTTAGAGAATCATCTTGA

Protein-(SEQ ID NO:6)

MGGVIKSIFTFVLIVEFIIGNLGN SFIALVNCIDWVKGRKISSVDRILTALISRISLVWLI
FGSWCVSVFFPALFATEK
MFRMLTNIWTVINHFSVWLATGLGTFYFLKIANFSNSIFLYLKWRVKKVVLVLLVT
SVFLFLNIALINIHINPŘIBLIŽNĚNGYR
RNKTCSSDSSNFTRFSSLIVLTSTVFIFIPFTLSLAMFLLLIFSMWKHRKKMQHTVKISG
DASTKAHRGVKSVITFFLLY
AIFSLSFFISVWTSERLEENLIILSQVMGMAYPSCHSCVLILGNKKLRQASLSVLLWLR
YMFKDGEP SGHKEFRESS

[00639] Zatímco bylo v předchozím popisu podrobně vysvětleno několik provedení vynálezu, má se za to, že popis výše je pouze ilustrativní a neomezuje popsáný vynález. Vynález je vymezen patentovými nároky, které následují.

23.09.10

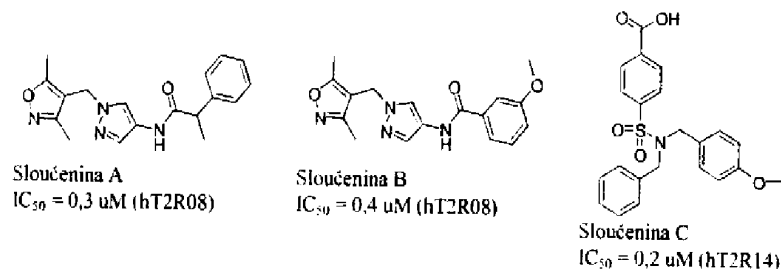
2010/180

PATENTOVÉ NÁROKY

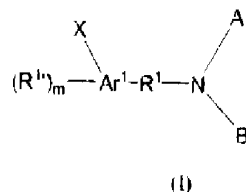
1. Test pro identifikaci sloučeniny, která údajně moduluje hořkou chuť spojenou s kávou a/nebo potravinami, nápoji a/nebo léčivy s příchutí kávy, zahrnující provedení rozboru, který vyhledává sloučeninu, která moduluje lidský T2R receptor hořké chuti vybraný z hT2R8 a/nebo hT2R14 nebo která moduluje aktivaci lidského hT2R8 a/nebo hT2R14 jinou hořkou sloučeninou nebo kompozici obsahující hořkou sloučeninu.
2. Test podle nároku 1, kde hořká sloučenina je obsažena v extraktu pocházejícím z kávy.
3. Test podle nároku 1, kde receptor má polypeptidovou sekvenci, která je alespoň z 90 % identická s hT2R8 polypeptidem v SEKV ID Č.: 4 nebo je kódována sekvencí nukleové kyseliny, která hybridizuje se sekvencí nukleové kyseliny SEKV ID Č.:3 za stringentních podmínek.
4. Test podle nároku 1, kde receptor má polypeptidovou sekvenci, která je alespoň z 90 % identická s hT2R14 polypeptidem v SEKV ID Č.: 6 nebo je kódována sekvencí nukleové kyseliny, která hybridizuje za stringentních hybridizačních podmínek se sekvencí nukleové kyseliny SEKV ID Č.:5 za stringentních hybridizačních podmínek.
5. Test podle nároku 1, 2, nebo 3, kde účinnost blokování hořkosti identifikované sloučeniny je potvrzena chuťovým testem.
6. Test podle nároku 5, kde chuťový test potvrdí, zda identifikovaná sloučenina blokuje nebo inhibuje hořkou chuť vyvolanou sloučeninou pocházející z kávy nebo kompozici obsahující tuto sloučeninu.
7. Test podle nároku 6, kde káva zahrnuje instantní kávu, mletou kávu, vařenou kávu nebo sloučeninu nebo extrakt z nich pocházející.
8. Test podle nároku 1, kde chuťový receptor je exprimován na buněčné membráně.
9. Test podle nároku 1, kde chuťový receptor je exprimován na izolované buněčné membráně.
10. Test podle nároku 1, kde chuťový receptor je exprimován na intaktní buňce.
11. Test podle nároku 1, kde chuťový receptor je exprimován na eukaryotické buňce.

12. Test podle nároku 1, kde chuťový receptor je exprimován buňkou obojživelníka, savce nebo hmyzu.
13. Test podle nároku 1, kde chuťový receptor je exprimován na buňce vybrané z HEK293, BHK, COS, HEK293T, CHO a oocyty z *Xenopus*.
14. Test podle nároku 1, kterým je fluorimetrický test.
15. Test podle nároku 1, kterým je vazební test.
16. Test podle nároku 1, který detekuje účinek sloučeniny testováním jejího působení na intracelulární koncentraci iontů.
17. Test podle nároku 1, který detekuje účinek sloučeniny na intracelulární sodík nebo vápník.
18. Test podle nároku 1, který detekuje účinek sloučeniny na membránový potenciál buňky.
19. Test podle nároku 1, který detekuje účinek sloučeniny na transkripci reportérového genu.
20. Test podle nároku 1, kde sloučenina je zvolena na základě její schopnosti blokovat interakci chuťového receptoru s jedním z hořkých ligandů.
21. Test podle nároku 1, který detekuje účinek sloučeniny na intracelulární cAMP, cGMP nebo IP3.
22. Test podle nároku 1, kde chuťový receptor obsahuje extracelulární doménu nebo transmembránovou oblast chuťového receptoru.
23. Test podle nároku 1, který detekuje změny vápníku za použití kalcium-specifického fluorescenčního barviva.
24. Test podle nároku 1, který detekuje změny intracelulárního vápníku za použití barviva vybraného z Fluo-3, Fluo-4 a Fura-2.
25. Test podle nároku 1, kde chuťový receptor je v roztoku.

26. Test podle nároku 1, kterým je vazební test, který detekuje změny spektroskopických vlastností, hydrodynamických vlastností nebo rozpustnosti.
27. Test podle nároku 1, který detekuje účinek sloučeniny na tvorbu komplexu chuťového receptoru s G proteinem.
28. Test podle nároku 1, který detekuje účinek sloučeniny na tvorbu komplexu chuťového receptoru s G proteinem vybraným z transducinu, gustducinu, $G_{\alpha 15}$, $G_{\alpha 16}$, nebo chiméry z nich.
29. Test podle nároku 1, kterým je fluorescenční polarizační test.
30. Test podle nároku 1, kde chuťový receptor je navázán na substrát pevné fáze.
31. Test podle nároku 1, kterým je vysoce výkonný (HT) test.
32. Test podle nároku 1, kde chuťový receptor je exprimován buňkou HEK293.
33. Sloučenina vybraná ze sloučenin majících následující struktury:



34. Sloučenina strukturního vzorce 1 níže :



nebo její sůl, hydrát, solvát nebo N-oxid, kde:

Ar^1 je pěti- nebo šestičlenný arylový, heteroarylový nebo cykloalkylový kruh;

m je 0, 1, 2 nebo 3;

R^1 je SO_2 ; C=O ; C=S ; nebo C=NOR^4 ;

X je vybráno ze skupiny sestávající z vodíku, halogenu, alkylu, substituovaného alkylu, arylu, substituovaného arylu, arylalkylu, substituovaného arylalkylu, acylu, substituovaného acylu, heteroalkylu, substituovaného heteroalkylu, heteroarylu, substituovaného heteroarylu, heteroarylalkylu, substituovaného heteroarylalkylu, CN , NO_2 , OR^6 , $\text{S(O)}_6\text{R}^6$, NR^6R^7 , CONR^6R^7 , CO_2R^6 , $\text{NR}^6\text{CO}_2\text{R}^7$, $\text{NR}^6\text{CONR}^7\text{R}^8$, $\text{NR}^6\text{CSNR}^7\text{R}^8$, $\text{NR}^6\text{C(=NH)NR}^7\text{R}^8$, $\text{SO}_2\text{NR}^5\text{R}^6$, $\text{NR}^5\text{SO}_2\text{R}^6$, $\text{NR}^5\text{SO}_2\text{NR}^6\text{R}^7$, $\text{B(OR}^5)(\text{OR}^6)$, $\text{P(O)(OR}^5)(\text{OR}^6)$ a $\text{P(O)(R}^5)(\text{OR}^6)$;

každý R^{11} je nezávisle zvolen ze skupiny sestávající z vodíku, halogenu, alkylu, substituovaného alkylu, arylu, substituovaného arylu, arylalkylu, substituovaného arylalkylu, acylu, substituovaného acylu, heteroalkylu, substituovaného heteroalkylu, heteroarylu, substituovaného heteroarylu, heteroarylalkylu, substituovaného heteroarylalkylu, CN , NO_2 , OR^6 , $\text{S(O)}_6\text{R}^6$, NR^6R^7 , CONR^6R^7 , CO_2R^6 , $\text{NR}^6\text{CO}_2\text{R}^7$, $\text{NR}^6\text{CONR}^7\text{R}^8$, $\text{NR}^6\text{CSNR}^7\text{R}^8$, $\text{NR}^6\text{C(=NH)NR}^7\text{R}^8$, $\text{SO}_2\text{NR}^5\text{R}^6$, $\text{NR}^5\text{SO}_2\text{R}^6$, $\text{NR}^5\text{SO}_2\text{NR}^6\text{R}^7$, $\text{B(OR}^5)(\text{OR}^6)$, $\text{P(O)(OR}^5)(\text{OR}^6)$ a $\text{P(O)(R}^5)(\text{OR}^6)$;

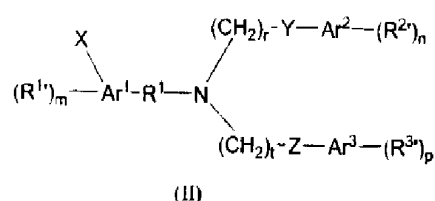
nebo alternativně X a/nebo alespoň jeden R^{11} spolu s atomy, k nimž jsou navázány, tvoří arylový, substituovaný arylový, heteroarylový, substituovaný heteroarylový, cykloalkylový, substituovaný cykloalkylový, cykloheteroalkylový nebo substituovaný cykloheteroalkylový kruh, kde kruh je případně kondenzovaný s jiným arylovým, substituovaným arylovým, heteroarylovým, substituovaným heteroarylovým, cykloalkylovým, substituovaným cykloalkylovým, cykloheteroalkylovým nebo substituovaným cykloheteroalkylovým kruhem;

R^4 - R^8 jsou nezávisle vybrány ze skupiny sestávající z vodíku, alkylu, substituovaného alkylu, arylu, substituovaného arylu, arylalkylu, substituovaného arylalkylu, heteroalkylu, substituovaného heteroalkylu, heteroarylu, substituovaného heteroarylu, heteroarylalkylu a substituovaného heteroarylalkylu nebo alternativně R^5 a R^6 , R^6 a R^7 , R^7 a R^8 , spolu s atomy, na něž jsou vázány, tvoří cykloheteroalkylový nebo substituovaný cykloheteroalkylový kruh;

A a B jsou nezávisle vybrány ze skupiny sestávající z vodíku, alkylu, substituovaného alkylu, arylu, substituovaného arylu, arylalkylu, substituovaného arylalkylu, acylu, substituovaného acylu, heteroalkylu, substituovaného heteroalkylu, heteroarylu, substituovaného heteroarylu, heteroarylalkylu, substituovaného heteroarylalkylu; a

b je 0, 1 nebo 2.

35. Sloučenina strukturního vzorce II znázorněného níže:



nebo její sůl, hydrát, solvát nebo N-oxid, kde:

Ar^1 , Ar^2 a Ar^3 jsou nezávisle pěti- nebo šestičlenný arylový, heteroarylový nebo cykloalkylový kruh;

m je 0, 1, 2 nebo 3;

n a p jsou nezávisle 0, 1, 2, 3 nebo 4;

r a t jsou nezávisle 0, 1 nebo 2;

Y a Z jsou nezávisle vybrány ze skupiny sestávající z CR^6R^7 , $\text{C}=\text{O}$, $\text{C}=\text{S}$, $\text{C}=\text{NOR}^6$, O , NR^6 a $\text{S}(\text{O})_6$;

R^1 je vybrán ze skupiny sestávající z SO_2 , $\text{C}=\text{O}$, $\text{C}=\text{S}$ a $\text{C}=\text{NOR}^4$;

X je vybrán ze skupiny sestávající z vodíku, alkylu, substituovaného alkylu, arylu, substituovaného arylu, arylalkylu, substituovaného arylalkylu, acylu, substituovaného acylu, heteroalkylu, substituovaného heteroalkylu, heteroarylu, substituovaného heteroarylu, heteroarylalkylu, substituovaného heteroarylalkylu, CN, NO_2 , $-\text{OR}^6$, $\text{Si}(\text{O})_6\text{R}^6$, NR^6R^7 , CONR^6R^7 , CO_2R^6 , $\text{NR}^6\text{CO}_2\text{R}^7$, $\text{NR}^6\text{CONR}^7\text{R}^8$, $\text{NR}^6\text{CSNR}^7\text{R}^8$, $\text{NR}^6\text{C}(=\text{NH})\text{NR}^7\text{R}^8$, $\text{SO}_2\text{NR}^5\text{R}^6$, $\text{NR}^5\text{SO}_2\text{R}^6$, $\text{NR}^5\text{SO}_2\text{NR}^6\text{R}^7$, $\text{B}(\text{OR}^5)(\text{OR}^6)$, $\text{P}(\text{O})(\text{OR}^5)(\text{OR}^6)$ a $\text{P}(\text{O})(\text{R}^5)(\text{OR}^6)$;

každý R^{1*} je nezávisle zvolen ze skupiny sestávající z vodíku, halogenu, alkylu, substituovaného alkylu, arylu, substituovaného arylu, arylalkylu, substituovaného arylalkylu, acylu, substituovaného acylu, heteroalkylu, substituovaného heteroalkylu, heteroarylu, substituovaného heteroarylu, heteroarylalkylu, substituovaného heteroarylalkylu, CN , NO_2 , OR^6 , $S(O)_6R^6$, NR^6R^7 , $CONR^6R^7$, CO_2R^6 , $NR^6CO_2R^7$, $NR^6CONR^7R^8$, $NR^6CSNR^7R^8$, $NR^6C(=NH)NR^7R^8$, $SO_2NR^5R^6$, $NR^5SO_2R^6$, $NR^5SO_2NR^6R^7$, $B(OR^5)(OR^6)$, $P(O)(OR^5)(OR^6)$ a $P(O)(R^5)(OR^6)$;

každý R^{2*} je nezávisle zvolen ze skupiny sestávající z vodíku, halogenu, alkylu, substituovaného alkylu, arylu, substituovaného arylu, arylalkylu, substituovaného arylalkylu, acylu, substituovaného acylu, heteroalkylu, substituovaného heteroalkylu, heteroarylu, substituovaného heteroarylu, heteroarylalkylu, substituovaného heteroarylalkylu, CN , NO_2 , OR^6 , $S(O)_6R^6$, NR^6R^7 , $CONR^6R^7$, CO_2R^6 , $NR^6CO_2R^7$, $NR^6CONR^7R^8$, $NR^6CSNR^7R^8$, $NR^6C(=NH)NR^7R^8$, $SO_2NR^5R^6$, $NR^5SO_2R^6$, $NR^5SO_2NR^6R^7$, $B(OR^5)(OR^6)$ a $P(O)(OR^5)(OR^6)$;

každý R^{3*} je nezávisle zvolen ze skupiny sestávající z vodíku, halogenu, alkylu, substituovaného alkylu, arylu, substituovaného arylu, arylalkylu, substituovaného arylalkylu, acylu, substituovaného acylu, heteroalkylu, substituovaného heteroalkylu, heteroarylu, substituovaného heteroarylu, heteroarylalkylu, substituovaného heteroarylalkylu, CN , NO_2 , OR^6 , $S(O)_6R^6$, NR^6R^7 , $CONR^6R^7$, CO_2R^6 , $NR^6CO_2R^7$, $NR^6CONR^7R^8$, $NR^6CSNR^7R^8$, $NR^6C(=NH)NR^7R^8$, $SO_2NR^5R^6$, $NR^5SO_2R^6$, $NR^5SO_2NR^6R^7$, $B(OR^5)(OR^6)$, $P(O)(OR^5)(OR^6)$ a $P(O)(R^5)(OR^6)$;

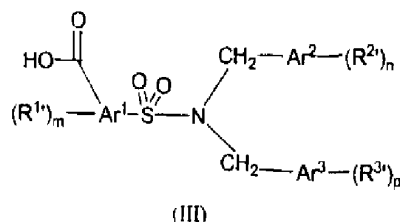
nebo alternativně, X a/nebo alespoň jeden R^{1*} spolu s atomy, na něž jsou vázány, tvoří arylový, substituovaný arylový, heteroarylový, substituovaný heteroarylový, cykloalkylový, substituovaný cykloalkylový, cykloheteroalkylový nebo substituovaný cykloheteroalkylový kruh, který je případně zkondenzovaný s dalším arylovým, substituovaným arylovým, heteroarylovým, substituovaným heteroarylovým, cykloalkylovým, substituovaným cykloalkylovým, cykloheteroalkylovým nebo substituovaným cykloheteroalkylovým kruhem;

R^4 - R^8 jsou nezávisle vodík, alkyl, substituovaný alkyl, aryl, substituovaný aryl, arylalkyl, substituovaný arylalkyl, heteroalkyl, substituovaný heteroalkyl, heteroaryl, substituovaný heteroaryl, heteroarylalkyl nebo substituovaný heteroarylalkyl nebo

alternativně R^5 a R^6 , R^6 a R^7 , R^7 a R^8 , spolu s atomy, na něž jsou vázány, tvoří cykloheteroalkylový nebo substituovaný cykloheteroalkylový kruh;

b je 0, 1 nebo 2.

36. Sloučenina podle nároku 35, kde X je vybráno ze skupiny sestávající z vodíku, heteroalkylu, substituovaného heteroalkylu, heteroarylu, substituovaného heteroarylu, heteroarylalkylu, substituovaného heteroarylalkylu, CN, $S(O)_bR^6$, $CONR^6R^7$, $-CO_2R^6$, $SO_2NR^5R^6$, $NR^5SO_2R^6$, $NR^5SO_2NR^6R^7$, $B(OR^5)(OR^6)$, $P(O)(OR^5)(OR^6)$ a $P(O)(R^5)(OR^6)$.
37. Sloučenina strukturního vzorce III níže:



nebo její sůl, hydrát, solvát nebo N-oxid, kde:

Ar^1 , Ar^2 a Ar^3 jsou nezávisle pěti- nebo šestičlenný arylový, heteroarylový nebo cykloalkylový kruh a Ar^2 a Ar^3 mohou být případně vynechány;

m je 0, 1, 2 nebo 3;

n a p jsou nezávisle 0, 1, 2, 3 nebo 4;

každý R^1 je nezávisle vybrán ze skupiny sestávající z vodíku, halogenu, alkylu, substituovaného alkylu, arylu, substituovaného arylu, arylalkylu, substituovaného arylalkylu, acylu, substituovaného acylu, heteroalkylu, substituovaného heteroalkylu, heteroarylu, substituovaného heteroarylu, heteroarylalkylu, substituovaného heteroarylalkylu, CN, NO_2 , OR^6 , $\text{S(O)}_b\text{R}^6$, NR^6R^7 , CONR^6R^7 , CO_2R^6 , $\text{NR}^6\text{CO}_2\text{R}^7$, $\text{NR}^6\text{CONR}^7\text{R}^8$, $\text{NR}^6\text{CSNR}^7\text{R}^8$, $\text{NR}^6\text{C(=NH)NR}^7\text{R}^8$, $\text{SO}_2\text{NR}^5\text{R}^6$, $\text{NR}^5\text{SO}_2\text{R}^6$, $\text{NR}^5\text{SO}_2\text{NR}^6\text{R}^7$, $\text{B(OR}^5)(\text{OR}^6)$, $\text{P(O)(OR}^5)(\text{OR}^6)$ a $\text{P(O)(R}^5)(\text{OR}^6)$;

každý R^3 je nezávisle zvolen ze skupiny sestávající z vodíku, halogenu, alkylu, substituovaného alkylu, arylu, substituovaného arylu, arylalkylu, substituovaného

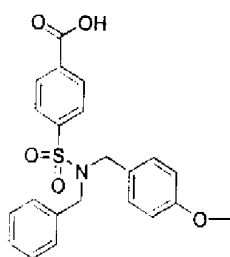
arylalkylu, acylu, substituovaného acylu, heteroalkylu, substituovaného heteroalkylu, heteroarylu, substituovaného heteroarylu, heteroarylalkylu, substituovaného heteroarylalkylu, CN, NO₂, OR⁶, S(O)_bR⁶, NR⁶R⁷, CONR⁶R⁷, CO₂R⁶, NR⁶CO₂R⁷, NR⁶CONR⁷R⁸, NR⁶CSNR⁷R⁸, NR⁶C(=NH)NR⁷R⁸, SO₂NR⁵R⁶, NR⁵SO₂R⁶, NR⁵SO₂NR⁶R⁷, B(OR⁵)(OR⁶), P(O)(OR⁵)(OR⁶) a P(O)(R⁵)(OR⁶);

každý R³ je nezávisle zvolen ze skupiny sestávající z vodíku, halogenu, alkylu, substituovaného alkylu, arylu, substituovaného arylu, aarylalkylu, substituovaného aarylalkylu, acylu, substituovaného acylu, heteroalkylu, substituovaného heteroalkylu, heteroarylu, substituovaného heteroarylu, heteroarylalkylu, substituovaného heteroarylalkylu, CN, NO₂, OR⁶, S(O)_bR⁶, NR⁶R⁷, CONR⁶R⁷, CO₂R⁶, NR⁶CO₂R⁷, NR⁶CONR⁷R⁸, NR⁶CSNR⁷R⁸, NR⁶C(=NH)NR⁷R⁸, SO₂NR⁵R⁶, NR⁵SO₂R⁶, NR⁵SO₂NR⁶R⁷, B(OR⁵)(OR⁶), P(O)(OR⁵)(OR⁶) a P(O)(R⁵)(OR⁶);

R⁵R⁸ jsou nezávisle vodík, alkyl, substituovaný alkyl, aryl, substituovaný aryl, aarylalkyl, substituovaný aarylalkyl, heteroalkyl, substituovaný heteroalkyl, heteroaryl, substituovaný heteroaryl, heteroarylalkyl nebo substituovaný heteroarylalkyl nebo alternativně R⁵ a R⁶, R⁶ a R⁷, R⁷ a R⁸, spolu s atomy, na něž jsou vázány, tvoří cykloheteroalkylový nebo substituovaný cykloheteroalkylový kruh;

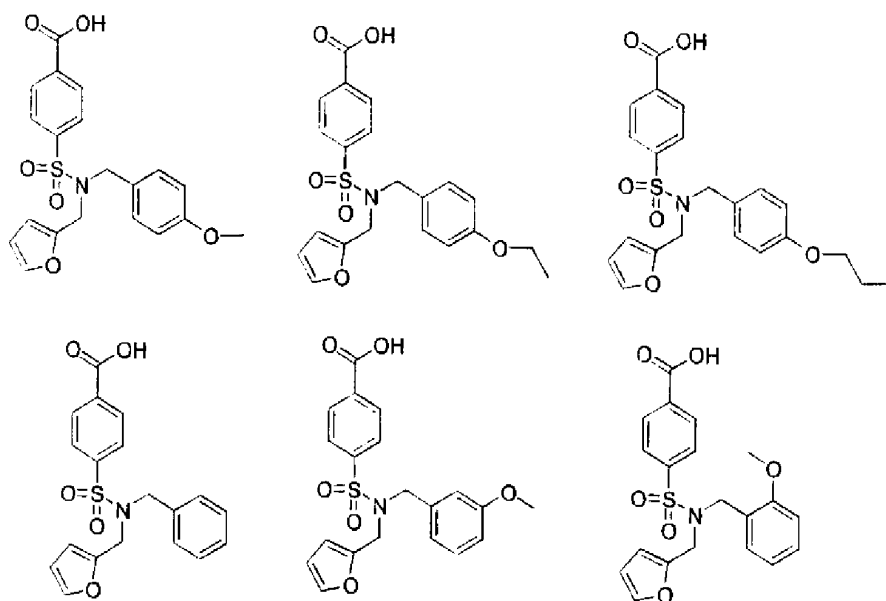
b je 0, 1 nebo 2.

