



(12)

CERERE DE BREVET DE INVENȚIE

(21) Nr. cerere: a 2010 00175

(22) Data de depozit: 19.08.2008

(30) Prioritate:

21.08.2007 US 60/957, 129
23.04.2008 US 061/047, 187

(41) Data publicării cererii:

30.07.2013 BOPI nr. 7/2013

(86) Cerere internațională PCT:

Nr. US 2008/009864 19.08.2008

(87) Publicare internațională:

Nr. WO 2009/025793 26.02.2009

(71) Solicitant:

• SENOMYX, INC., 4767 NEXUS CENTRE
DR., SAN DIEGO, CALIFORNIA, US

(72) Inventatori:

• LI XIAODONG, 5887 ASTER MEADOW
PLACE, SAN DIEGO, CALIFORNIA, US;
• PATRON ANDREW, 1701 TARA WAY,
SAN MARCOS, CALIFORNIA, US;
• TACHDJIAN CATHERINE, 3905
CAMINITO TERVISO, SAN DIEGO,
CALIFORNIA, US;
• XU HONG, 3955 VIA HOLGURA, SAN
DIEGO, CALIFORNIA, US;
• LI QING, 13705 LINDAMERE LANE, SAN
DIEGO, CALIFORNIA, US;
• PRONIN ALEXEY, 11512 HADAR DRIVE,
SAN DIEGO, CALIFORNIA, US;

• SERVANT GUY, 17343 ALBERT AVENUE,
SAN DIEGO, CALIFORNIA, US;
• ZHANG LAN, 4863 CAMINITO CARMEL
LANDING, SAN DIEGO, CALIFORNIA, US;
• BRADY THOMAS, 7561 WINDSONG
ROAD, SAN DIEGO, CALIFORNIA, US;
• DARMOHUSODO VINCENT, 4178
DECORO STREET 44, SAN DIEGO,
CALIFORNIA, US;
• ARELLANO MELISSA, 6205 VERDA
LANE, SAN DIEGO, CALIFORNIA, US;
• SELCHAU VICTOR, 15195 CALLE
JUANITO, SAN DIEGO, CALIFORNIA, US;
• CHING BRETT WEYLAN, 11003 KIKI
COURT, SAN DIEGO, CALIFORNIA, US;
• KARANEWSKY DONALD S., 1797
CONTINENTAL LANE, ESCONDO,
CALIFORNIA, US;
• BRUST PAUL, 11010 WEST OCEAN AIR
DR., 256, SAN DIEGO, CALIFORNIA, US;
• LING JING, 6737 TEA TREE STREET,
CARLSBAD, CALIFORNIA, US;
• ZHAO WEN, 8840 COSTA VERDE BLVD.,
3356, SAN DIEGO, CALIFORNIA, US;
• PRIEST CHAD, 1819-A CREST DRIVE,
ENCINITAS, CALIFORNIA, US

(74) Mandatar:

CABINET M.OPROIU - CONSILIERE ÎN
PROPRIETATE INTELECTUALĂ S.R.L.,
STR.POPA SAVU NR.42, PARTER,
SECTOR 1, BUCUREȘTI

(54) **IDENTIFICAREA RECEPTORILOR T2R UMANI CARE RĂSPUND LA COMPUȘII AMARI CARE EXTRAG GUSTUL AMAR DIN COMPOZIȚII, ȘI UTILIZAREA ACESTORA ÎN ANALIZE PENTRU A IDENTIFICA COMPUȘII CARE INHIBĂ (BLOCHEAZĂ) GUSTUL AMAR ÎN COMPOZIȚII ȘI UTILIZAREA ACESTORA**

(57) Rezumat:

Prezenta invenție se referă la identificarea receptorilor de gust umani, din familia de receptori T2R, care răspund la anumiți compuși amari. De asemenea, invenția se referă la compuși specifici și la compoziții care conțin astfel de compuși care funcționează ca inhibitori ai gustului amar, și utilizarea acestora ca inhibitori ai gustului amar sau ca modulatori de gust pentru cafea sau alimente cu gust de cafea, băuturi sau medicamente. Prezenta invenție se mai referă la un compus antagonist al receptorilor T2R umani, și la utilizarea acestuia în analize și ca inhibitor al gustului amar în compoziții ce pot fi ingerate de oameni sau animale.