38. Sloučenina mající následující strukturu:



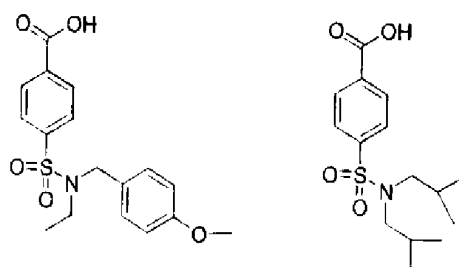
nebo její sůl, hydrát, solvát nebo N-oxid.

39. Sloučenina mající následující strukturu:



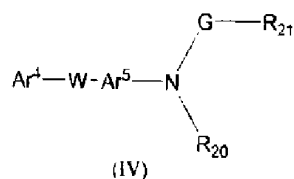
nebo její sůl, hydrát, solvát nebo N-oxid.

40. Sloučenina mající následující strukturu:



nebo její sůl, hydrát, solvát nebo N-oxid.

41. Sloučenina strukturního vzorce IV níže:



nebo její sůl, hydrát, solvát nebo N-oxid, kde:

Ar^4 a Ar^5 jsou nezávisle pěti- nebo šestičlenný arylový nebo heteroarylový kruh;

W je vybrán ze skupiny sestávající z CR^6R^7 , $\text{C}=\text{O}$, $\text{C}=\text{S}$, $\text{C}=\text{NOR}^6$, O , NR^6 , S , SO , SO_2 a $(\text{CH}_2)_n$;

n je 0, 1, 2 nebo 3;

G je vybrán ze skupiny sestávající z CR^6R^7 , $\text{C}=\text{O}$, $\text{C}=\text{S}$, $\text{C}=\text{NOR}^6$ a $\text{S}(\text{O})_b$;

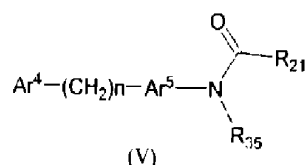
R^{20} je vybrán ze skupiny sestávající z vodíku, arylalkenylu, heteroarylalkenylu, arylalkylu, heteroarylalkylu, arylu, heteroarylu, alkylu, alkoxy-alkylu, alkenylu, cykloalkylu, cykloalkenylu a substituovaných derivátů;

R^{21} je vybrán ze skupiny sestávající z arylalkenylu, heteroarylalkenylu, arylalkylu, heteroarylalkylu, arylu, heteroarylu, alkylu, alkoxy-alkylu, alkenylu, cykloalkylu, cykloalkenylu a substituovaných derivátů;

R^6 a R^7 jsou nezávisle vybrány ze skupiny sestávající z vodíku, alkylu, substituovaného alkylu, arylu, substituovaného arylu, arylalkylu, substituovaného arylalkylu, heteroalkylu, substituovaného heteroalkylu, heteroarylu, substituovaného heteroarylu, heteroarylalkylu nebo substituovaného heteroarylalkylu nebo alternativně R^6 a R^7 , R^7 a R^8 , spolu s atomy, na něž jsou navázány, tvoří cykloheteroalkylový nebo substituovaný cykloheteroalkylový kruh; a

b je 0, 1 nebo 2.

42. Sloučenina strukturního vzorce V níže:



nebo její sůl, hydrát, solvát nebo N-oxid, kde:

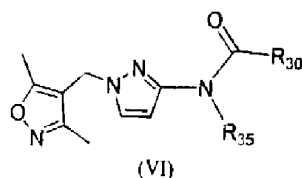
Ar^4 a Ar^5 jsou nezávisle pěti- nebo šestičlenný arylový nebo heteroarylový kruh;

n je 0, 1, 2 nebo 3;

R^{21} je vybrán ze skupiny sestávající z arylalkenylu, heteroarylalkenylu, arylalkylu, heteroarylalkylu, arylu, heteroarylu, alkylu, alkoxy-alkylu, alkenylu, cykloalkylu, cykloalkenylu a substituovaných derivátů;

R^{35} je vybrán ze skupiny sestávající z vodíku, alkylu a substituovaného alkylu.

43. Sloučenina strukturního vzorce VI níže:

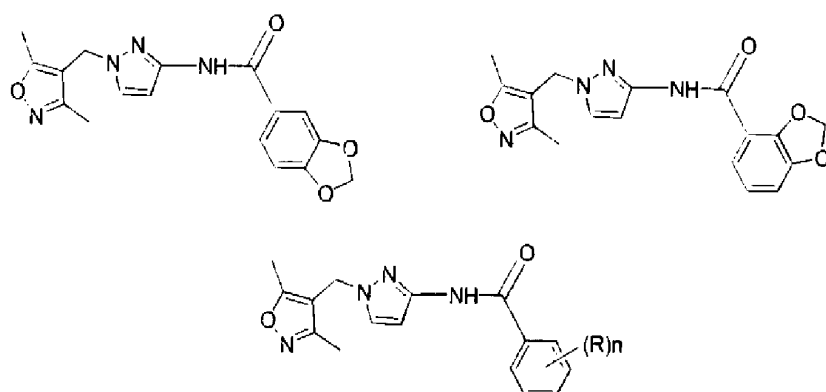


nebo její sůl, hydrát, solvát nebo N-oxid, kde:

R^{30} je vybrán ze skupiny sestávající z arylalkenylu, heteroarylalkenylu, arylalkylu, heteroarylalkylu, arylu, heteroarylu, alkylu, alkoxy-alkylu, alkenylu, cykloalkylu, cykloalkenylu a substituovaných derivátů;

R^{35} je vybrán ze skupiny sestávající z vodíku, alkylu a substituovaného alkylu.

44. Sloučeniny mající následující strukturu:

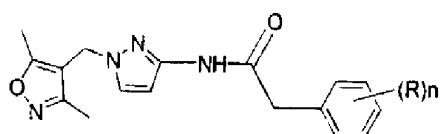


nebo jejich sůl, hydrát, solvát nebo N-oxid,

kde každý R je nezávisle Cl, MeO, CN, EtO, OH, Me, $-\text{SO}_2\text{Me}$, F, H a

n je 0, 1, 2, 3 nebo 4.

45. Sloučenina mající následující strukturu:

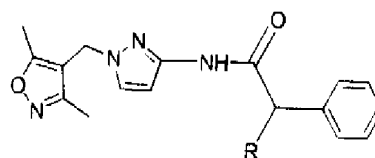
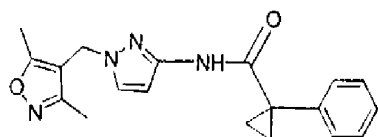
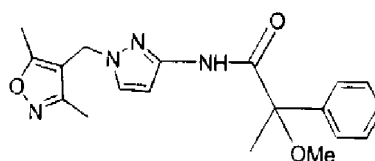
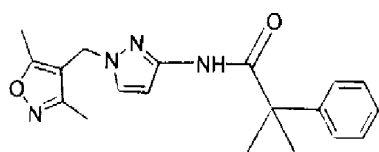


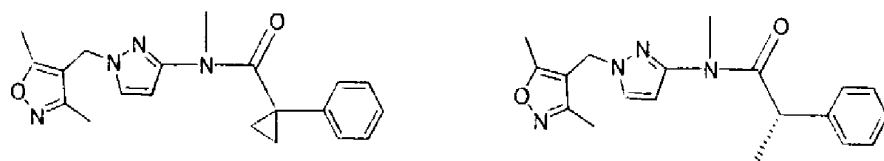
nebo její sůl, hydrát, solvát nebo N-oxid,

kde každý R je nezávisle MeO, OH, a

n je 0, 1, 2, 3 nebo 4.

46. Sloučenina mající následující strukturu:

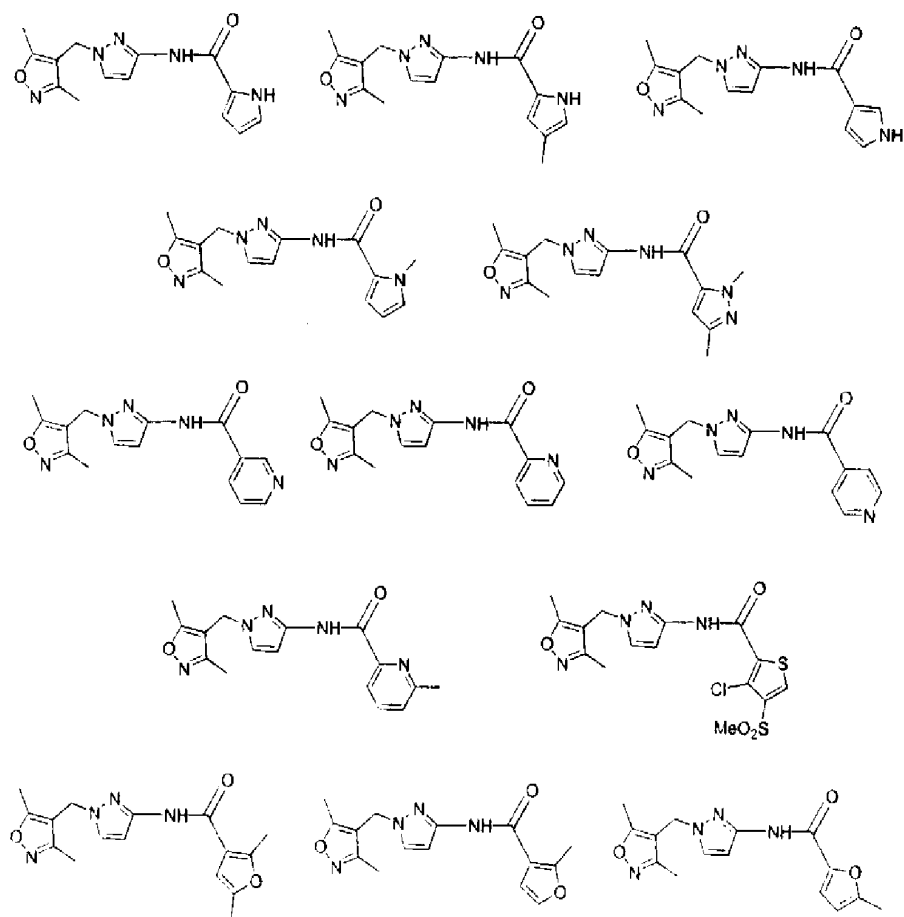




nebo její sůl, hydrát, solvát nebo N-oxid,

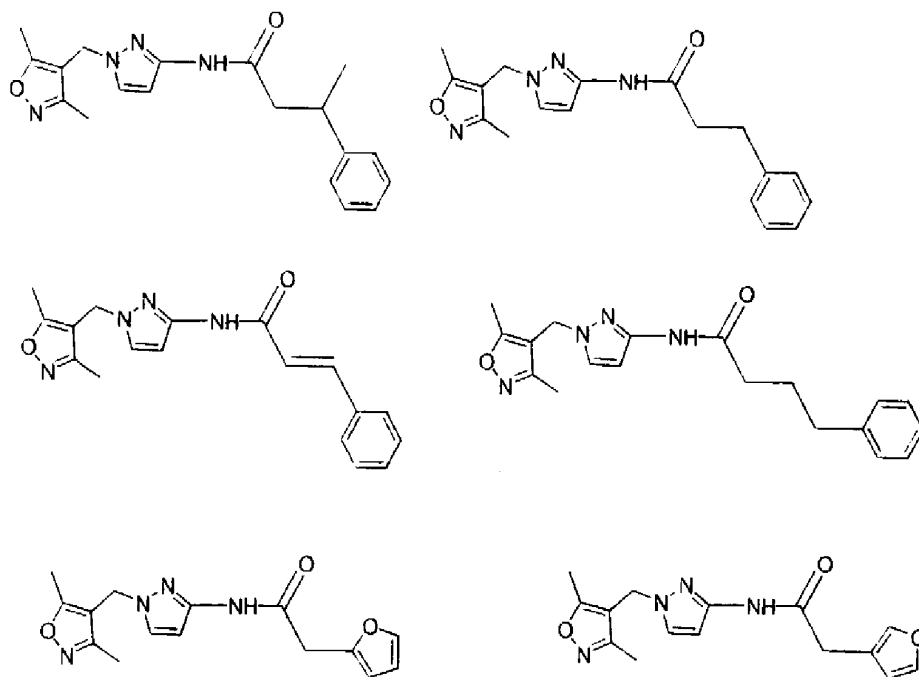
kde R je vybrán ze skupiny sestávající z H, Me, Et, OCOMe, CH₂OH, OMe, a Ph.

47. Sloučenina mající následující strukturu:



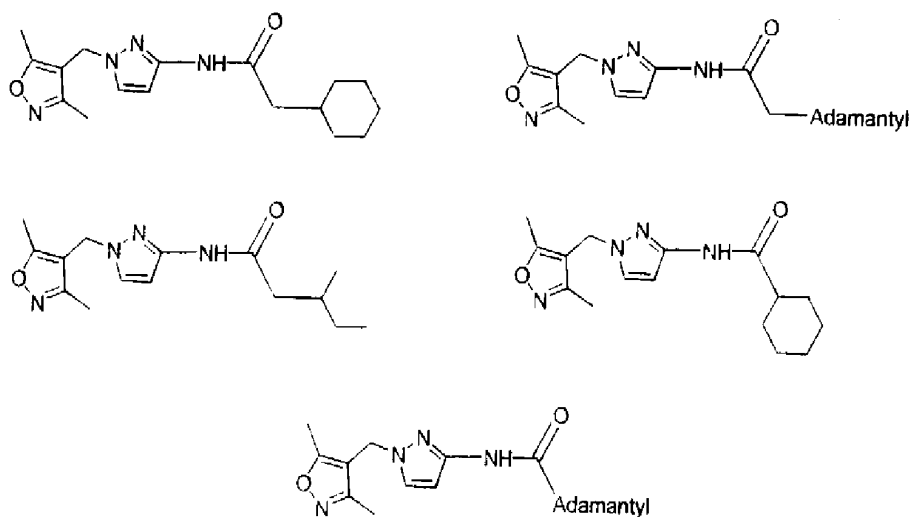
nebo její sůl, hydrát, solvát nebo N-oxid.

48. Sloučenina mající následující strukturu:



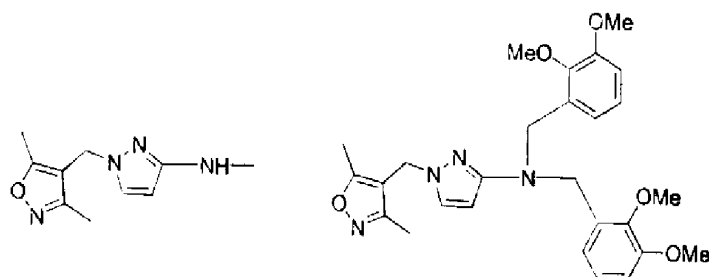
nebo její sůl, hydrát, solvát nebo N-oxid.

49. Sloučenina mající následující strukturu:



nebo její sůl, hydrát, solvát nebo N-oxid.

50. Sloučenina mající následující strukturu :



nebo její sůl, hydrát, solvát nebo N-oxid.

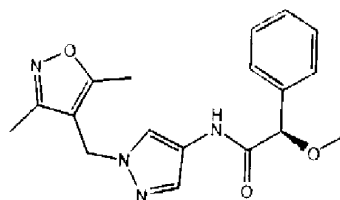
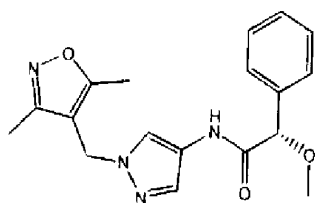
51. Způsob snížení nebo zeslabení hořké chuti zahrnující přidání sloučeniny podle nároku 34 nebo jejího analogu ke kompozici pro požití lidmi nebo zvířaty, kde má být snížena nebo zeslabena hořká chuť.
52. Způsob podle nároku 51, kde kompozicí je potravina, nápoj nebo léčivo.
53. Způsob podle nároku 51, kde kompozice obsahuje hořké sloučeniny, které aktivují jeden nebo více z hT2R3, 7, 10, 14, 16, 44, 51, 55, 61, 63, 65, 71 a/nebo hT2R5, 9, 13, 54, 67 a 75.
54. Způsob podle nároku 51, kde kompozice obsahuje alespoň jednu hořkou sloučeninu, která aktivuje četné receptory hořkosti nebo která má neurčitou specifitu k receptoru hořkosti.
55. Způsob podle nároku 51, kde kompozice obsahuje salicin nebo derivát.
56. Způsob podle nároku 51, kde kompozice obsahuje omeprazol nebo derivát.
57. Způsob podle nároku 51, kde kompozice obsahuje rebaudiosid A nebo derivát.
58. Způsob podle nároku 51, kde kompozice obsahuje dextromethorfan.
59. Způsob podle nároku 51, kde kompozice obsahuje difenhydramin.

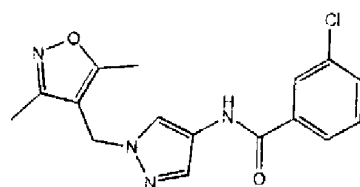
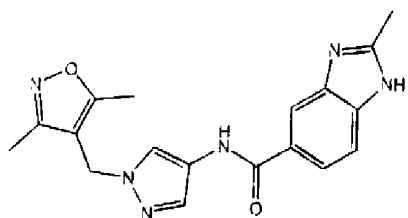
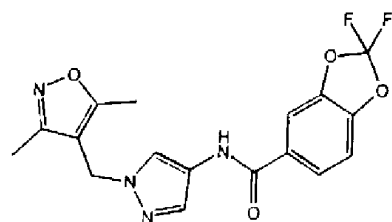
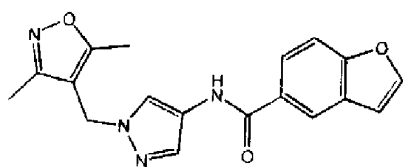
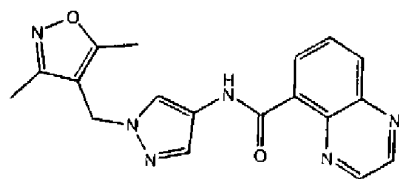
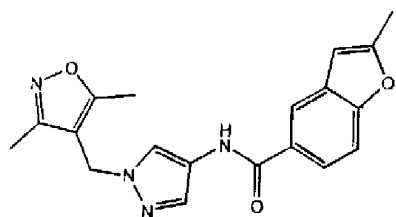
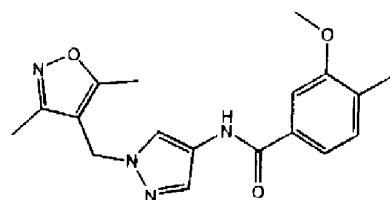
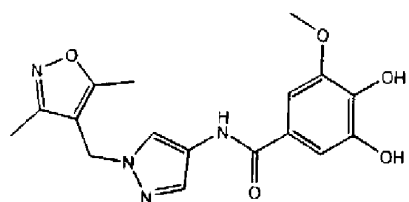
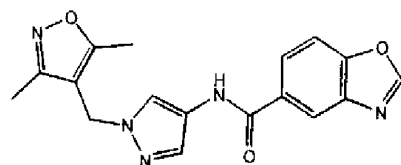
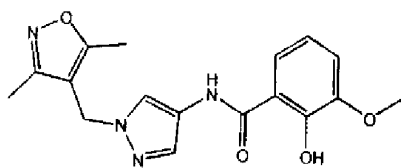
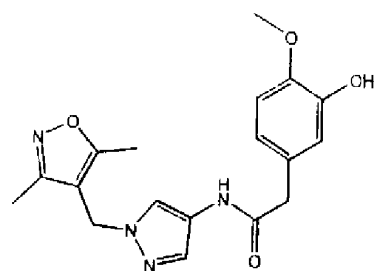
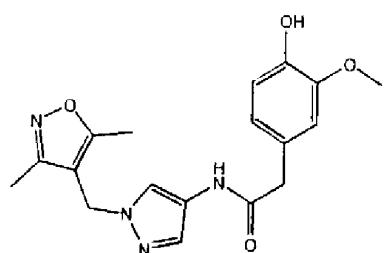
60. Způsob podle nároku 51, kde kompozicí je potravina, nápoj nebo léčivo pro lidskou spotřebu.
61. Způsob zeslabení hořké chuti spojené s kávou nebo s potravinami, nápoji nebo léčivy s příchutí kávy, zahrnující přidání alespoň jedné sloučeniny podle jednoho z nároků 33 až 50.
62. Způsob podle nároku 61, kde káva nebo potravina, nápoj nebo léčivo s příchutí kávy obsahuje alespoň 2 sloučeniny, z nichž alespoň jedna je antagonistou hT2R8 a alespoň jedna je antagonistou hT2R14.
63. Způsob podle nároku 61, kde kávou je instantní káva nebo vařená káva.
64. Kompozice kávy nebo potraviny, nápoje nebo léčiva s příchutí kávy, která obsahuje alespoň jednu sloučeninu vybranou ze sloučenin podle jednoho z nároků 33 až 50.
65. Kompozice podle nároku 64, která obsahuje alespoň 2 sloučeniny, z nichž alespoň jedna je antagonistou hT2R8 a alespoň jedna je antagonistou hT2R14.
66. Kompozice podle nároku 65, kde kávou je instantní káva, mletá káva nebo vařená káva.
67. Kompozice podle nároku 65, kterou je instantní káva.
68. Kompozice potraviny nebo nápoje nebo léčiva, která obsahuje alespoň jednu sloučeninu vybranou ze sloučenin podle jednoho z nároků 33 až 50.
69. Kompozice potraviny nebo nápoje nebo léčiva, která obsahuje sloučeninu podle nároku 34.
70. Potravina, nápoj nebo léčivo podle nároku 68, která obsahuje alespoň 2 sloučeniny, z nichž alespoň jedna je antagonistou hT2R8 a alespoň jedna je antagonistou hT2R14.

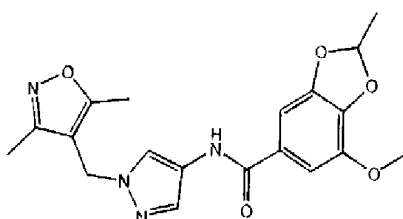
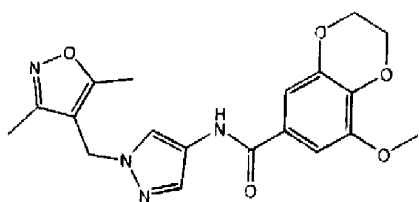
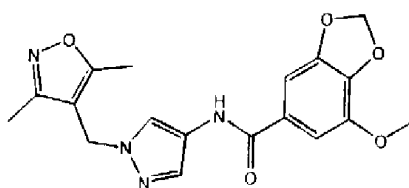
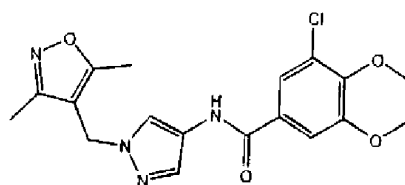
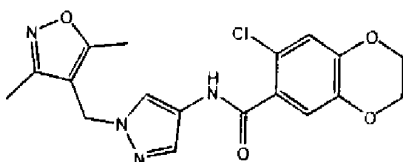
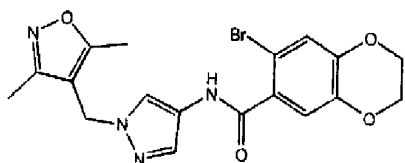
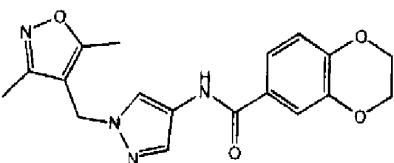
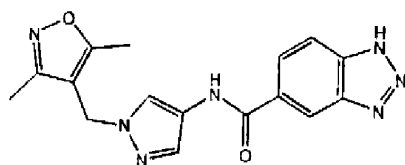
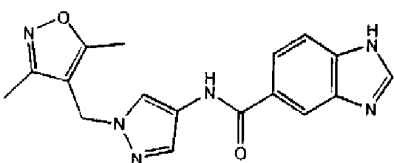
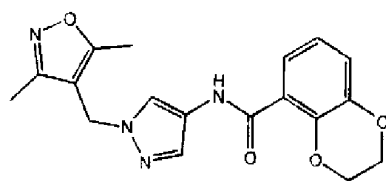
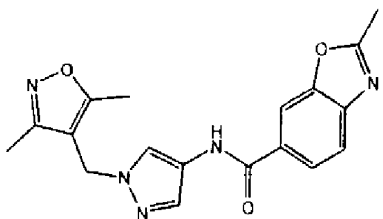
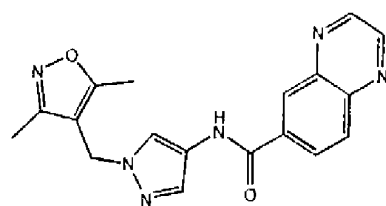
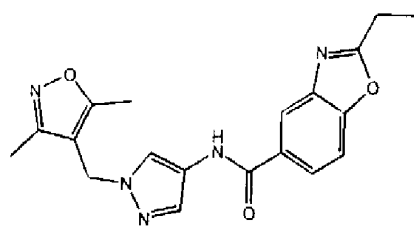
71. Způsob detekce nebo kvantitativní analýzy hořké sloučeniny v kompozici, zahrnující:
kontaktování kompozice obsahující lidský receptor hořké chuti, kterým je hT2R8, hT2R14, nebo oba, a
detekci navázání sloučeniny na receptor, kde toto navázání značí, že sloučenina přispívá k hořké chuti kompozice.
72. Způsob podle nároku 71, kde rozsah navázání udává koncentraci sloučeniny v kompozici.
73. Způsob testu pro detekci nebo kvantitativní analýzu, zda je hořká chuť hořké sloučeniny v kompozici blokována antagonistickou sloučeninou podle nároku 34, zahrnující:
kontaktování kompozice obsahující alespoň jednu hořkou sloučeninu, která aktivuje alespoň jeden lidský receptor hořké chuti vybraný ze skupiny sestávající z hT23, 7, 10, 14, 16, 44, 51, 55, 61, 63, 64, 65 nebo 71 a/nebo hT2R5, 9, 13, 54, 67 a 75 a
detekci, zda je aktivace tohoto alespoň jednoho receptoru blokována nebo inhibována sloučeninou podle nároku 38, přičemž blokování nebo inhibice zeslabuje hořkost této alespoň jedné hořké sloučeniny.
74. Test podle nároku 73, který dále obsahuje test chuti, kde jsou hořká sloučenina a antagonistická sloučenina ochutnávány odděleně a v kombinaci za účelem potvrzení, že hořká chuť je antagonistou zeslabena.
75. Test podle nároku 73, kde chuťový receptor je exprimován na buněčné membráně.
76. Test podle nároku 73, kde chuťový receptor je exprimován na izolované buněčné membráně.
77. Test podle nároku 73, kde chuťový receptor je exprimován na intaktní buňce.
78. Test podle nároku 73, kde chuťový receptor je exprimován na eukaryotické buňce.

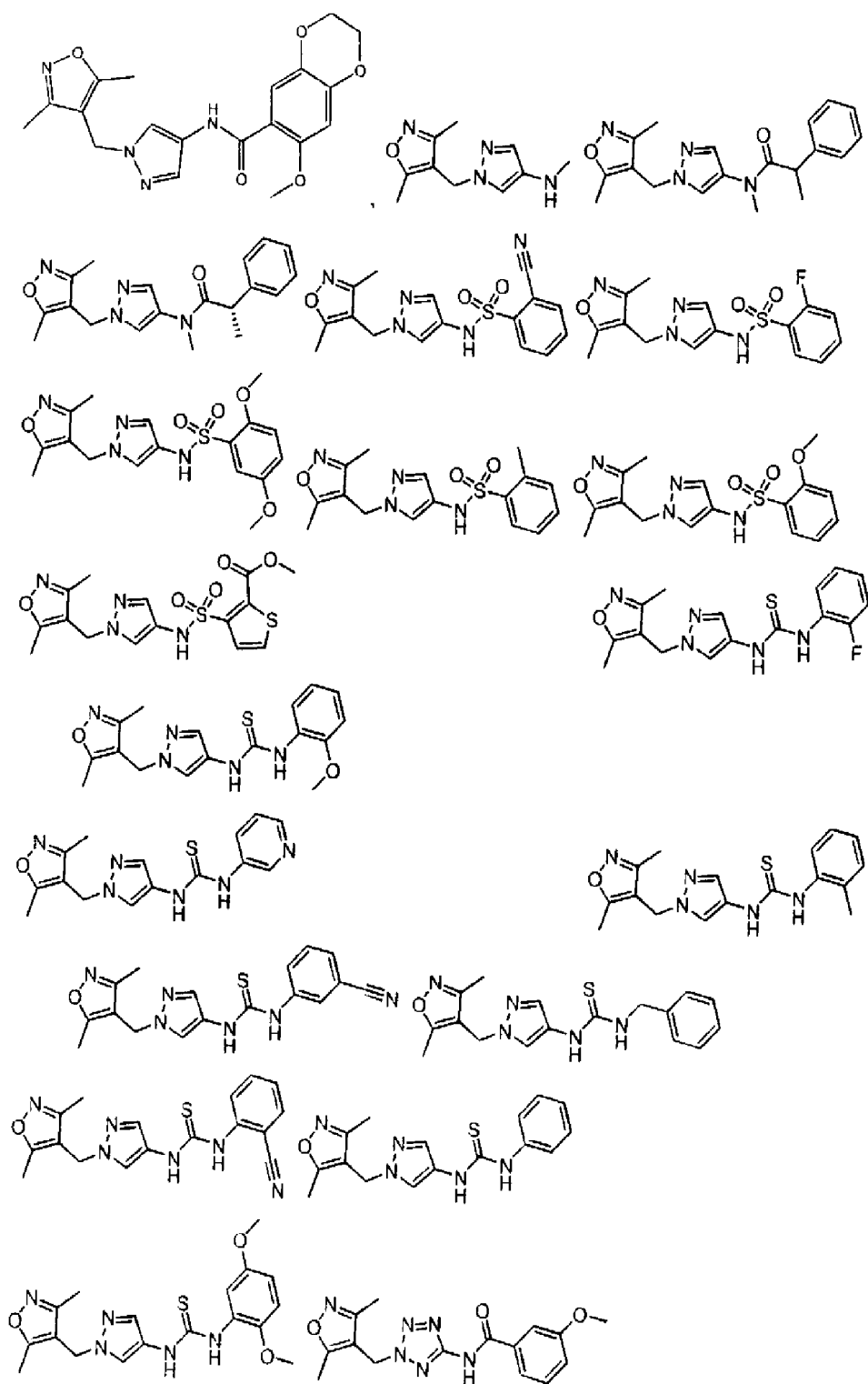
79. Test podle nároku 73, kde chuťový receptor je exprimován buňkou obojživelníka, savce nebo hmyzu.
80. Test podle nároku 73, kde chuťový receptor je exprimován na buňce vybrané z HEK293, BHK, COS, HEK293T, CHO a oocyty z *Xenopus*.
81. Test podle nároku 73, kterým je fluorimetrický test.
82. Test podle nároku 73, kterým je vazební test.
83. Test podle nároku 73, který detekuje účinek sloučeniny testováním jejího účinku na intracelulární koncentraci iontů.
84. Test podle nároku 73, který detekuje účinek sloučeniny na intracelulární sodík nebo vápník.
85. Test podle nároku 73, který detekuje účinek sloučeniny na membránový potenciál buňky.
86. Test podle nároku 73, který detekuje účinek sloučeniny na transkripci reportérového genu.
87. Test podle nároku 73, kde sloučenina je vybrána na základě její schopnosti blokovat interakci chuťového receptoru s jedním z hořkých ligandů.
88. Test podle nároku 73, který detekuje účinek sloučeniny na intracelulární cAMP, cGMP nebo IP3.
89. Test podle nároku 73, kde chuťový receptor obsahuje extracelulární doménu nebo transmembránovou oblast chuťového receptoru.
90. Test podle nároku 73, který detekuje změny vápníku za použití kalcium-specifického fluorescenčního barviva.

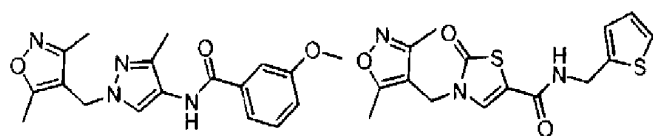
91. Test podle nároku 90, kde barvivem je Fluo-3, Fluo-4, Fura-2 nebo jejich směsi.
92. Test podle nároku 73, kde chuťový receptor je v roztoku.
93. Test podle nároku 73, kterým je vazební test, který detekuje změny spektroskopických vlastností, hydrodynamických vlastností nebo rozpustnosti receptoru.
94. Test podle nároku 73, který detekuje účinek sloučeniny na tvorbu komplexů chuťového receptoru s G proteinem.
95. Test podle nároku 94, kde G proteinem je transducin, gustducin, $G_{\alpha 15}$, $G_{\alpha 16}$ nebo jejich chiméra.
96. Test podle nároku 73, kterým je fluorescenční polarizační test.
97. Test podle nároku 73, kde chuťový receptor je navázán na substrát pevné fáze.
98. Test podle nároku 73, kterým je vysoce výkonný test.
99. Test podle nároku 73, kde chuťový receptor je exprimován buňkou HEK293.
100. Způsob identifikace konzervovaného vazebného motivu přítomného v různých lidských T2R, zahrnující vystavení buněčné membrány buňky sloučenině podle nároku 38.
101. Chimérický GPCR konstruovaný tak, aby obsahoval motiv uvedený v nároku 75.
102. Sloučenina vzorce:





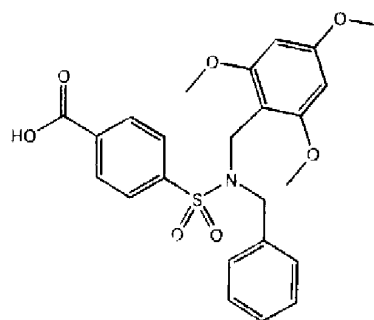
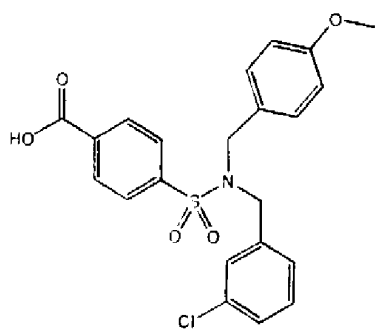
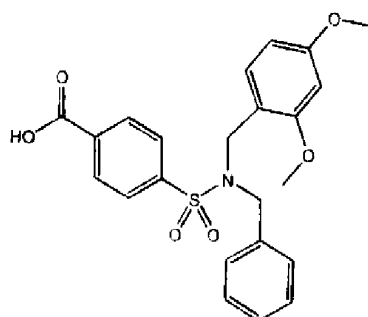
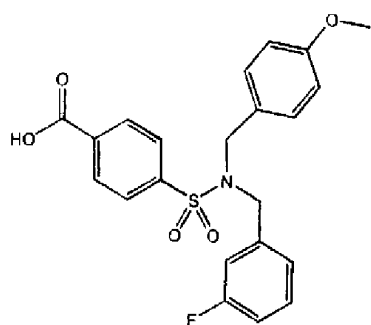
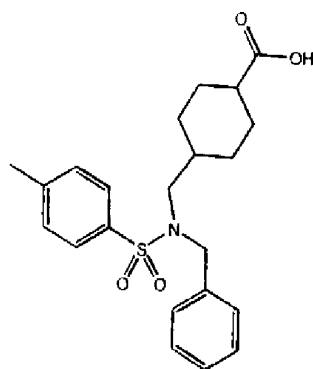
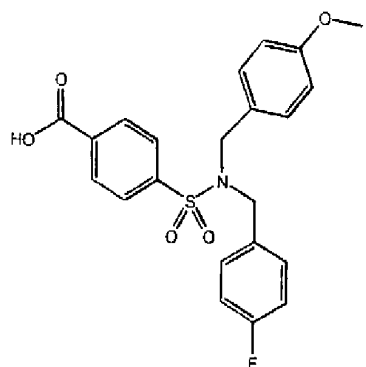


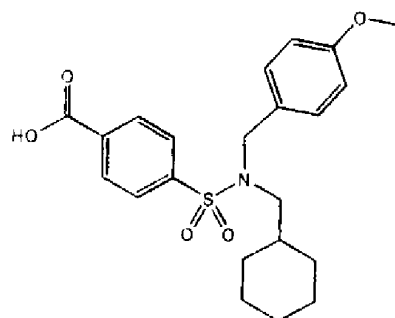
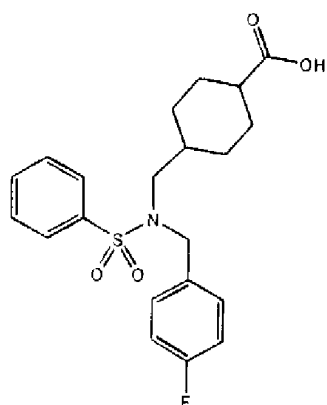
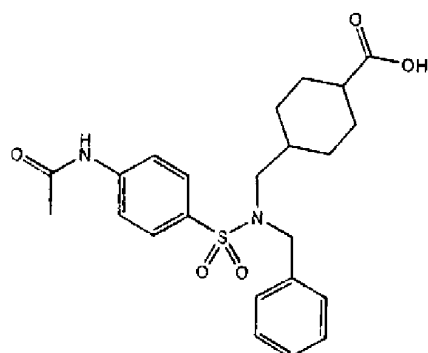
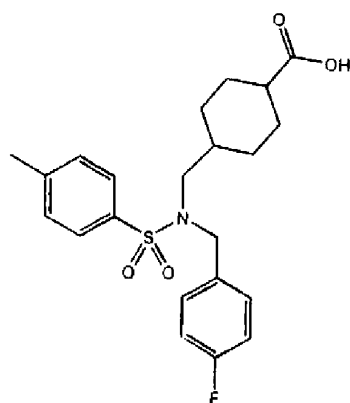
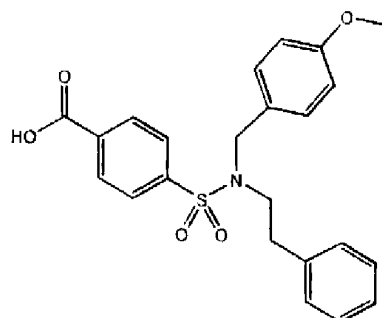
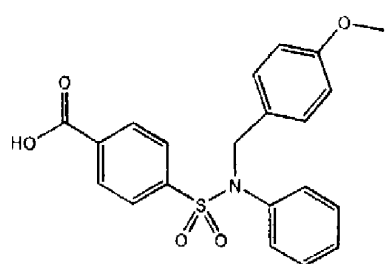
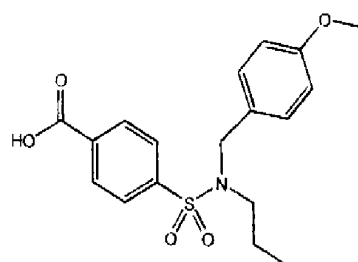
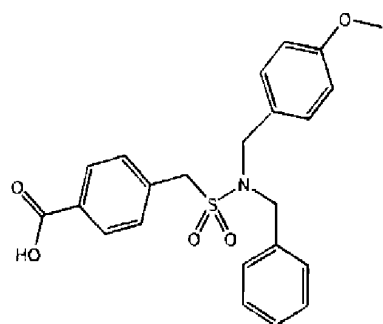


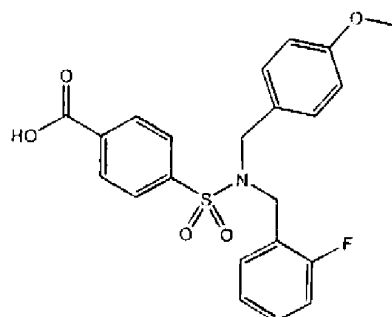
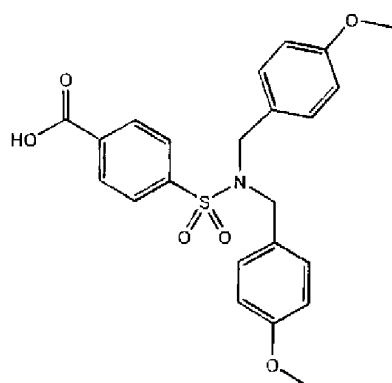
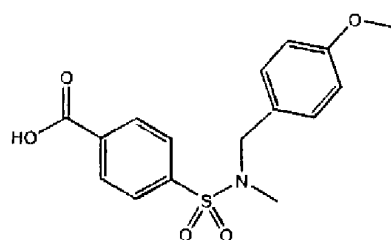
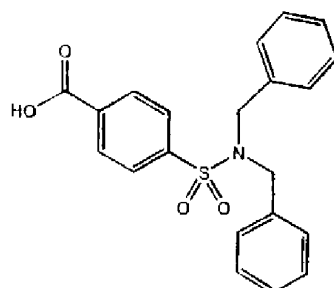
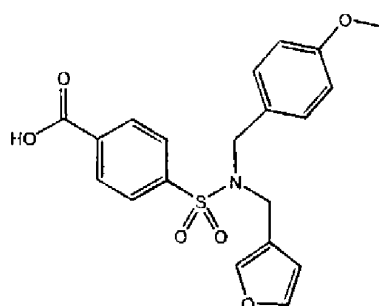
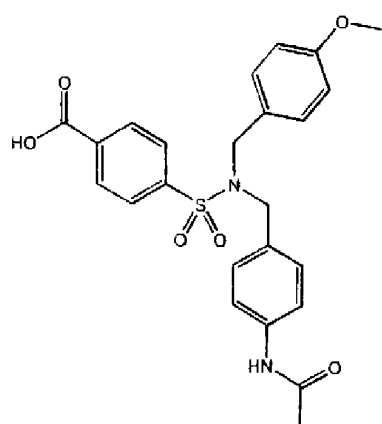
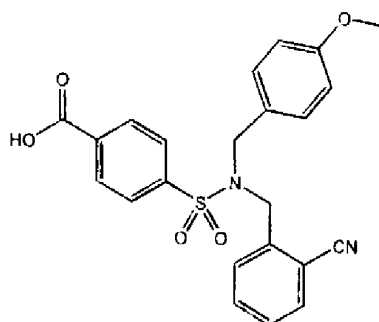
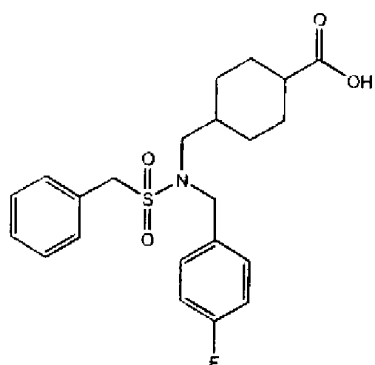