Revendicări: 182

Figuri: 6

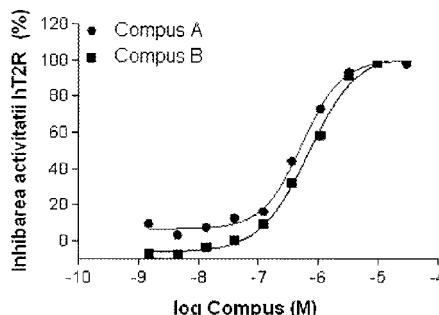


Fig. 3

Cu începere de la data publicării cererii de brevet, cererea asigură, în mod provizoriu, solicitantului, protecția conferită potrivit dispozițiilor art.32 din Legea nr.64/1991, cu excepția cazurilor în care cererea de brevet de invenție a fost respinsă, retrasă sau considerată ca fiind retrasă. Întinderea protecției conferite de cererea de brevet de invenție este determinată de revendicările conținute în cererea publicată în conformitate cu art.23 alin.(1) - (3).



864

OFICIUL DE STAT PENTRU INVENTII SI MARCI
Cerere de brevet de invenție
Nr. 26 175
Data depozit 19.08.2008

IDENTIFICAREA RECEPTORILOR T2R UMANI CARE RĂSPUND LA COMPUȘII AMARI CARE PROVOACĂ GUSTUL AMAR ÎN COMPOZIȚII ȘI UTILIZAREA ACESTORA ÎN ANALIZE PENTRU IDENTIFICAREA COMPUȘILOR CARE INHIBĂ (BLOCHEAZĂ) GUSTUL AMAR ÎN COMPOZIȚII ȘI UTILIZAREA ACESTORA

CERERI ÎNRUDITE

[0001] Această cerere revendică prioritatea cererii provizorii SUA Nr. 60/957,129 depusă la data de 21 august 2007 și a cererii provizorii SUA Nr. 61/047,187, depusă la data de 23 aprilie 2008 și se referă la cererea SUA Nr. 11/766,974, care este o continuare în parte a cererii SUA Nr. 11/555,617 depuse la 1 noiembrie 2006, care este la rândul său o continuare în parte a Cererii SUA Ser. Nr. 10/191,058 depusă în 10 iulie 2002 și este, de asemenea, o continuare în parte a cererii SUA Nr. 10/742,209 depusă la 1 decembrie 2003, care este o cerere divizionară a cererii SUA Nr. 09/825,882 depusă la 5 aprilie 2001, acum brevetul US No. 7,105,650, toate aceste cereri fiind încorporate aici prin referință în integritatea lor.

DOMENIUL INVENTIEI

[0002] Această cerere se referă la identificarea receptorilor de gust de tip 2 umani (hT2R) și la utilizarea acestora în analize pentru identificarea liganzilor care activează T2R specifici. Acești liganzi sunt utili pentru modularea percepției gustului, în particular a gustului amar. În cererile noastre de brevet anterioare am descris expresia funcțională ale receptorilor de gust amar umani, inclusiv hT2R8 și hT2R14. În această cerere de brevet raportăm că hT2R8 și hT2R14 sunt activate de o fracțiune de cafea îmbogățită cu gust amar, raportăm, de asemenea, că identificarea antagoniștilor pentru hT2R8 și hT2R14 folosind o analiză de screening cu grad ridicat de procesabilitate și că aceste combinații ale antagoniștilor pot reduce gustul amar al cafelei și al fracțiunilor de cafea. Această invenție oferă o metodă de a modifica și de a îmbunătăți gustul băuturilor cu cafea.

[0003] Mai specific, prezenta invenție se referă la utilizarea hT2R8 și/sau a hT2R14 în analizele de screening și în testele de gust pentru a identifica compușii care inhibă (blochează) gustul amar al cafelei și al altor alimente și băuturi.

[0004] De asemenea, această invenție se referă la dezvăluirea unui ligand care sunt largi proprietăți antagoniste gustului amar, adică blochează sau inhibă în mod apreciabil activarea multor (13) receptori de amar diferiți printr-un set divers de liganzi de amar și blochează sau inhibă activarea altor șase receptori de gust amar, inhibând de asemenea și amărăciunea provocată de unii compuși amari ai căror receptor/ri de amar cu care interacționează nu au fost încă elucidati.