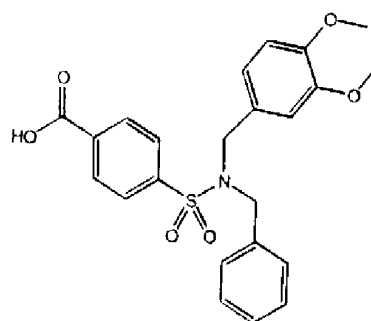
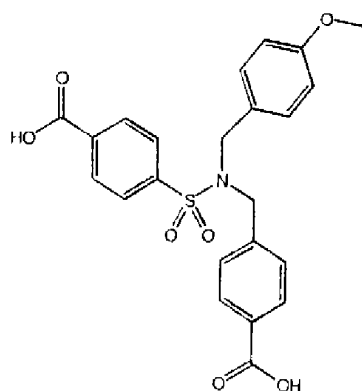
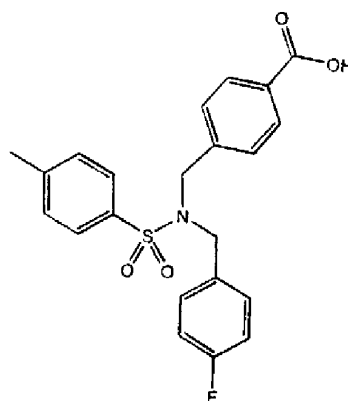
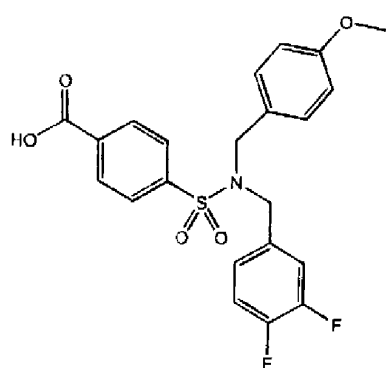
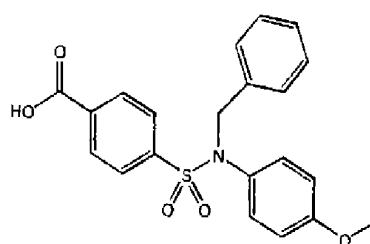
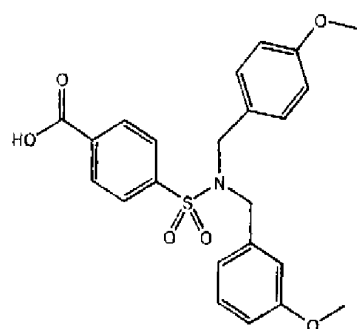
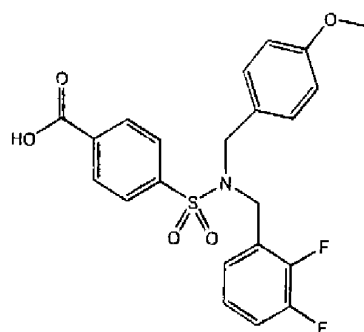
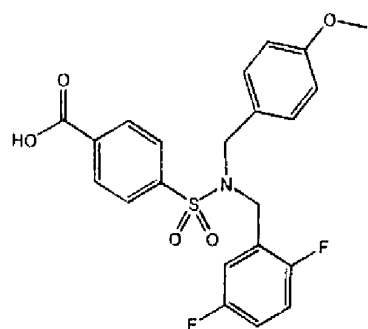
nebo její sůl, hydrát, solvát nebo N-oxid.

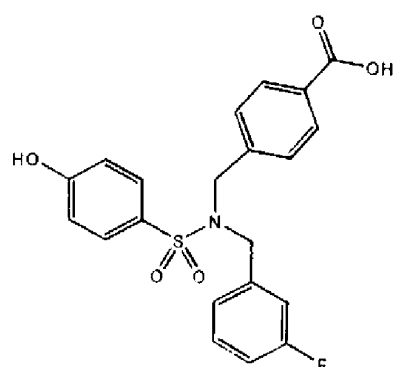
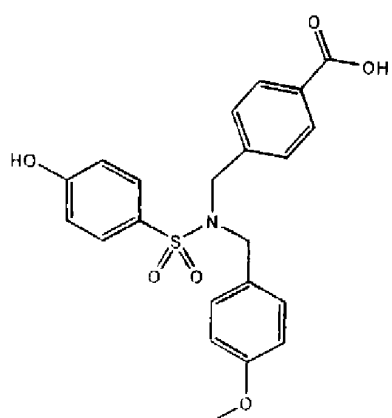
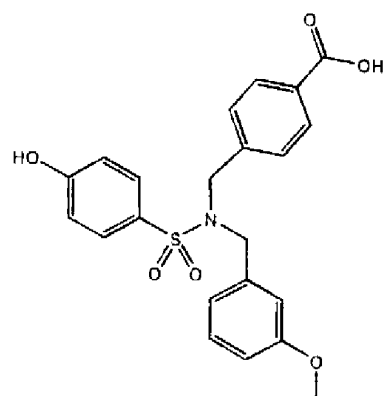
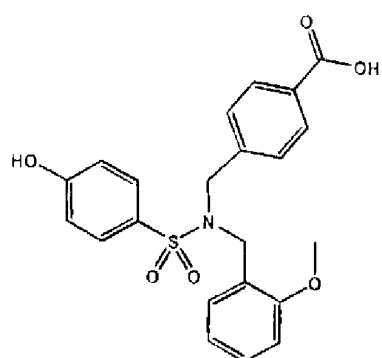
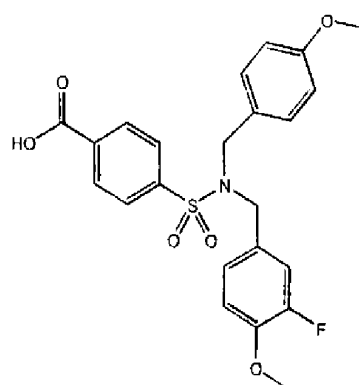
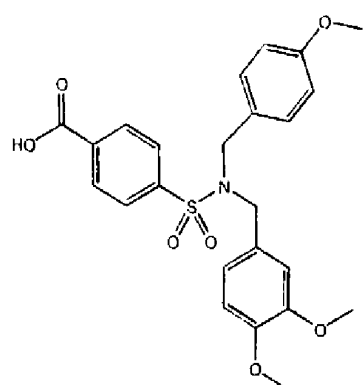
103. Sloučenina vzorce:

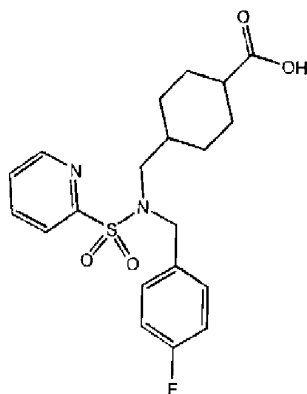
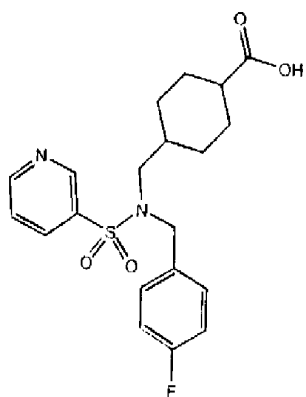
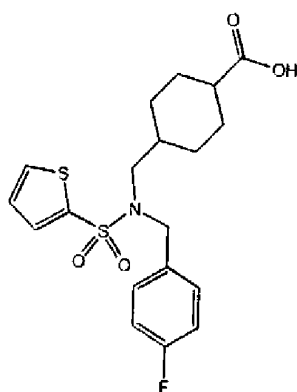
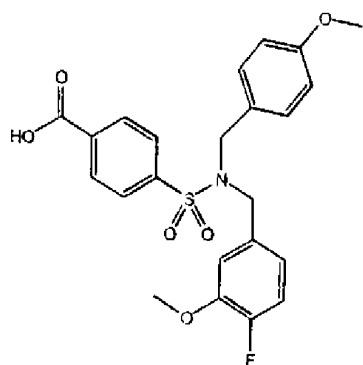
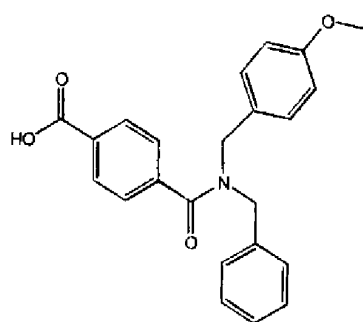
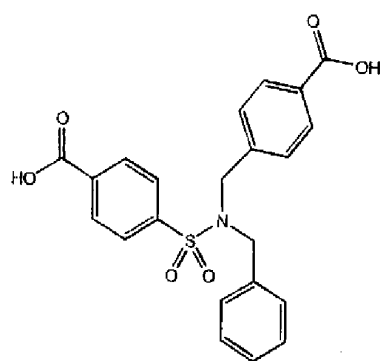
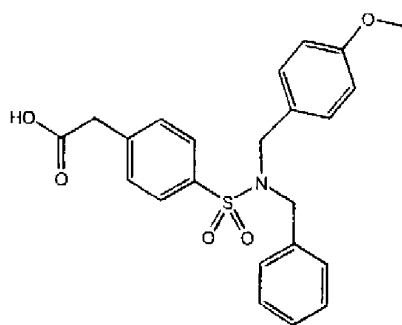
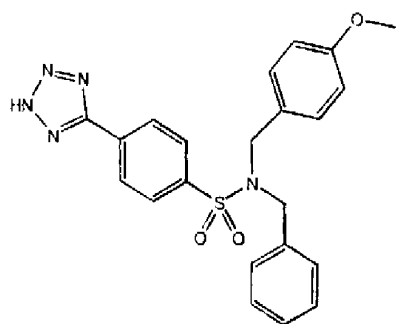


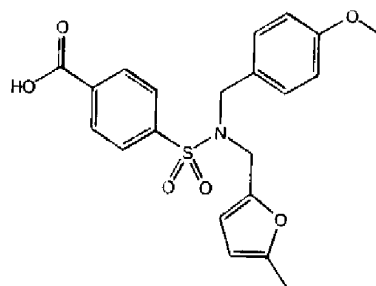
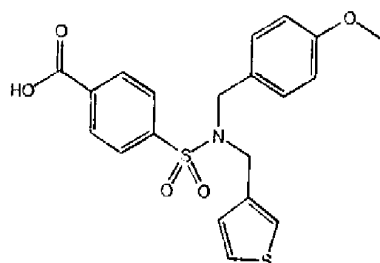
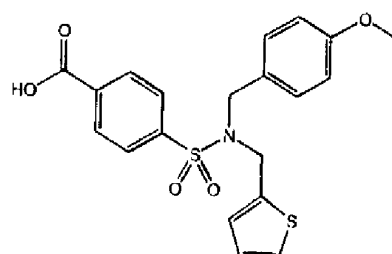
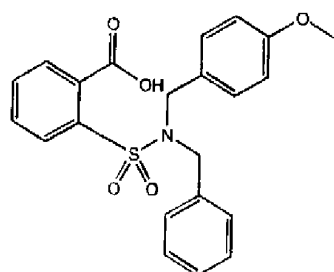
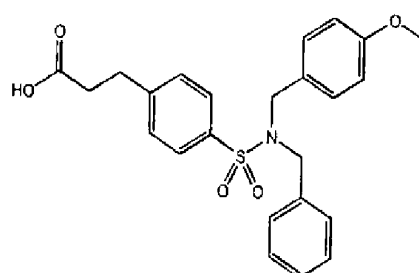
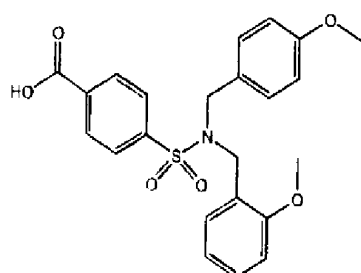
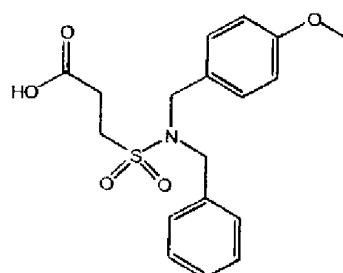
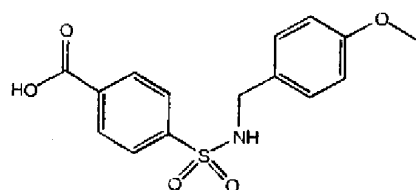
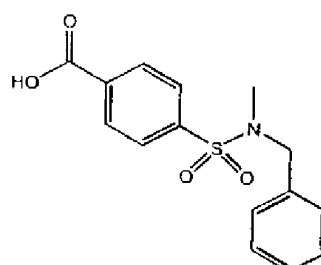
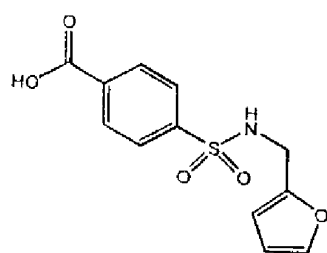


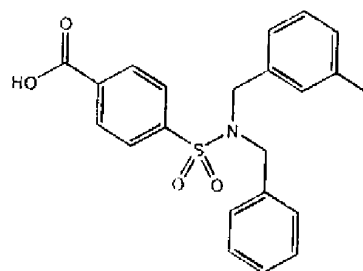
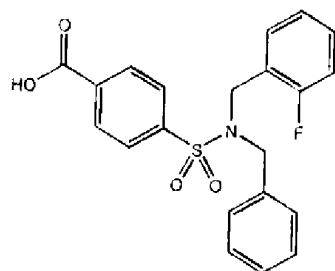
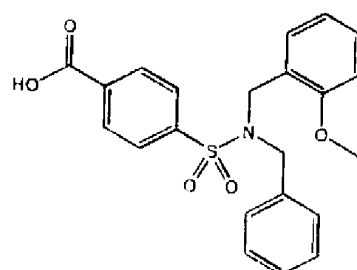
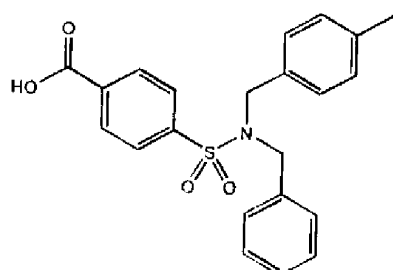
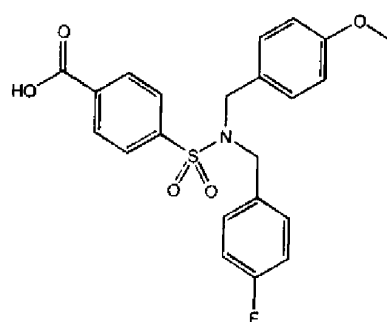
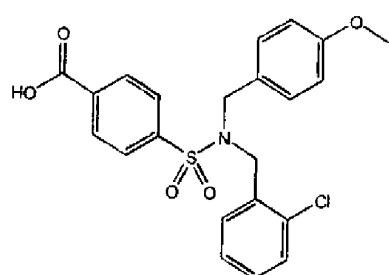
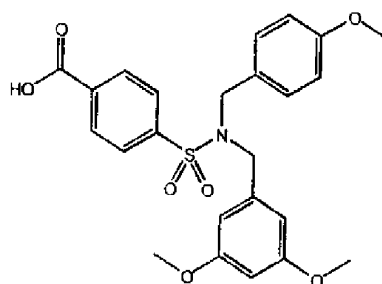
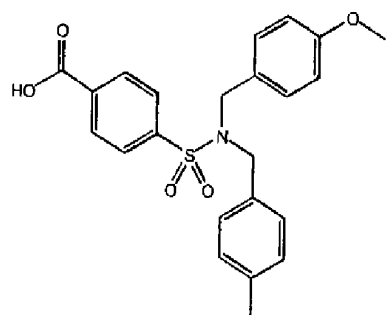
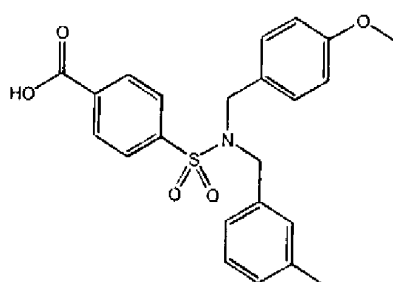
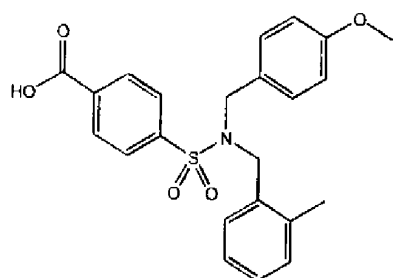


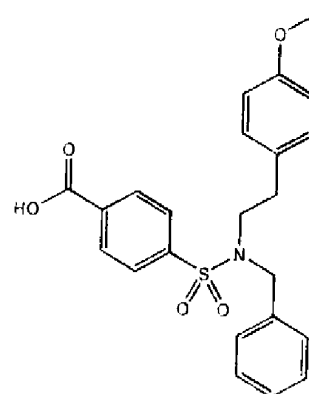
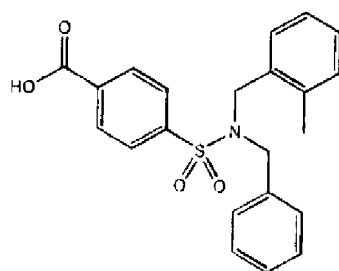
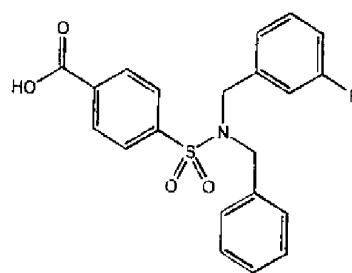
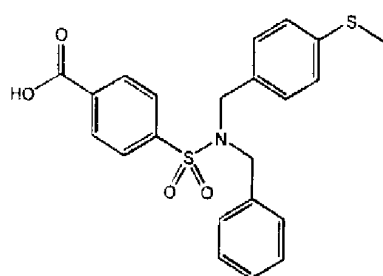
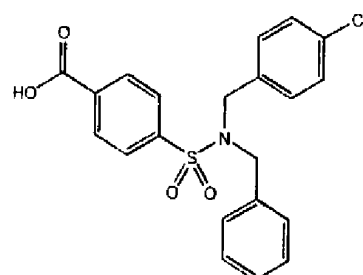
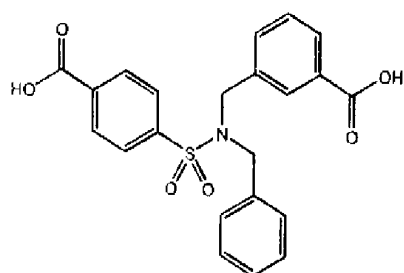
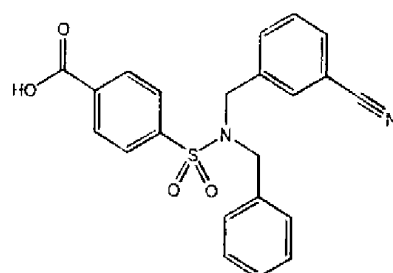
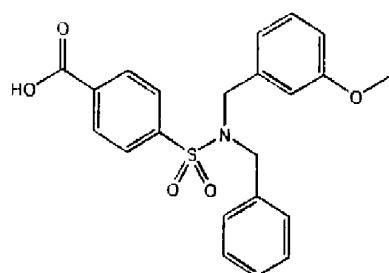