[0005] Mai specific, această invenție se referă la dezvăluirea unui ligand menționat aici drept compus C care sunt largi proprietăți antagoniste amarului, adică blochează sau inhibă în mod apreciabil activarea receptorilor de gust amar hT2R3, 7, 10, 14, 16, 44, 51, 55, 61, 63, 64, 65 și 71 printr-un set divers de liganzi de amar și blochează sau inhibă activarea altor șase receptori de gust amar, adică hT2R5, 9, 13, 54, 67 și 75, inhibând de asemenea și amărăciunea provocată de unii compuși amari ai căror receptor/ri de amar cu care interacționează nu au fost încă elucidati.

[0006] De asemenea, mai specific, invenția prevede descoperirea faptului că acest compus antagonist reduce gustul amar al salicinei, un antagonist al hT2R16 și al feniltioureei, un agonist al hT2R51.

[0007] De asemenea, mai specific, această invenție prevede dezvăluirea faptului că acest același compus antagonist blochează gustul amar provocat de compușii amari care activează receptorii multipli de gust amar, inclusiv omeprazolul care activează hT2R10, 14 și 75; Rebaudioside A, un îndulcitor natural care activează cel puțin 7 receptori de gust amar și că acest același antagonist mai inhibă, de asemenea, gustul amar provocat de compușii amari unde receptorul/rii de amar cu care ei interacționează este necunoscut, inclusiv dextrometorfan și difenhidramină.

[0008] Pe baza acestora, invenția se referă la utilizarea acestui compus în alimente, băuturi, medicamente și alte produse ingerabile pentru a atenua gustul amar al acestora, inclusiv gustul amar provocat de liganzi de amar neidentificați sau compuși în care amărăciunea implică activarea receptorilor de amar multipli sau pentru compușii amari unde specificitatea receptorului acestora este nedeterminată.

[0009] De asemenea, pe baza acestora, invenția se referă la utilizarea acestui antagonist pentru a elucida un motiv conservat prezent în diferite T2R umane care este implicat în legarea ligandului și activarea T2R și proiectarea receptorilor chimerici și cuplați cu proteina G care a suferit mutații (GPCR), care sunt proiectate să conțină acest motiv.

[0010] În plus, invenția se referă la oricare dintre compușii identificați folosind aceste analize de screening și la utilizarea acestora la alimente, băuturi și medicamente, inclusiv cafea și alimente, băuturi și medicamente cu aromă de cafea.

STADIUL TEHNICII

[0011] Una dintre modalitățile de gust de bază pe care oamenii le pot recunoaște este amarul. Fiziologia gustului amar, până destul de recent, a fost foarte slab înțeleasă. Studii recente au început să lumineze biologia gustului (Lindemann, Nature (2001)). În prezent, este cunoscut faptul că mulți compuși amari produc gustul amar prin interacțiunea cu receptorii de la suprafața celulară. Acești receptori aparțin familiei de șapte receptori din domeniul transmembranar pe care interacționează cu proteinele intracelulare G. O nouă familie de GPCR, numite T2R, a fost identificată la om și la rozătoare (Adler și colab., Cell 100(6) :693-702 (2000); Chandrashekar și colab., Cell 100(6): 703-711 (2000); Matsunami H, Montmayeur JP, Buck L B. Nature 404(6778): 601-4 (2000)). Înaintea invenției de față, mai multe linii de probe au sugerat că T2R mediază răspunsuri la compușii amari. În primul rând, genele T2R sunt exprimate în mod specific în subgrupul celulelor receptoare de gust ale epiteliului limbii și palatului. În al doilea rând, gena pentru unul dintre T2R (hT2R1) umani este situat într-un locus cromozomial care este legat de sensibilitatea la compusul amar 6-n-propil-2-tiouracil la om (Adler și colab., (Id.) (2000)). În al treilea rând, unul dintre T2R de șoarece (mT2R5) este situat într-un locus cromozomial care este legat de sensibilitatea la compusul amar cicloheximide la șoareci. De asemenea, s-a demonstrat că mT2R5 pot activa gustducin, proteina G exprimată în mod specific în celulele de gust și legate de transducția stimulilor amari (Wong și colab., Nature 381:796-800 (1996)). Activarea gustducinului de mT2R5 apare numai

ca răspuns la cicloheximida (Chandrashekar și colab., (Id.) (2000). Astfel, s-a propus/presupus că familia mT2R mediază răspunsul gustului amar la șoareci, în timp ce familia hT2R mediază răspunsul gustului amar la om. S-a sugerat că doar un singur T2R uman sunt identificat ligandul de amar – s-a demonstrat că hT2R4 este activat de denatoniu (Chandrashekar și colab., (Id.) 2000). Totuși, concentrațiile eficiente de denatoniu utilizate în studiu (1.5 mM) au fost neobișnuit de ridicate, adică au fost de 10^5 ori mai mari decât pragul amar raportat pentru denatoniu la oameni (Saroli, Naturwissenschaften 71:428-429 (1984)). Astfel, nici un ligand de amar specific nu a fost potrivit în mod convingător pentru orice hT2R. De asemenea, s-a sugerat că fiecare hT2R este capabil să lege mai mulți liganzi de amar. Această ipoteză se bazează pe faptul că familia hT2R constă numai din 25 de membri identificați, în timp ce oamenii pot recunoaște sute de compuși diferiți ca amari. Secvențele de hT2R au fost raportate anterior și sunt dezvăluite în cererile PCT publicate de Zuker și colab. (WO 01/18050 A2, (2001)) și Adler și colab. (WO 01/77676 A1 (2001)), ambele fiind încorporate aici prin referință în integralitatea lor.

[0012] Una din dificultățile pentru studiul funcției T2R este că acești receptori nu sunt ușor exprimați în culturile de linii celulare de mamifere. Pentru a îmbunătăți expresia T2R, o secvență N-terminală din GPCR bine exprimată, rodopsina, a fost anexată la secvențele T2R (Chandrashekar și colab., (Id.) 2000). Această etichetă N-terminală a permis, de asemenea, monitorizarea ușoară a expresiei proteinei datorită anticorpului disponibil. În plus, eticheta SSTR3 (Bufe și colab., Nat. Genet. 32:397-400 (2002)), o altă etichetă N-terminală a fost utilizată pentru a îmbunătăți expresia T2R. Întrucât încorporarea etichetei rodopsina a îmbunătățit expresia unor T2R în liniile celulare de mamifer, multe dintre ele încă nu s-au exprimat destul de bine pentru studii funcționale. Într-o abordare diferită, mT2R5 a fost exprimat cu succes în celulele Sf9 de insecte și a fost utilizat pentru studii de funcționale folosind analize de legare GTPγS biochimice (Chandrashekar și colab., (Id.) 2000).

[0013] În cererea de brevet anterioară a solicitanților, Cererea U.S. Ser. Nr. 09/825882, acum Brevetul U.S. No. 7,105,650, solicitanții au identificat și furnizat secvențe de acid nucleic și secvențe de polipeptide pentru un număr de receptori de gust umani (atunci)noi inclusiv hT2R51, hT2R54, hT2R55, hT2R61, hT2R63, hT2R64, hT2R65, hT2R67, hT2R71 și hT2R75. În plus, în Cererile U.S. Ser. Nos.

11/182,942 și 10/628,464, care sunt încorporate integral prin referință aici, Solicitanții au furnizat polipeptida și secvența de ADN pentru un alt receptor de gust uman nou identificat numit în aceasta hT2R76.

[0014] De asemenea, în Cererea U.S. Ser. Nr. 10/191,058 incorporată prin referință aici în integralitatea sa, Solicitanții au dezvăluit liganzi care activează în mod specific trei T2R diferiți umani. În plus, Solicitanții au depus recent Cererea U.S. Ser. Nr. 11/455,693, incorporată prin referință aici în integralitatea sa, care a mai identificat liganzi de amar care se leagă în mod specific de alte T2R umane și au furnizat ca analizele conexe.