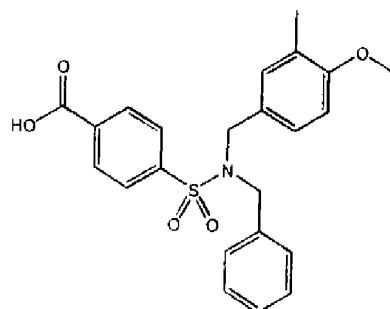
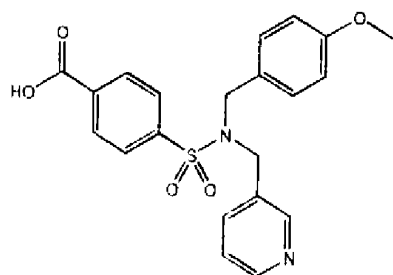
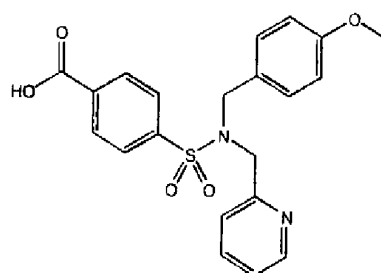
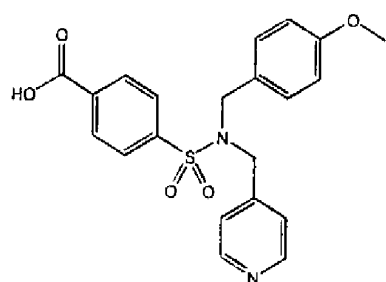
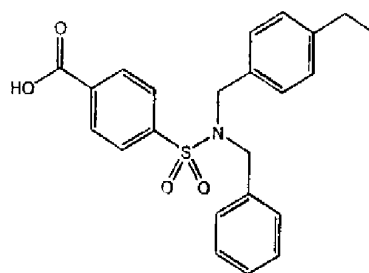
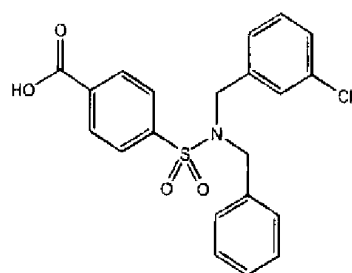
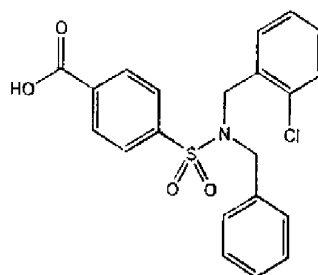
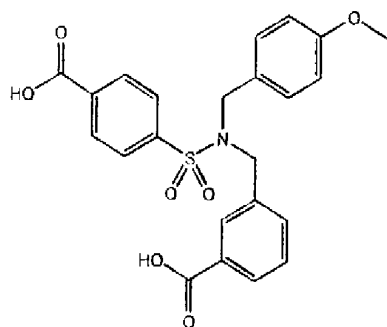


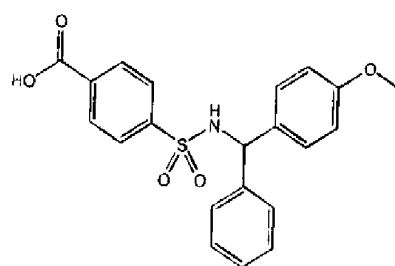
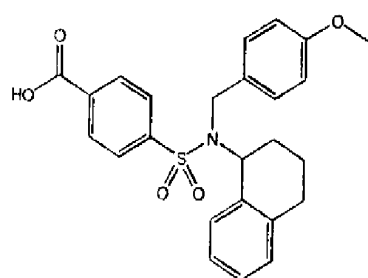
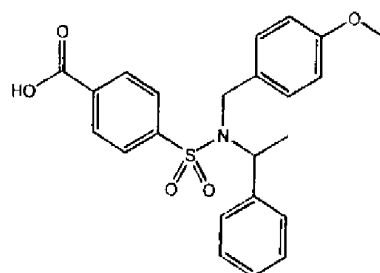
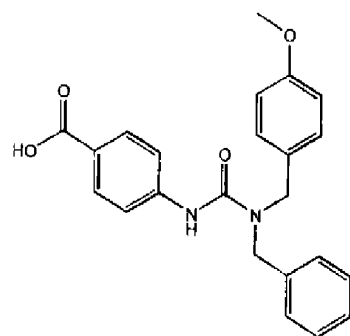
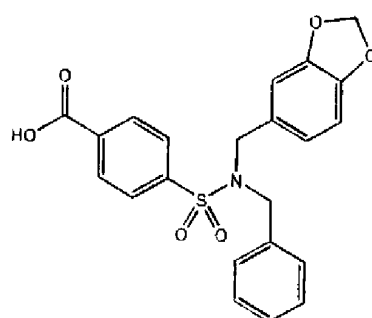
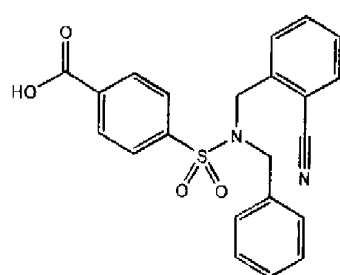
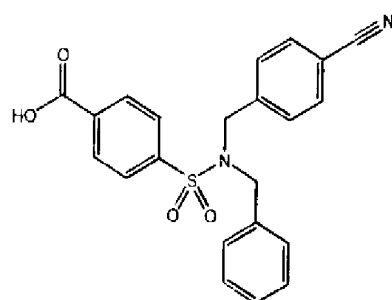
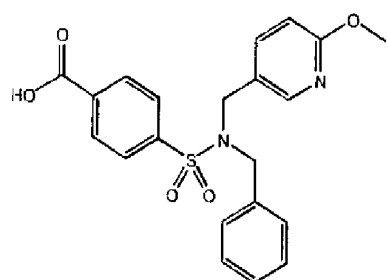


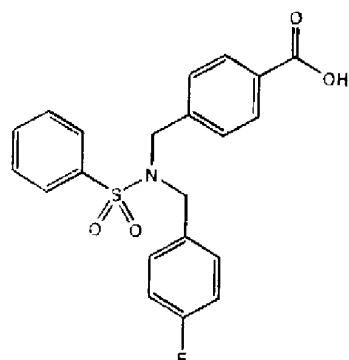
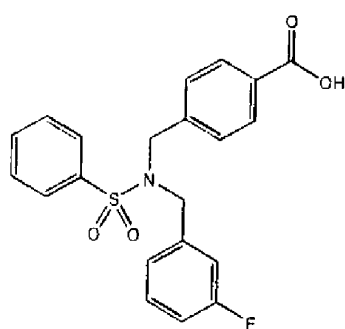
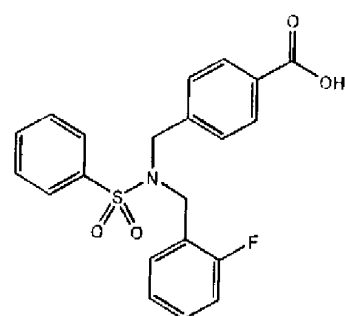
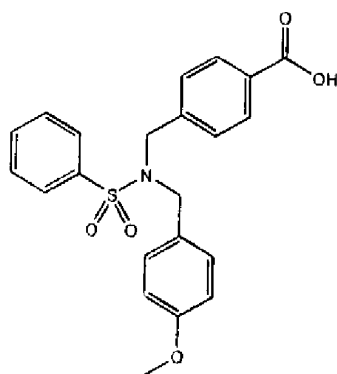
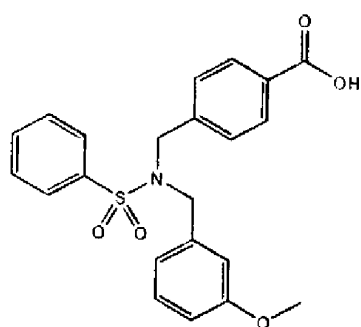
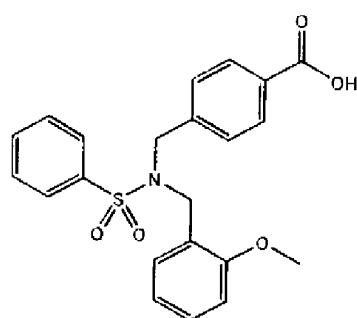
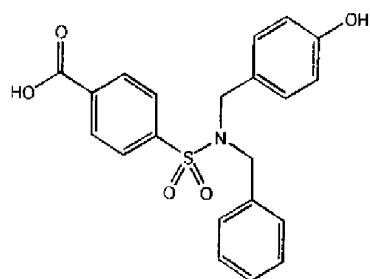
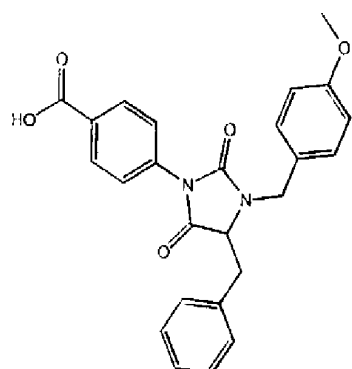


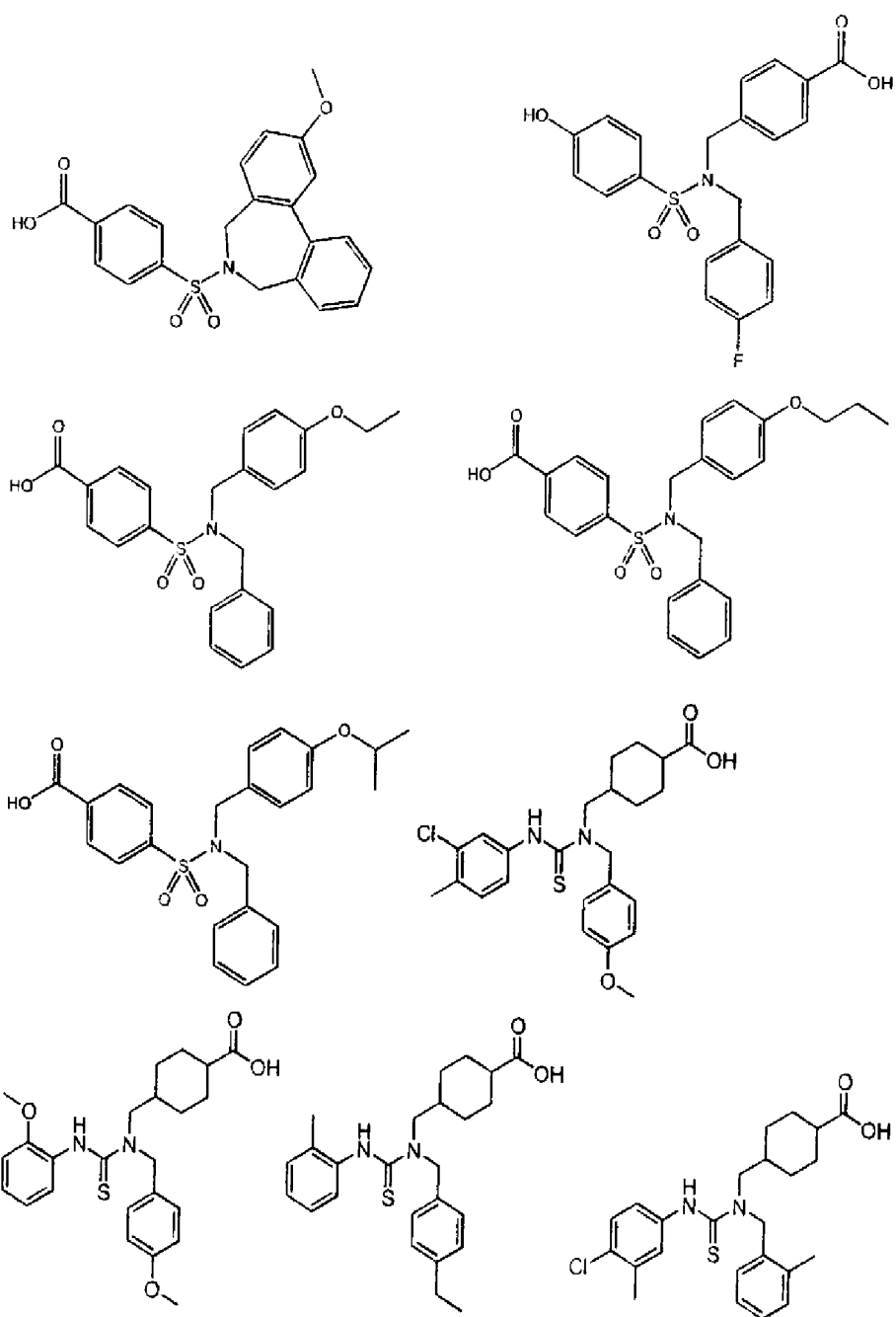


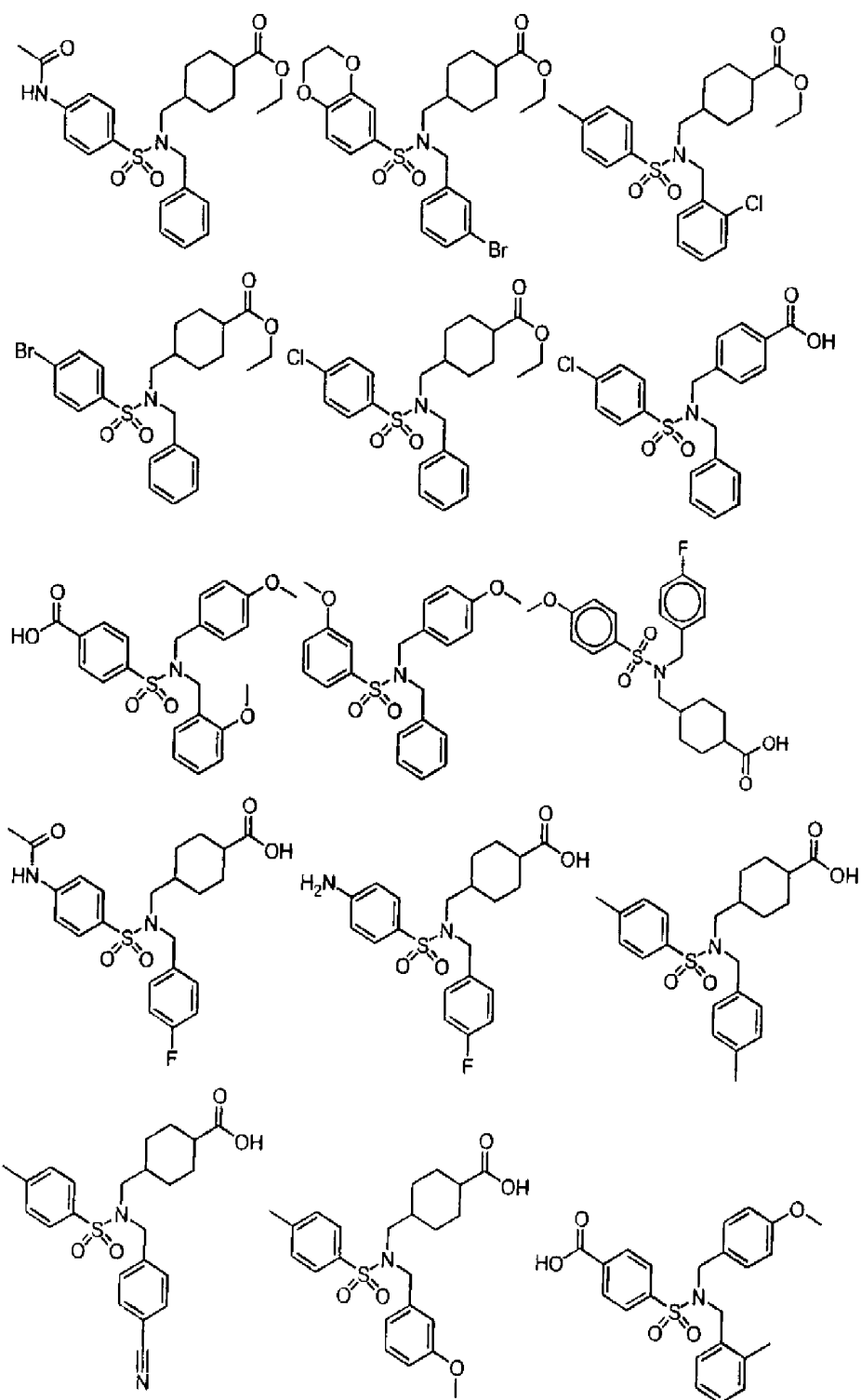


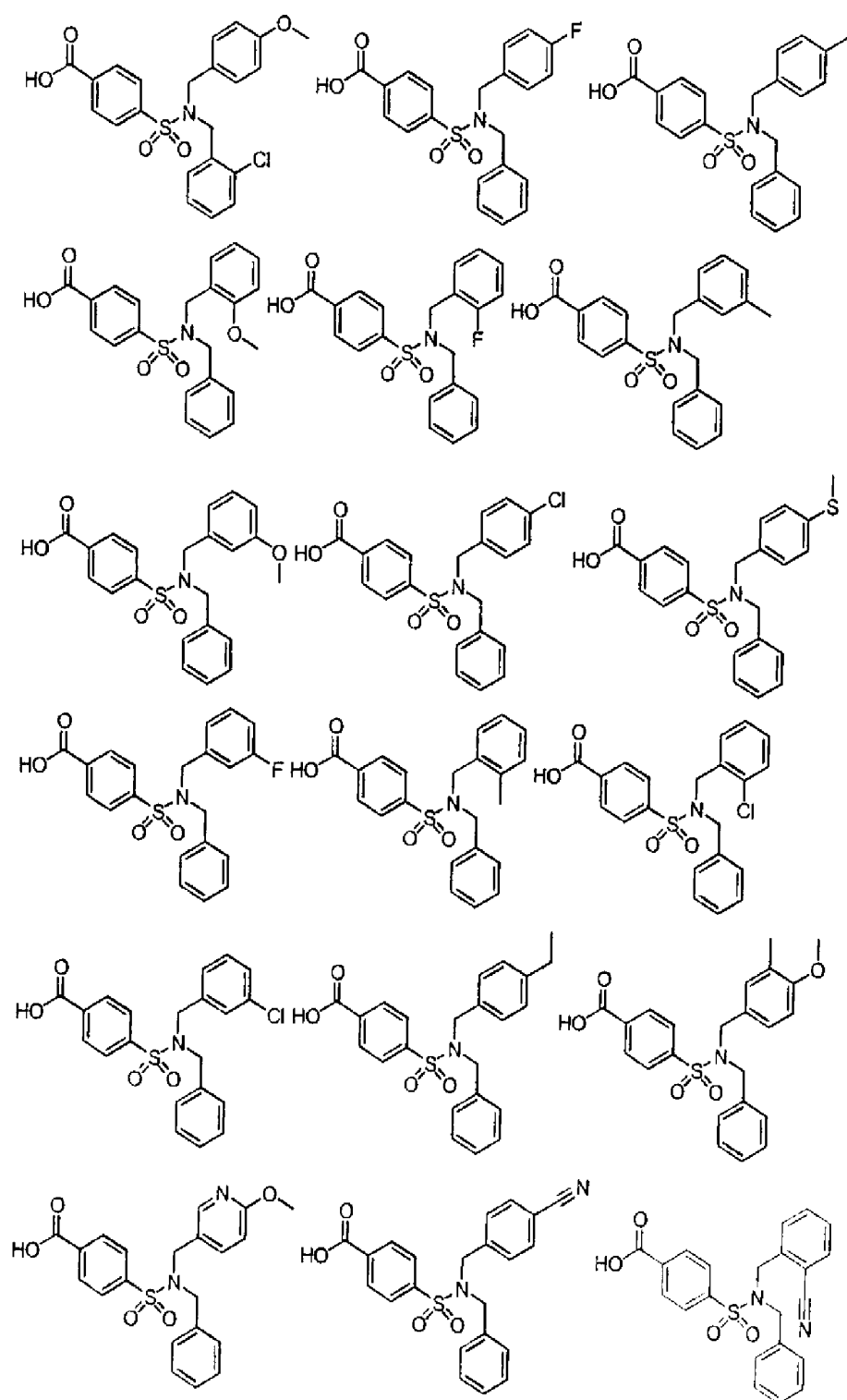


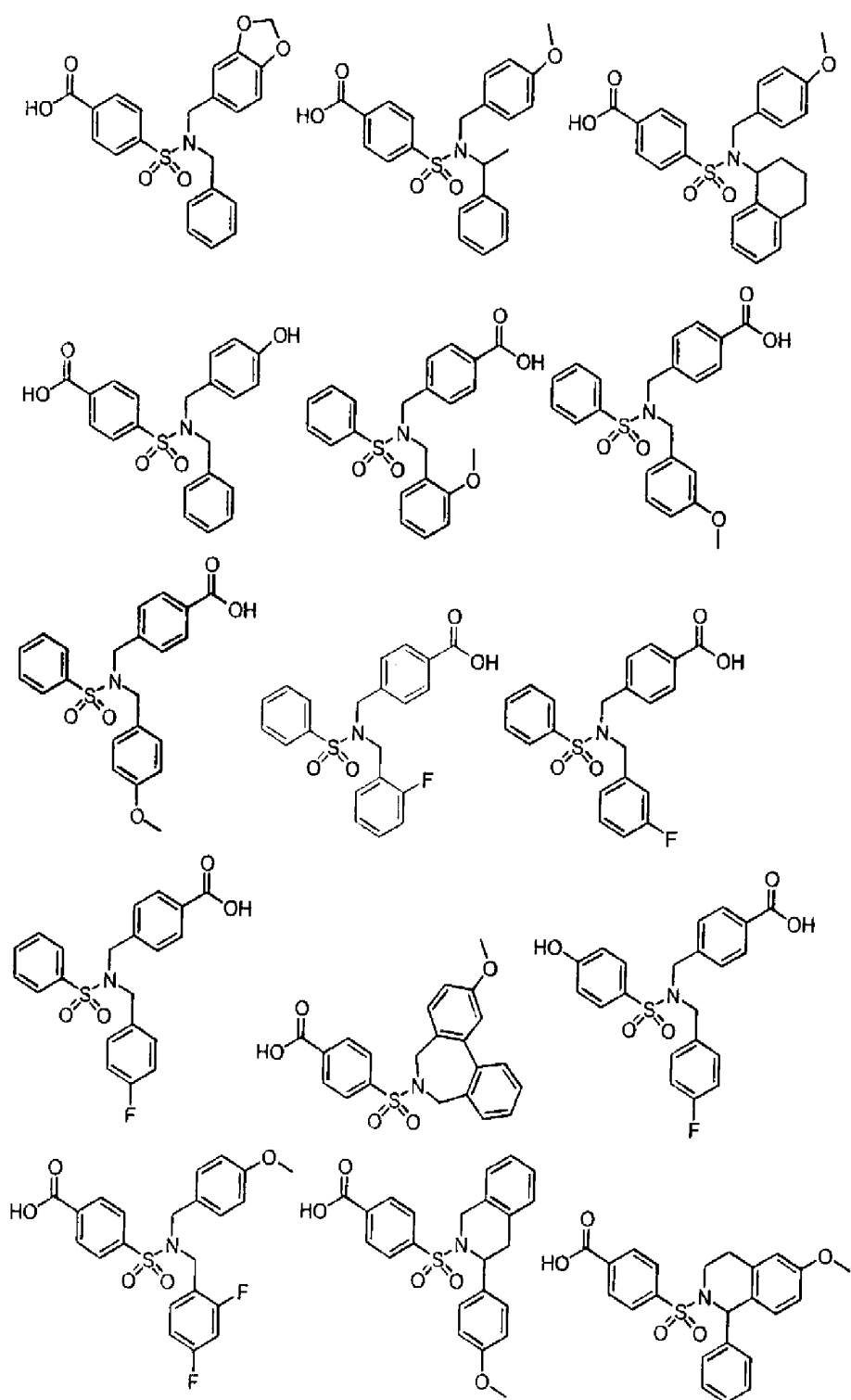


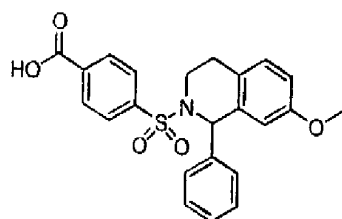






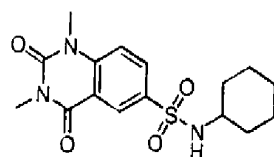
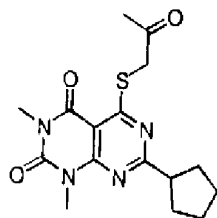
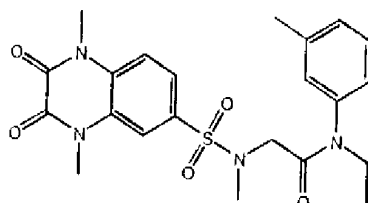
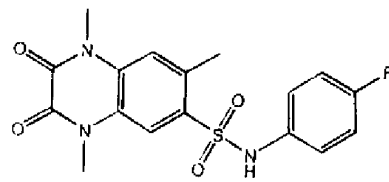
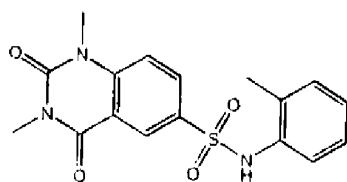
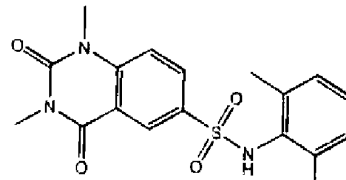
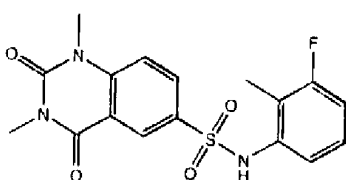
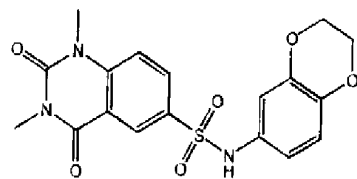
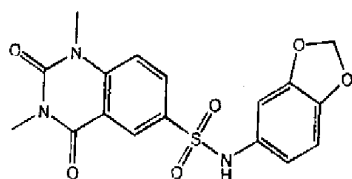
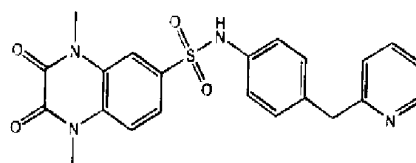
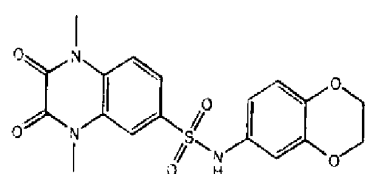


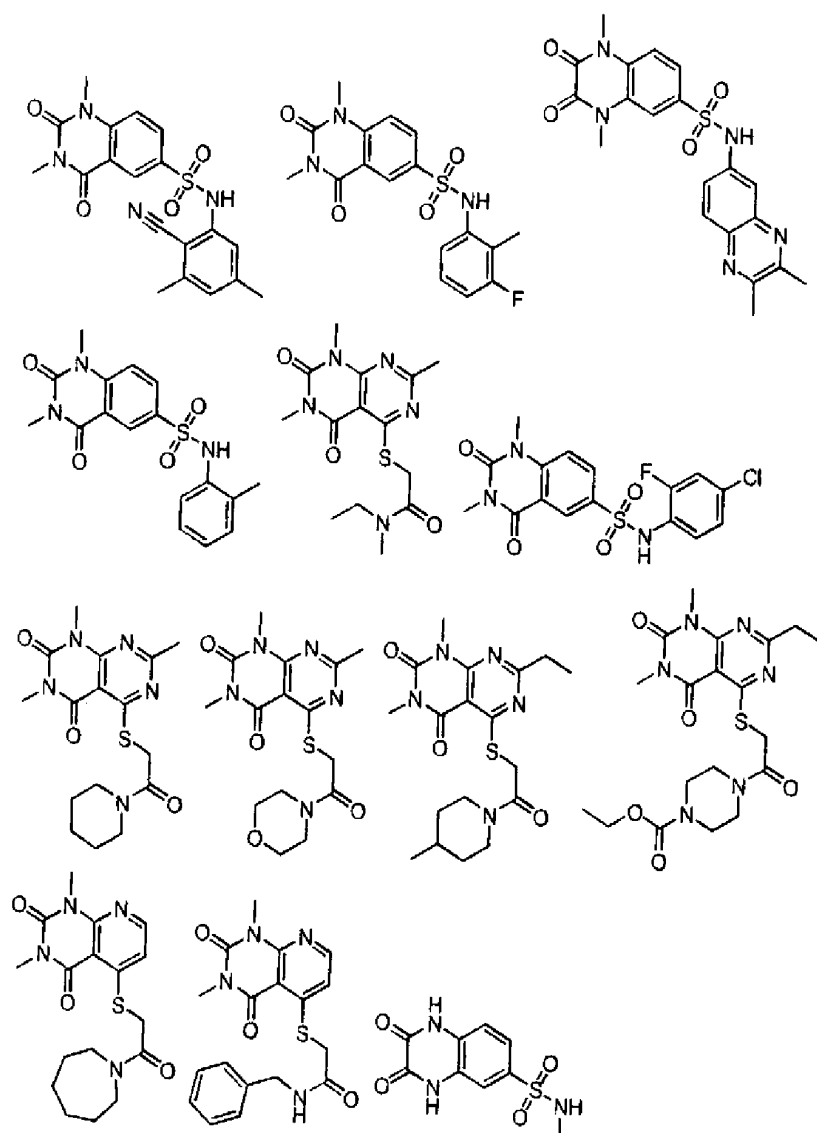




nebo její sůl, hydrát, solvát nebo N-oxid.

104. Sloučenina vzorce:

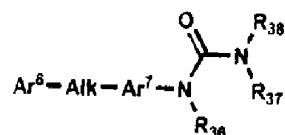




nebo její sůl, hydrát, solvát nebo N-oxid.

105. Způsob snížení nebo zeslabení hořké chuti v kompozici pro požití lidmi nebo zvířaty, zahrnující přidání jedné nebo více sloučenin podle jednoho z nároků 33 až 50 nebo 102 až 104 nebo jejich analogu ke kompozici v koncentraci účinné pro snížení nebo zeslabení hořké chuti spojené s kompozicí.
106. Způsob podle nároku 105, kde koncentrace této jedné nebo více sloučenin je od přibližně 0,1 ppm do přibližně 100 ppm.

107. Způsob podle nároku 105, kde koncentrace této jedné nebo více sloučenin je od přibližně 1 ppm do přibližně 25 ppm.
108. Kompozice pro požití lidmi nebo zvířaty, obsahující jednu nebo více sloučenin podle jednoho z nároků 33 až 50 nebo 102 až 104 nebo jejich analog.
109. Kompozice podle nároku 108, kde kompozicí je potravinový nebo nápojový produkt.
110. Kompozice podle nároku 109, kde nápojovým produktem je hotový, rozpustný a suchý kávový nápoj, směs kávového nápoje nebo koncentrát kávového nápoje.
111. Kompozice podle nároku 109, kde nápojovým produktem je sušené mléko nebo smetana na bázi mléka, sušené mléko nebo smetana na nemléčné bázi nebo bělidlo pro kávové nápoje.
112. Kompozice podle nároku 108, kde kompozicí je nejedlý produkt.
113. Kompozice podle nároku 112, kde nejedlým produktem je doplněk, nutraceutikum, funkční potravinový produkt, farmaceutikum, volně prodejné léčivo, produkt pro péči o ústní dutinu nebo kosmetický produkt.
114. Kompozice podle nároku 113, kde produktem pro péči o ústní dutinu je zubní pasta, ústní voda nebo žvýkačka.
115. Sloučenina vzorce:



nebo její sůl, hydrát, solvát, N-oxid nebo proléčivo,

kde Ar^6 a Ar^7 jsou stejná nebo odlišná, nezávisle na sobě, pěti- nebo šestičlenná arylová skupina nebo pěti- nebo šestičlenná heteroarylová skupina;

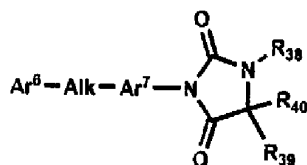
Alk je alkylová skupina, případně přerušená heteroatomem;

R_{36} a R_{37} jsou stejné nebo odlišné, nezávisle na sobě, vodík, alkyl, nebo R_{36} a R_{37} spolu s atomy, k nimž jsou připojeny, tvoří případně substituovaný pěti- nebo šestičlenný heterocyklus; a

R_{38} je vodík, substituovaný nebo nesubstituovaný alkyl, substituovaný nebo nesubstituovaný cykloalkylalkyl, substituovaný nebo nesubstituovaný heterocykloalkylalkyl, substituovaný nebo nesubstituovaný aryl, substituovaný nebo nesubstituovaný arylamidoalkyl, substituovaný nebo nesubstituovaný heteroarylamidoalkyl, substituovaný nebo nesubstituovaný arylalkyl, substituovaný nebo nesubstituovaný arylalkoxy, substituovaný nebo nesubstituovaný heteroaryl, substituovaný nebo nesubstituovaný heteroarylalkyl nebo haloalkyl.

116. Sloučenina podle nároku 115, kde pětičlenným heterocyklem vytvořeným R_{36} a R_{37} je hydantoin nebo substituovaná nebo nesubstituovaná cyklická močovina.

117. Sloučenina podle nároku 116, kde hydantoinem je hydantoin vzorce:



nebo jeho sůl, hydrát, solvát, N-oxid nebo proléčivo,

kde Ar^6 a Ar^7 jsou stejná nebo odlišná, nezávisle na sobě, pěti- nebo šestičlenná arylová skupina nebo pěti- nebo šestičlenná heteroarylová skupina;

Alk je alkylová skupina, případně přerušená heteroatomem;

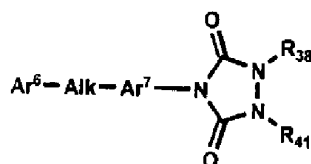
R_{38} je vodík, substituovaný nebo nesubstituovaný alkyl, substituovaný nebo nesubstituovaný cykloalkylalkyl, substituovaný nebo nesubstituovaný heterocykloalkylalkyl, substituovaný nebo nesubstituovaný aryl, substituovaný nebo nesubstituovaný arylamidoalkyl, substituovaný nebo nesubstituovaný heteroarylamidoalkyl, substituovaný nebo nesubstituovaný arylalkyl, substituovaný nebo nesubstituovaný arylalkoxy, substituovaný nebo nesubstituovaný heteroaryl, substituovaný nebo nesubstituovaný heteroarylalkyl nebo haloalkyl; a

R_{39} a R_{40} jsou stejné nebo odlišné, nezávisle na sobě, vodík, substituovaný nebo nesubstituovaný alkyl, substituovaný nebo nesubstituovaný cykloalkylalkyl, substituovaný nebo nesubstituovaný heterocykloalkylalkyl, substituovaný nebo nesubstituovaný aryl, substituovaný nebo nesubstituovaný arylamidoalkyl,

substituovaný nebo nesubstituovaný arylalkylamidoalkyl, substituovaný nebo nesubstituovaný heteroarylamidoalkyl, substituovaný nebo nesubstituovaný heteroarylalkylamidoalkyl, substituovaný nebo nesubstituovaný arylalkyl, substituovaný nebo nesubstituovaný arylalkoxy, substituovaný nebo nesubstituovaný heteroaryl, substituovaný nebo nesubstituovaný heteroarylalkyl, haloalkyl, nebo R_{39} a R_{40} , spolu s uhlíkovým atomem, k němuž jsou připojeny, tvoří skupinu C=O nebo substituovanou nebo nesubstituovanou alkenylovou skupinu.

118. Sloučenina podle nároku 115, kde pětičlenným heterocyklem vytvořeným R_{36} a R_{37} je urazol.

119. Sloučenina podle nároku 118, kde urazolem je urazol vzorce:



nebo jeho sůl, hydrát, solvát, N-oxid nebo proléčivo,

kde Ar^6 a Ar^7 jsou stejná nebo odlišná, nezávisle na sobě, pěti- nebo šestičlenná arylová skupina nebo pěti- nebo šestičlenná heteroarylová skupina;

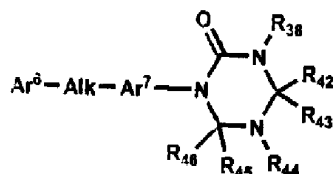
Alk je alkylová skupina, případně přerušená heteroatomem;

R_{38} je vodík, substituovaný nebo nesubstituovaný alkyl, substituovaný nebo nesubstituovaný cykloalkylalkyl, substituovaný nebo nesubstituovaný heterocykloalkylalkyl, substituovaný nebo nesubstituovaný aryl, substituovaný nebo nesubstituovaný arylamidoalkyl, substituovaný nebo nesubstituovaný heteroarylamidoalkyl, substituovaný nebo nesubstituovaný arylalkyl, substituovaný nebo nesubstituovaný arylalkoxy, substituovaný nebo nesubstituovaný heteroaryl, substituovaný nebo nesubstituovaný heteroarylalkyl, nebo haloalkyl; a

R_{41} je vodík, substituovaný nebo nesubstituovaný alkyl, substituovaný nebo nesubstituovaný cykloalkylalkyl, substituovaný nebo nesubstituovaný heterocykloalkylalkyl, substituovaný nebo nesubstituovaný aryl, substituovaný nebo nesubstituovaný arylamidoalkyl, substituovaný nebo nesubstituovaný arylalkylamidoalkyl, substituovaný nebo nesubstituovaný heteroarylamidoalkyl, substituovaný nebo nesubstituovaný heteroarylalkylamidoalkyl, substituovaný nebo nesubstituovaný arylalkyl, substituovaný nebo nesubstituovaný arylalkoxy,

substituovaný nebo nesubstituovaný heteroaryl, substituovaný nebo nesubstituovaný heteroarylalkyl, nebo haloalkyl.

120. Sloučenina podle nároku 115, kde šestičlenným heterocyklem vytvořeným R_{36} a R_{37} je šestičlenný heterocyklus vzorce:

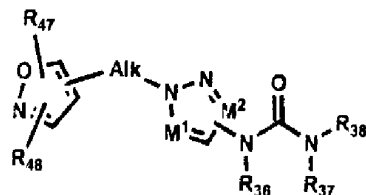


nebo jeho sůl, hydrát, solvát, N-oxid nebo proléčivo,

kde R_{38} je vodík, substituovaný nebo nesubstituovaný alkyl, substituovaný nebo nesubstituovaný cykloalkylalkyl, substituovaný nebo nesubstituovaný heterocykloalkylalkyl, substituovaný nebo nesubstituovaný aryl, substituovaný nebo nesubstituovaný arylamidoalkyl, substituovaný nebo nesubstituovaný heteroarylamidoalkyl, substituovaný nebo nesubstituovaný arylalkyl, substituovaný nebo nesubstituovaný arylalkoxy, substituovaný nebo nesubstituovaný heteroaryl, substituovaný nebo nesubstituovaný heteroarylalkyl, nebo haloalkyl; a

R_{42} , R_{43} , R_{44} , R_{45} , a R_{46} jsou stejné nebo odlišné, nezávisle na sobě, vodík, substituovaný nebo nesubstituovaný alkyl, substituovaný nebo nesubstituovaný cykloalkylalkyl, substituovaný nebo nesubstituovaný arylalkyl, substituovaný nebo nesubstituovaný arylalkoxy, substituovaný nebo nesubstituovaný heteroaryl, substituovaný nebo nesubstituovaný heteroarylalkyl, nebo R_{42} a R_{43} , nebo R_{45} a R_{46} , spolu s uhlíkovými atomy, k nimž jsou připojeny, tvoří skupinu $C=O$.

121. Sloučenina vzorce:



nebo její sůl, hydrát, solvát, N-oxid nebo proléčivo,

kde Alk je alkylová skupina, případně přerušená heteroatomem;

M^1 je dusík nebo CR_{49} , kde R_{49} je vodík nebo substituovaný nebo nesubstituovaný alkyl;

M^2 je dusík nebo CR_{50} , kde R_{50} je vodík nebo substituovaný nebo nesubstituovaný alkyl;

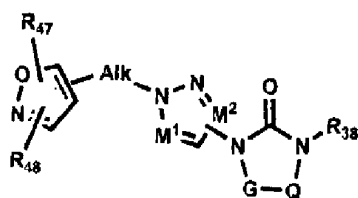
R_{36} a R_{37} jsou stejné nebo odlišné, nezávisle na sobě, vodík, alkyl, nebo, R_{36} a R_{37} , spolu s atomy, k nimž jsou připojeny, tvoří případně substituovaný pěti- nebo šestičlenný heterocyklus; a

R_{38} je vodík, substituovaný nebo nesubstituovaný alkyl, substituovaný nebo nesubstituovaný cykloalkylalkyl, substituovaný nebo nesubstituovaný heterocykloalkylalkyl, substituovaný nebo nesubstituovaný aryl, substituovaný nebo nesubstituovaný arylamidoalkyl, substituovaný nebo nesubstituovaný heteroarylamidoalkyl, substituovaný nebo nesubstituovaný arylalkyl, substituovaný nebo nesubstituovaný arylalkoxy, substituovaný nebo nesubstituovaný heteroaryl, substituovaný nebo nesubstituovaný heteroarylalkyl, nebo haloalkyl;

R_{47} je vodík, substituovaný nebo nesubstituovaný alkyl, substituovaný nebo nesubstituovaný alkoxy, substituovaný nebo nesubstituovaný aryl, substituovaný nebo nesubstituovaný arylalkyl, nebo halo; a

R_{48} je vodík, substituovaný nebo nesubstituovaný alkyl, substituovaný nebo nesubstituovaný alkoxy, substituovaný nebo nesubstituovaný aryl, substituovaný nebo nesubstituovaný arylalkyl, nebo halo.

122. Sloučenina v zorce:



nebo její sůl, hydrát, solvát, N-oxid nebo prolečivo,

kde Alk je alkylová skupina, případně přerušená heteroatomem;

G je $C=O$ a Q je $CR_{51}R_{52}$ nebo NR_{51} , kde R_{51} a R_{52} jsou stejné nebo odlišné, nezávisle na sobě, vodík, substituovaný nebo nesubstituovaný alkyl, substituovaný nebo nesubstituovaný cykloalkylalkyl, substituovaný nebo nesubstituovaný heterocykloalkylalkyl, substituovaný nebo nesubstituovaný aryl, substituovaný nebo nesubstituovaný arylamidoalkyl, substituovaný nebo nesubstituovaný arylalkylamidoalkyl, substituovaný nebo nesubstituovaný heteroarylamidoalkyl, substituovaný nebo nesubstituovaný heteroarylalkylamidoalkyl, substituovaný nebo

nesubstituovaný arylalkyl, substituovaný nebo nesubstituovaný arylalkoxy, substituovaný nebo nesubstituovaný heteroaryl, substituovaný nebo nesubstituovaný heteroarylalkyl, haloalkyl, nebo R_{51} a R_{52} , spolu s uhlíkovým atomem, k němuž jsou připojeny, tvoří skupinu $C=O$ nebo substituovanou nebo nesubstituovanou alkenylovou skupinu;

M^1 je dusík nebo CR_{49} , kde R_{49} je vodík nebo substituovaný nebo nesubstituovaný alkyl;

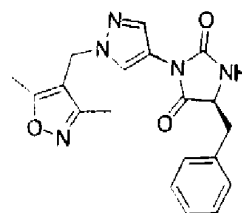
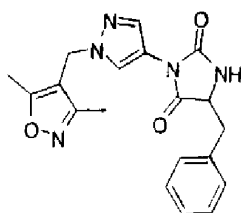
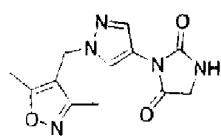
M^2 je dusík nebo CR_{50} , kde R_{50} je vodík nebo substituovaný nebo nesubstituovaný alkyl;

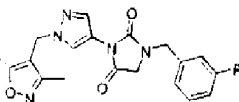
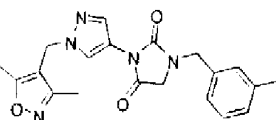
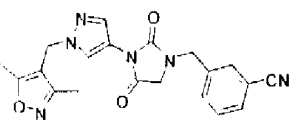
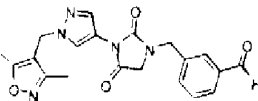
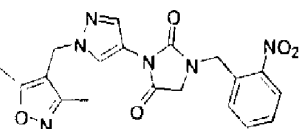
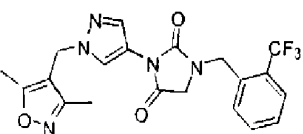
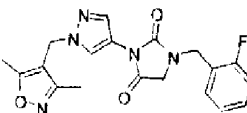
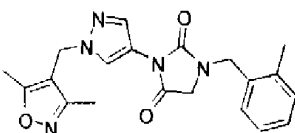
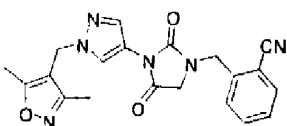
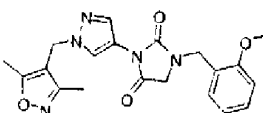
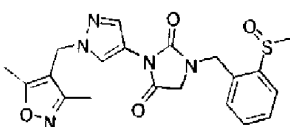
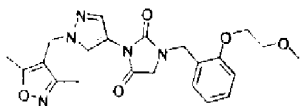
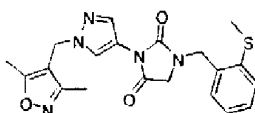
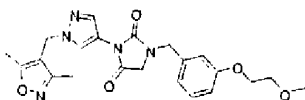
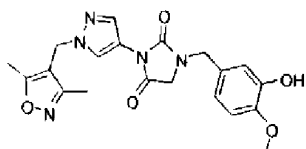
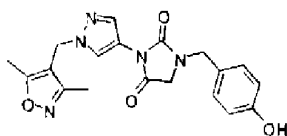
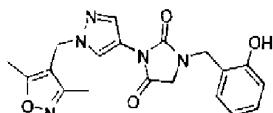
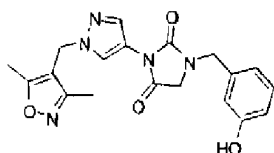
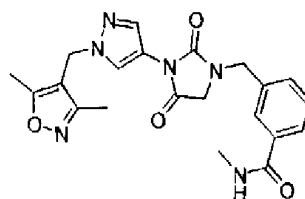
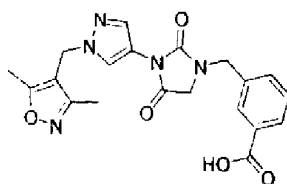
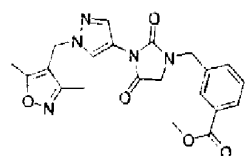
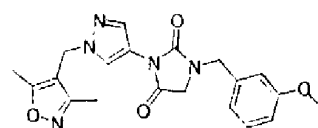
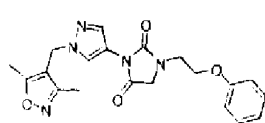
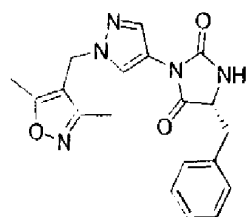
R_{38} je vodík, substituovaný nebo nesubstituovaný alkyl, substituovaný nebo nesubstituovaný cykloalkylalkyl, substituovaný nebo nesubstituovaný heterocykloalkylalkyl, substituovaný nebo nesubstituovaný aryl, substituovaný nebo nesubstituovaný arylamidoalkyl, substituovaný nebo nesubstituovaný heteroarylamidoalkyl, substituovaný nebo nesubstituovaný arylalkyl, substituovaný nebo nesubstituovaný arylalkoxy, substituovaný nebo nesubstituovaný heteroaryl, substituovaný nebo nesubstituovaný heteroarylalkyl, nebo haloalkyl;

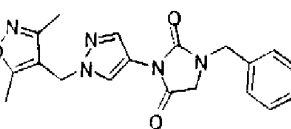
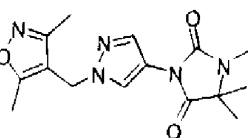
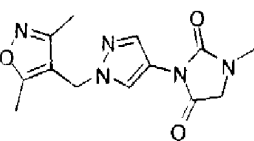
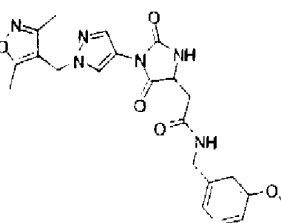
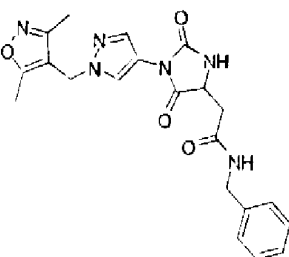
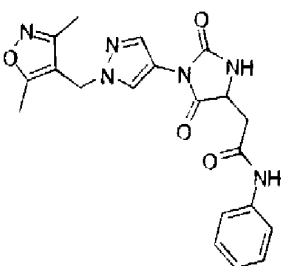
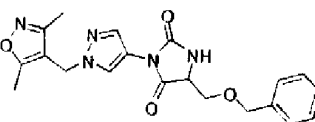
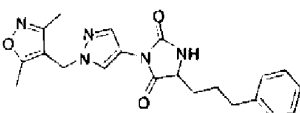
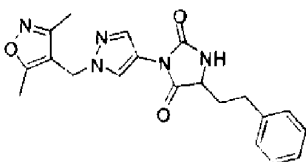
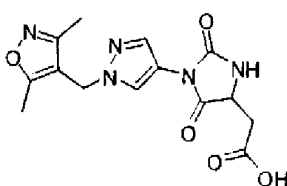
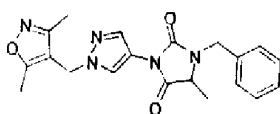
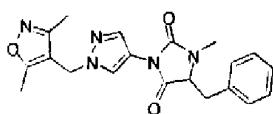
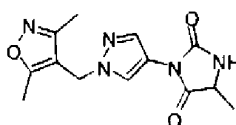
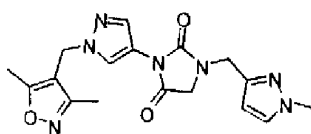
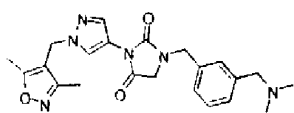
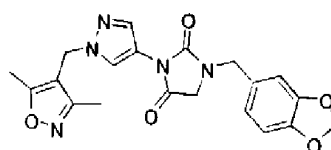
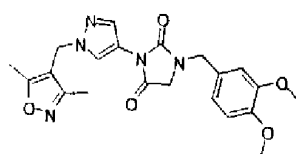
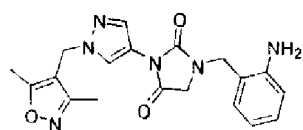
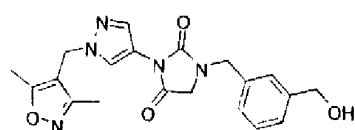
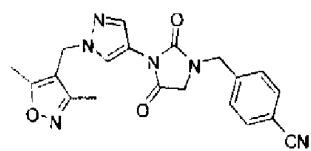
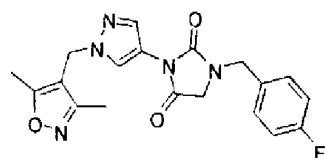
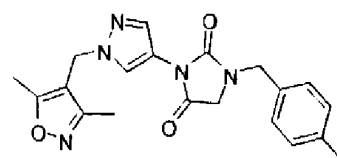
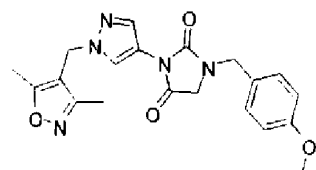
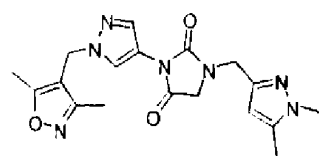
R_{47} je vodík, substituovaný nebo nesubstituovaný alkyl, substituovaný nebo nesubstituovaný alkoxy, substituovaný nebo nesubstituovaný aryl, substituovaný nebo nesubstituovaný arylalkyl, nebo halo; a

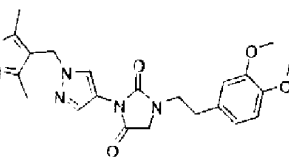
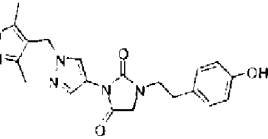
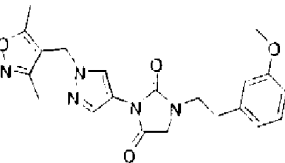
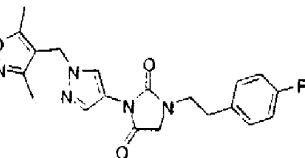
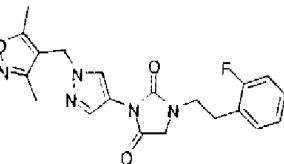
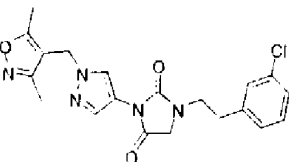
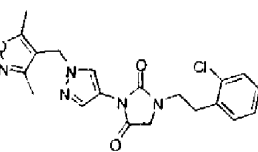
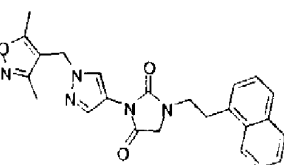
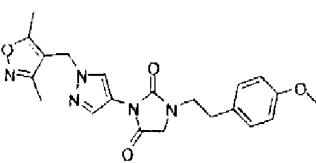
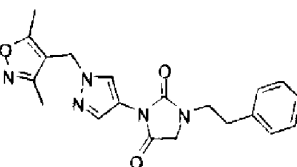
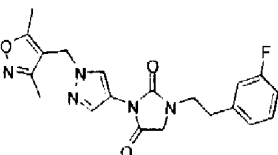
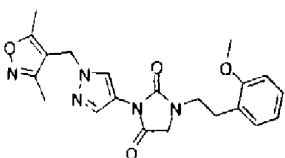
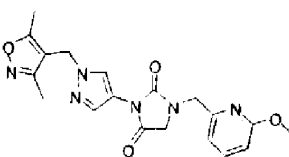
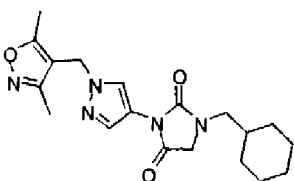
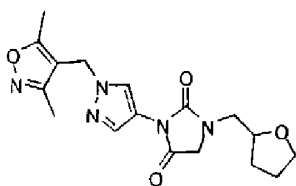
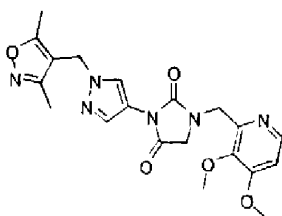
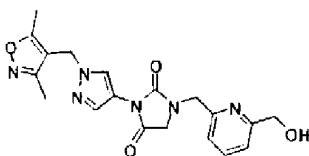
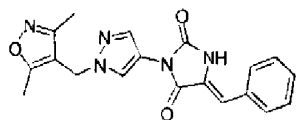
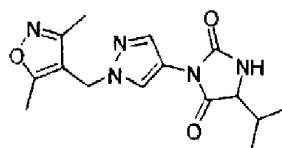
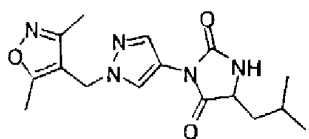
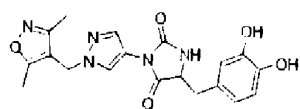
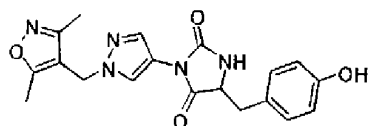
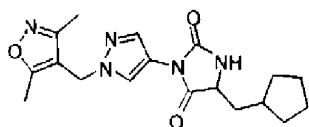
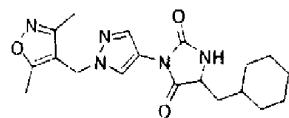
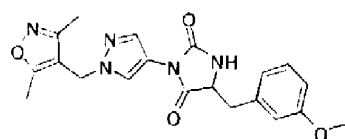
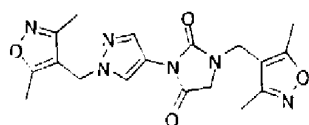
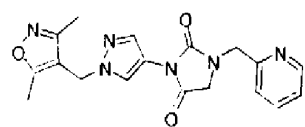
R_{48} je vodík, substituovaný nebo nesubstituovaný alkyl, substituovaný nebo nesubstituovaný alkoxy, substituovaný nebo nesubstituovaný aryl, substituovaný nebo nesubstituovaný arylalkyl, nebo halo.

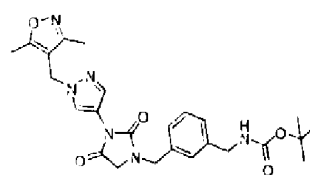
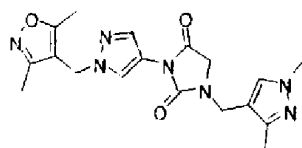
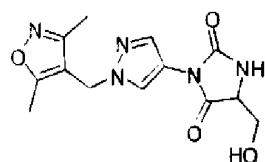
123. Sloučenina vzorce:





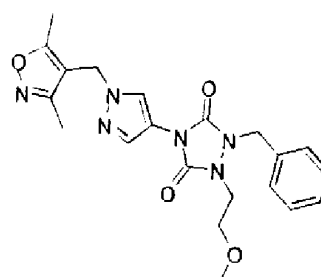
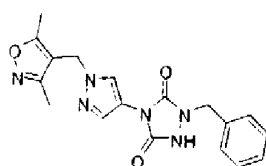
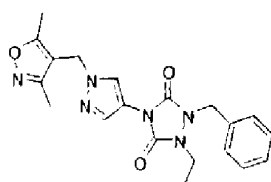
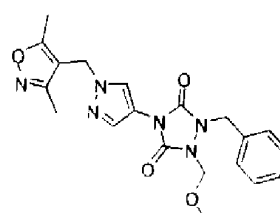
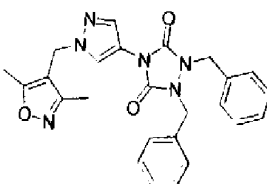
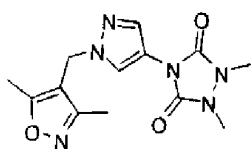
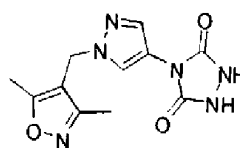
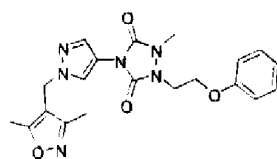
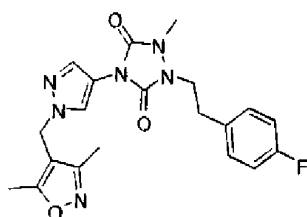
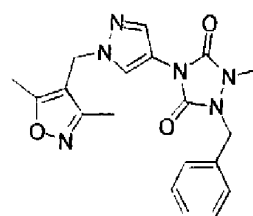
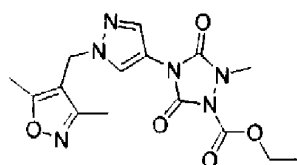
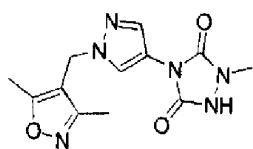


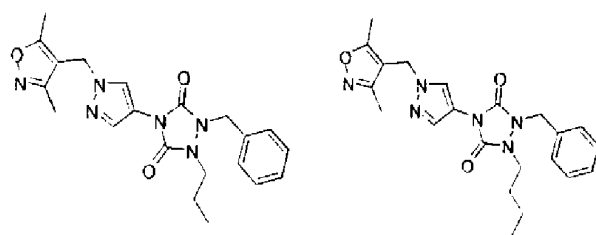




nebo její sůl, hydrát, solvát, N-oxid nebo prolečivo.

124. Sloučenina vzorce:





nebo její sůl, hydrát, solvát, N-oxid nebo proléčivo.

125. Způsob snížení nebo zeslabení hořké chuti, zahrnující podání kompozice obsahující účinné množství jedné nebo více sloučenin podle jednoho z nároků 115 až 124 nebo její soli, hydrátu, solvátu, N-oxidu nebo proléčiva.
126. Způsob podle nároku 125, kde kompozicí je potravina, nápoj nebo léčivo.
127. Způsob podle nároku 125, kde sloučenina aktivuje alespoň hT2R8.
128. Způsob podle nároku 125, kde hořká chuť je spojena s kávou nebo potravinou, nápojem nebo léčivem s příchutí kávy.
129. Způsob podle nároku 128, kde kávou je instantní káva nebo vařená káva.
130. Způsob podle nároku 125, kde alespoň jednou sloučeninou je antagonist hT2R8.
131. Kompozice obsahující jednu nebo více sloučenin podle jednoho z nároků 115 až 124 nebo její sůl, hydrát, solvát, N-oxid nebo proléčivo a jeden nebo více farmaceuticky přijatelných nosičů.
132. Kompozice podle nároku 131, kterou je potravina, nápoj nebo léčivo pro lidskou spotřebu.
133. Kompozice kávy nebo potraviny nebo nápoje nebo léčiva s příchutí kávy, která obsahuje alespoň jednu sloučeninu podle jednoho z nároků 115 až 124 nebo její sůl, hydrát, solvát, N-oxid nebo proléčivo.

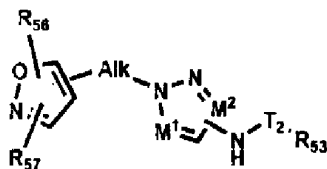
134. Kompozice podle nároku 133, kde alespoň jednou sloučeninou je antagonist hT2R8.
135. Kompozice podle nároku 133, kterou je instantní káva, mletá káva nebo vařená káva.
136. Kompozice podle nároku 133, kterou je instantní káva.
137. Kompozice potraviny, nápoje nebo léčiva mající hořkou chuť, kde tato hořká chuť je zeslabena nebo eliminována přidavkem účinného množství sloučeniny podle jednoho z nároků 115 až 124, nebo její soli, hydrátu, solvátu, N-oxidu nebo proléčiva.
138. Kompozice podle nároku 137, kde alespoň jednou sloučeninou je antagonist hT2R8.
139. Kompozice podle nároku 137, kde nápojem je instantní kávový nápoj, nápoj z mleté kávy nebo vařený kávový nápoj.
140. Kompozice podle nároku 137, kde nápojem je instantní kávový nápoj.
141. Způsob testu pro detekci nebo kvantitativní analýzu, zda je hořká chuť hořké sloučeniny v kompozici blokována sloučeninou podle jednoho z nároků 115 až 124, nebo její soli, hydrátem, solvátem, N-oxidem nebo proléčivem, přičemž způsob zahrnuje:
kontaktování receptoru hT2R8 hořké chuti s kompozicí obsahující alespoň jednu hořkou sloučeninu, která aktivuje alespoň jeden receptor hT2R8 hořké chuti a
detekci, zda aktivace receptoru hT2R8 je blokována nebo inhibována sloučeninou podle jednoho z nároků 115 až 124, nebo její soli, hydrátem, solvátem, N-oxidem nebo proléčivem, přičemž toto blokování nebo inhibice značí, že hořká chuť sloučeniny nebo kompozice obsahující tuto sloučeninu může být zeslabena přidáním účinného množství sloučeniny podle jednoho z nároků 115 až 124 nebo její soli, hydrátu, solvátu, N-oxidu nebo proléčiva.
142. Test podle nároku 141, který dále zahrnuje chuťový test, kde se hořká sloučenina a antagonistická sloučenina ochutnají odděleně a v kombinaci za účelem potvrzení, že je hořká chuť antagonistou zeslabena.

143. Test podle nároku 141, kde je chuťový receptor exprimován na buněčné membráně.
144. Test podle nároku 141, kde je chuťový receptor exprimován na izolované buněčné membráně.
145. Test podle nároku 141, kde je chuťový receptor exprimován na intaktní buňce.
146. Test podle nároku 141, kde je chuťový receptor exprimován na eukaryotické buňce.
147. Test podle nároku 141, kde je chuťový receptor exprimován buňkou obojživelníka, savce nebo hmyzu.
148. Test podle nároku 141, kde je chuťový receptor exprimován na buňce vybrané z HEK293, BHK, COS, HEK293T, CHO a oocyty z *Xenopus*.
149. Test podle nároku 141, kterým je fluorimetrický test.
150. Test podle nároku 141, kterým je vazební test.
151. Test podle nároku 141, který detekuje účinek sloučeniny testováním jejího účinku na intracelulární koncentraci iontů.
152. Test podle nároku 141, který detekuje účinek sloučeniny na intracelulární sodík nebo vápník.
153. Test podle nároku 141, který detekuje účinek sloučeniny na membránový potenciál buňky.
154. Test podle nároku 141, který detekuje účinek sloučeniny na transkripci reportérového genu.
155. Test podle nároku 141, který detekuje účinek sloučeniny na intracelulární cAMP, cGMP nebo IP3.

156. Test podle nároku 141, kde chuťový receptor obsahuje extracelulární doménu nebo transmembránovou oblast chuťového receptoru.
157. Test podle nároku 141, který detekuje změny vápníku za použití kalcium-specifického fluorescenčního barviva.
158. Test podle nároku 141, který detekuje změny intracelulárního vápníku za použití barviva vybraného z Fluo-3, Fluo-4 a Fura-2.
159. Test podle nároku 141, kde chuťový receptor je v roztoku.
160. Test podle nároku 141, kterým je vazební test, který detekuje změny spektroskopických vlastností, hydrodynamických vlastností nebo rozpustnosti [čeho? sloučeniny?].
161. Test podle nároku 141, který detekuje účinek sloučeniny na tvorbu komplexu chuťového receptoru s G proteinem.
162. Test podle nároku 141, který detekuje účinek sloučeniny na tvorbu komplexu chuťového receptoru s G proteinem vybraným z transducinu, gustducinu, $G\alpha 15$, $G\alpha 16$ nebo jejich chiméry.
163. Test podle nároku 141, kterým je fluorescenční polarizační test.
164. Test podle nároku 141, kde chuťový receptor je navázán na substrát pevné fáze.
165. Test podle nároku 141, kterým je vysoce výkonný test.
166. Test podle nároku 141, kde chuťový receptor je exprimován buňkou HEK293.
167. Způsob identifikace konzervovaného vazebního motivu přítomného v různých lidských T2R, zahrnující vystavení buněčné membrány buňky sloučenině podle jednoho z nároků 115 až 124 nebo její soli, hydrátu, solvátu, N-oxidu nebo proléčivu.

168. Chimérický GPCR konstruovaný tak, aby obsahoval motiv identifikovaný způsobem podle nároku 167.
169. Způsob snížení nebo zeslabení hořké chuti v kompozici pro požití lidmi nebo zvířaty, zahrnující přidání jedné nebo více sloučenin podle jednoho z nároků 115 až 124 nebo její soli, hydrátu, solvátu, N-oxidu nebo proléčiva ke kompozici v koncentraci účinné pro zeslabení nebo snížení hořké chuti spojené s kompozicí.
170. Způsob podle nároku 169, kde koncentrace této jedné nebo více sloučenin je od přibližně 0,1 ppm do přibližně 100 ppm.
171. Způsob podle nároku 169, kde koncentrace této jedné nebo více sloučenin je od přibližně 1 ppm do přibližně 25 ppm.
172. Kompozice pro požití lidmi nebo zvířaty, obsahující jednu nebo více sloučenin podle jednoho z nároků 115 až 124 nebo její sůl, hydrát, solvát, N-oxid nebo proléčivo.
173. Kompozice podle nároku 172, kterou je potravinový nebo nápojový produkt.
174. Kompozice podle nároku 173, kde potravinovým produktem je hotový, rozpustný a suchý kávový nápoj, směs kávového nápoje nebo koncentrát kávového nápoje.
175. Kompozice podle nároku 173, kde nápojovým produktem je sušené mléko nebo smetana na bázi mléka, sušené mléko nebo smetana na nemléčné bázi nebo bělidlo pro kávové nápoje.
176. Kompozice podle nároku 172, kde kompozicí je nejedlý produkt.
177. Kompozice podle nároku 176, kde nejedlým produktem je doplněk, nutraceutikum, funkční potravinový produkt, farmaceutikum, volně prodejně léčivo, produkt pro péči o ústní dutinu nebo kosmetický produkt.
178. Kompozice podle nároku 177, kde produktem pro péči o ústní dutinu je zubní pasta, ústní voda nebo žvýkačka.

179. Způsob přípravy sloučeniny se vzorcem:



nebo její soli, hydrátu, solvátu, N-oxidu nebo proléčiva,

kde Alk je alkylová skupina, případně přerušená heteroatomem;

T₂ je C=S, C=O nebo S(O)₂;

R₅₃ je substituovaný nebo nesubstituovaný alkyl, substituovaný nebo nesubstituovaný cykloalkyl, substituovaný nebo nesubstituovaný heteroaryl, substituovaný nebo nesubstituovaný aryl nebo substituovaný nebo nesubstituovaný arylalkyl;

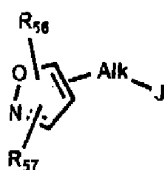
M¹ je dusík nebo CR₅₄, kde R₅₄ je vodík nebo substituovaný nebo nesubstituovaný alkyl;

M² je dusík nebo CR₅₅, kde R₅₅ je vodík nebo substituovaný nebo nesubstituovaný alkyl;

R₅₆ je vodík, substituovaný nebo nesubstituovaný alkyl, substituovaný nebo nesubstituovaný alkoxy, substituovaný nebo nesubstituovaný aryl, substituovaný nebo nesubstituovaný arylalkyl, nebo halo; a

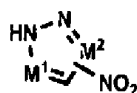
R₅₇ je vodík, substituovaný nebo nesubstituovaný alkyl, substituovaný nebo nesubstituovaný alkoxy, substituovaný nebo nesubstituovaný aryl, substituovaný nebo nesubstituovaný arylalkyl, nebo halo;

přičemž způsob zahrnuje reakci sloučeniny se vzorcem:

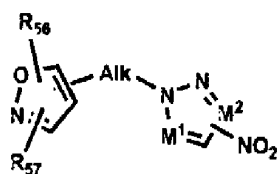


kde R₅₆, R₅₇, a Alk jsou definovány výše a J je odstupující skupina;

se sloučeninou vzorce:



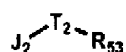
kde M¹ a M² jsou definovány výše, za vzniku sloučeniny se vzorcem



mající skupinu NO_2 ;

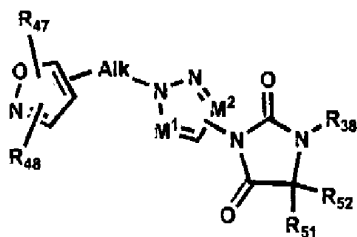
redukci NO_2 skupiny za vzniku sloučeniny obsahující skupinu NH_2 ; a

reakci sloučeniny obsahující NH_2 skupinu se sloučeninou vzorce



kde J_2 je odstupující skupina a T_2 a R_{53} jsou definovány výše.

180. Způsob přípravy sloučeniny se vzorcem:



nebo její soli, hydrátu, solvátu, N-oxidu nebo proléčiva,

kde Alk je alkylová skupina, případně přerušená heteroatomem;

R_{51} a R_{52} jsou stejné nebo odlišné, nezávisle na sobě, vodík, substituovaný nebo nesubstituovaný alkyl, substituovaný nebo nesubstituovaný cykloalkylalkyl, substituovaný nebo nesubstituovaný heterocykloalkylalkyl, substituovaný nebo nesubstituovaný aryl, substituovaný nebo nesubstituovaný arylamidoalkyl, substituovaný nebo nesubstituovaný arylalkylamidoalkyl, substituovaný nebo nesubstituovaný heteroarylamidoalkyl, substituovaný nebo nesubstituovaný heteroarylalkylamidoalkyl, substituovaný nebo nesubstituovaný arylalkyl, substituovaný nebo nesubstituovaný arylalkoxy, substituovaný nebo nesubstituovaný heteroaryl, substituovaný nebo nesubstituovaný heteroarylalkyl, haloalkyl, nebo R_{51} a R_{52} , spolu s uhlíkovým atomem, k němuž jsou připojeny, tvoří substituovanou nebo nesubstituovanou alkenylovou skupinu;

M^1 je dusík nebo CR_{10} , kde R_{10} je vodík nebo substituovaný nebo nesubstituovaný alkyl;

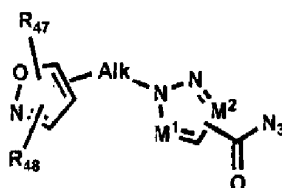
M^2 je dusík nebo CR_{50} , kde R_{50} je vodík nebo substituovaný nebo nesubstituovaný alkyl;

R_{48} je vodík, substituovaný nebo nesubstituovaný alkyl, substituovaný nebo nesubstituovaný cykloalkylalkyl, substituovaný nebo nesubstituovaný heterocykloalkylalkyl, substituovaný nebo nesubstituovaný aryl, substituovaný nebo nesubstituovaný arylamidoalkyl, substituovaný nebo nesubstituovaný heteroarylamidoalkyl, substituovaný nebo nesubstituovaný arylalkyl, substituovaný nebo nesubstituovaný arylalkoxy, substituovaný nebo nesubstituovaný heteroaryl, substituovaný nebo nesubstituovaný heteroarylalkyl, nebo haloalkyl;

R_{47} je vodík, substituovaný nebo nesubstituovaný alkyl, substituovaný nebo nesubstituovaný alkoxy, substituovaný nebo nesubstituovaný aryl, substituovaný nebo nesubstituovaný arylalkyl, nebo halo; a

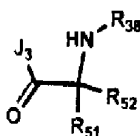
R_{48} je vodík, substituovaný nebo nesubstituovaný alkyl, substituovaný nebo nesubstituovaný alkoxy, substituovaný nebo nesubstituovaný aryl, substituovaný nebo nesubstituovaný arylalkyl, nebo halo;

přičemž způsob zahrnuje zahřátí sloučeniny se vzorcem:



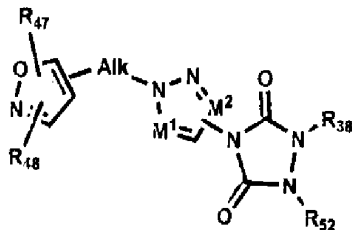
kde R_{47} , R_{48} , Alk, M^1 , a M^2 jsou definovány výše;

pro konverzi $-CON_3$ skupiny na $-N=C=O$ skupinu, a pak reakci se sloučeninou vzorce:



kde J_3 je odstupující skupina a R_{38} , R_{51} , a R_{52} jsou definovány výše.

181. Způsob přípravy sloučeniny se vzorcem:



nebo její soli, hydrátu, solvátu, N-oxidu nebo proléčiva,

kde Alk je alkylová skupina, případně přerušená heteroatomem;

R_{32} je vodík, substituovaný nebo nesubstituovaný alkyl, substituovaný nebo nesubstituovaný cykloalkylalkyl, substituovaný nebo nesubstituovaný heterocykloalkylalkyl, substituovaný nebo nesubstituovaný aryl, substituovaný nebo nesubstituovaný arylamidoalkyl, substituovaný nebo nesubstituovaný arylalkylamidoalkyl, substituovaný nebo nesubstituovaný heteroarylamidoalkyl, substituovaný nebo nesubstituovaný heteroarylalkylamidoalkyl, substituovaný nebo nesubstituovaný arylalkyl, substituovaný nebo nesubstituovaný arylalkoxy, substituovaný nebo nesubstituovaný heteroaryl, substituovaný nebo nesubstituovaný heteroarylalkyl, haloalkyl;

M^1 je dusík nebo CR_{49} , kde R_{49} je vodík nebo substituovaný nebo nesubstituovaný alkyl;

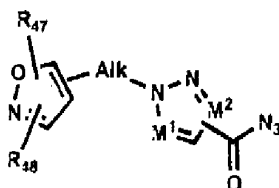
M^2 je dusík nebo CR_{50} , kde R_{50} je vodík nebo substituovaný nebo nesubstituovaný alkyl;

R_{38} je vodík, substituovaný nebo nesubstituovaný alkyl, substituovaný nebo nesubstituovaný cykloalkylalkyl, substituovaný nebo nesubstituovaný heterocykloalkylalkyl, substituovaný nebo nesubstituovaný aryl, substituovaný nebo nesubstituovaný arylamidoalkyl, substituovaný nebo nesubstituovaný heteroarylamidoalkyl, substituovaný nebo nesubstituovaný arylalkyl, substituovaný nebo nesubstituovaný arylalkoxy, substituovaný nebo nesubstituovaný heteroaryl, substituovaný nebo nesubstituovaný heteroarylalkyl, nebo haloalkyl;

R_{47} je vodík, substituovaný nebo nesubstituovaný alkyl, substituovaný nebo nesubstituovaný alkoxy, substituovaný nebo nesubstituovaný aryl, substituovaný nebo nesubstituovaný arylalkyl, nebo halo; a

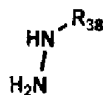
R_{48} je vodík, substituovaný nebo nesubstituovaný alkyl, substituovaný nebo nesubstituovaný alkoxy, substituovaný nebo nesubstituovaný aryl, substituovaný nebo nesubstituovaný arylalkyl, nebo halo;

příčemž způsob zahrnuje zahřátí sloučeniny vzorce:



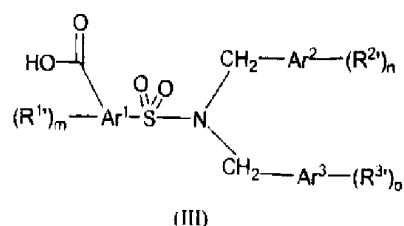
kde R_{47} , R_{48} , Alk, M^1 , a M^2 jsou definovány výše;

pro konverzi $-\text{CON}_3$ skupiny na $-\text{N}=\text{C}=\text{O}$ skupinu, a pak reakci s hydrazinem se vzorcem:



kde R_{38} je definován výše.

182. Způsob přípravy sloučeniny se vzorcem:



nebo její soli, hydrátu, solvátu nebo N-oxidu, kde:

Ar^1 , Ar^2 a Ar^3 jsou nezávisle pěti- nebo šestičlenný arylový, heteroarylový nebo cykloalkylový kruh, a Ar^2 a Ar^3 mohou být případně vypuštěny;

m je 0, 1, 2 nebo 3;

n a p jsou nezávisle 0, 1, 2, 3 nebo 4;

každý R^1 je nezávisle vybrán ze skupiny sestávající z vodíku, halogenu, alkylu, substituovaného alkylu, arylu, substituovaného arylu, arylalkylu, substituovaného arylalkylu, acylu, substituovaného acylu, heteroalkylu, substituovaného heteroalkylu, heteroarylu, substituovaného heteroarylu, heteroarylalkylu, substituovaného heteroarylalkylu, CN, NO_2 , OR^6 , $\text{S}(\text{O})_b\text{R}^6$, NR^bR^7 , CONR^6R^7 , CO_2R^6 , $\text{NR}^6\text{CO}_2\text{R}^7$, $\text{NR}^6\text{CONR}^7\text{R}^8$, $\text{NR}^6\text{CSNR}^7\text{R}^8$, $\text{NR}^6\text{C}(=\text{NH})\text{NR}^7\text{R}^8$, $\text{SO}_2\text{NR}^5\text{R}^6$, $\text{NR}^5\text{SO}_2\text{R}^6$, $\text{NR}^5\text{SO}_2\text{NR}^6\text{R}^7$, $\text{B}(\text{OR}^5)(\text{OR}^6)$, $\text{P}(\text{O})(\text{OR}^5)(\text{OR}^6)$, a $\text{P}(\text{O})(\text{R}^5)(\text{OR}^6)$;

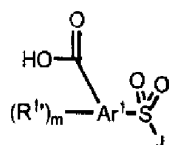
každý R^2 je nezávisle vybrán ze skupiny sestávající z vodíku, halogenu, alkylu, substituovaného alkylu, arylu, substituovaného arylu, arylalkylu, substituovaného arylalkylu, acylu, substituovaného acylu, heteroalkylu, substituovaného heteroalkylu, heteroarylu, substituovaného heteroarylu, heteroarylalkylu, substituovaného heteroarylalkylu, CN, NO_2 , OR^6 , $\text{S}(\text{O})_b\text{R}^6$, NR^bR^7 , CONR^6R^7 , CO_2R^6 , $\text{NR}^6\text{CO}_2\text{R}^7$, $\text{NR}^6\text{CONR}^7\text{R}^8$, $\text{NR}^6\text{CSNR}^7\text{R}^8$, $\text{NR}^6\text{C}(=\text{NH})\text{NR}^7\text{R}^8$, $\text{SO}_2\text{NR}^5\text{R}^6$, $\text{NR}^5\text{SO}_2\text{R}^6$, $\text{NR}^5\text{SO}_2\text{NR}^6\text{R}^7$, $\text{B}(\text{OR}^5)(\text{OR}^6)$, $\text{P}(\text{O})(\text{OR}^5)(\text{OR}^6)$, a $\text{P}(\text{O})(\text{R}^5)(\text{OR}^6)$;

každý R^3 je nezávisle vybrán ze skupiny sestávající z vodíku, halogenu, alkylu, substituovaného alkylu, arylu, substituovaného arylu, arylalkylu, substituovaného arylalkylu, acylu, substituovaného acylu, heteroalkylu, substituovaného heteroalkylu, heteroarylu, substituovaného heteroarylu, heteroarylalkylu, substituovaného heteroarylalkylu, CN, NO₂, OR⁶, S(O)₆R⁶, NR⁶R⁷, CONR⁶R⁷, CO₂R⁶, NR⁶CO₂R⁷, NR⁶CONR⁷R⁸, NR⁶CSNR⁷R⁸, NR⁶C(=NH)NR⁷R⁸, SO₂NR⁵R⁶, NR⁵SO₂R⁶, NR⁵SO₂NR⁶R⁷, B(OR⁵)(OR⁶), P(O)(OR⁵)(OR⁶), a P(O)(R⁵)(OR⁶);

R^5 - R^8 jsou nezávisle vodík, alkyl, substituovaný alkyl, aryl, substituovaný aryl, arylalkyl, substituovaný arylalkyl, heteroalkyl, substituovaný heteroalkyl, heteroaryl, substituovaný heteroaryl, heteroarylalkyl nebo substituovaný heteroarylalkyl nebo alternativně, R^6 a R^7 , R^7 a R^8 , spolu s atomy, na něž jsou navázány, tvoří cykloheteroalkylový nebo substituovaný cykloheteroalkylový kruh;

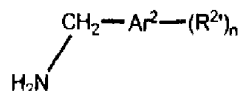
b je 0, 1, nebo 2;

přičemž způsob zahrnuje reakci sloučeniny se vzorcem:



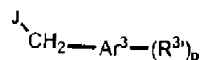
kde J je odstupující skupina;

se sloučeninou vzorce:



za vzniku produktu; a

reakci produktu se sloučeninou vzorce:



kde J je odstupující skupina.

23.09.10

2010-180

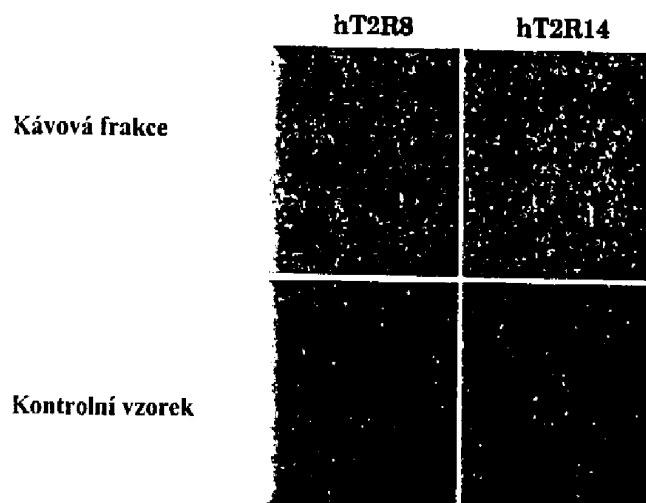
~~356~~

1/3

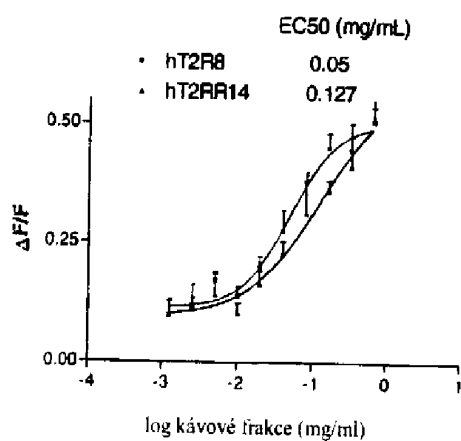
Obr. 1 Hořká kávová frakce aktivovaná hT2R8 a hT2R14

[Kávová frakce] = 1 mg/ml

Modré barvivo = 1,9 mM FD&C 1



Obr. 2 Dávkově závislá odezva hT2R8 a hT2R14 na kávovou frakci

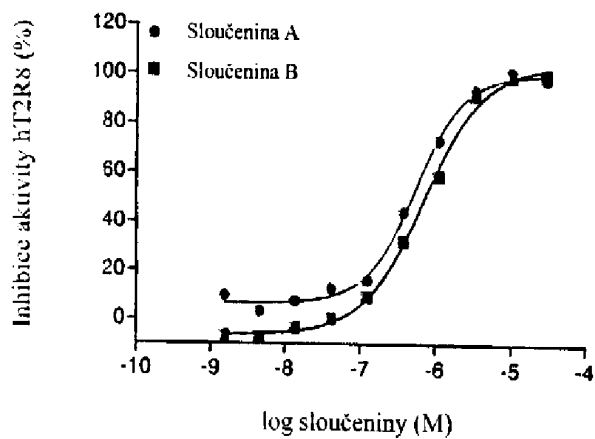


23.09.10

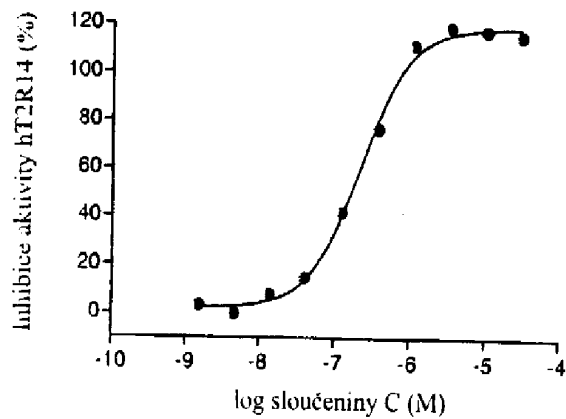
2010-180

2/3

Obr. 3 Dávkově závislé inhibiční křivky pro sloučeniny A a B na stabilní buněčné linii hT2R8



Obr. 4 Dávkově závislé inhibiční křivky pro sloučeninu C na stabilní buněčné linii hT2R14

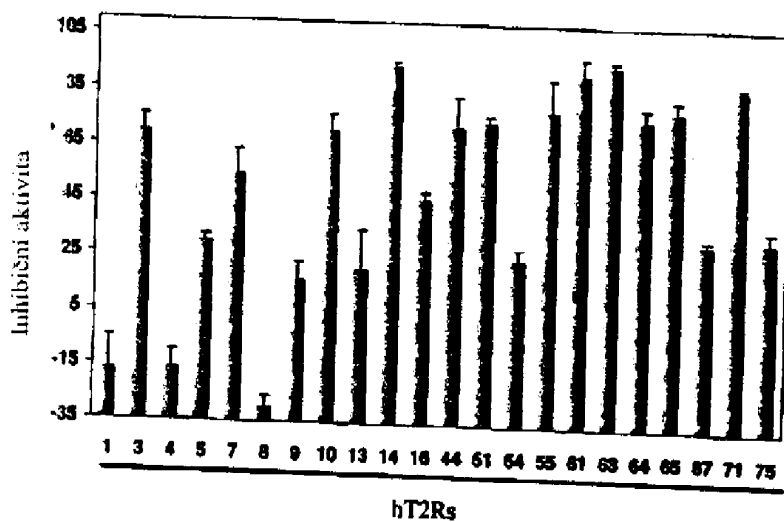


23.09.10

2010-180

3/3

Obr. 5 Inhibiční aktivita S5105 na 22 receptorech hT2R.



Obr. 6