[0015] De asemenea, cu privire la utilitățile practice ale invenției, s-a raportat că atât receptorii de gust T2R, cât și T1Rs sunt exprimați în sistemul gastrointestinal. De exemplu, Wu și colab., Proc. Natl. Acad. Sci, SUA 99(4):2392-7(2002) raportează că T2R sunt exprimate în celule enterendocrine (celule STC1), precum și în subunități gustducin și transducin și că aceste celule răspund probabil la liganzii de amar în tractul gastrointestinal. De asemenea, s-a raportat de către Chen și colab., AM J. Physiol. Cell Physiol. 291(4):C726-39 (2006) că stimulii gustului amar induc Ca⁺⁺ semnalizând și eliberarea colecistochininei (CCK) în celulele STC-1 enterendocrine. De asemenea, Rozengurt, AJ Physiol Gastrointest Liver Physiol 291(2):G171-7 (2006) raportează că receptorii de gust în intestin joacă probabil un rol în percepția moleculară a controlului funcțiilor digestive și căilor hormonale și/sau neuronale și că acestea pot juca un rol în detectarea medicamentelor dăunătoare și a răspunsurilor de supraviețuire. În plus, Sternini Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol. 292(2): G457-61 (2007) raportează că receptorii de gust în intestin pot fi implicați în funcțiile gastrointestinale cum ar fi percepția moleculară, absorbția nutrienților, protecția față de substanțele nocive și sugerează în continuare că o înțelegere a acestor mecanisme poate fi relevantă pentru stările și condițiile de boală, cum ar fi tulburările de hrănire și inflamația. În plus, a fost sugerat recent de Mace și colab., J Physiol. 2007 (Epub), că T2R și T1Rs activează fosfolipaza C beta 2, PLC beta2 și că există probabil un sistem de detectare intestinală moleculară în intestin similar cu cel prezent în celulele linguale și că celulele gastrointestinale cum ar fi celulele perie sau celulele solitare chemosenzoriale care exprimă receptorii de gust pot avea ca rezultat

creșterea GLUT2 și pot juca un rol în detecția substanțelor nutritive și în nutriție în tratamentul obezității și al diabetului. De asemenea, Cui și colab., Curr Pharm Des. 12(35):4591-600 (2006) sugerează că T1Rs exprimate în intestin pot fi utilizate în analizele compușilor pentru tratarea obezității și a diabetului, precum și ale îndulcitorilor artificiali.

[0016] Totuși, fără a ține cont de ceea ce a fost raportat și de înțelegerea faptului că membrii T2R reglează gustul amar și rolul lor posibil în funcțiile gastrointestinale, este nevoie de identificarea liganzilor specifici care activează receptorii de gust amar T2R umani. O mai bună înțelegere a proprietăților de legare ale diferitelor T2R, în special T2R umane, ar fi extrem de benefică, deoarece va facilita mai mult utilizarea acestora în selectarea compușilor având proprietăți modulatorie de gust dorite, adică ce blochează sau inhibă gustul compușilor amari specifici. De asemenea, acesta va furniza identificarea compușilor pentru tratarea și modularea funcțiilor gastrointestinale și a bolilor asociate cum ar fi obezitatea, diabetul, absorbția alimentelor, detecția alimentelor, tulburările de alimentație și reglarea hormonilor conecși și peptidelor cum ar fi GLUT2, colecistokina și altele.

DESCRIEREA PE SCURT A INVENȚIEI

[0017] În acest scop, prezenta invenție se referă la descoperirea faptului că hT2R8 și hT2R14 sunt activate de un fracțiune de cafea îmbogățită cu amar.

[0018] De asemenea, prezenta invenție se referă la utilizarea acestora pentru identificarea antagoniștilor pentru hT2R8 și hT2R14 care inhibă sau blochează gustul amar al cafelei și al alimentelor, băuturilor și medicamentelor asociate cu cafea.

[0019] În plus, invenția se referă la compusul antagonist specific (blocantul de amar) care inhibă gustul amar al cafelei și al altor alimente, băuturi și medicamente cu aromă de cafea.

[0020] De asemenea, această invenție se referă la descoperirea unui ligand care sunt largi proprietăți antagoniste pentru amar, adică blochează sau inhibă în mod

apreciabil activarea multor (13) receptori diferiți de amar printr-un set divers de liganzi de amar și blochează sau inhibă activarea altor șase receptori de gust amar, inhibând de asemenea și amărăciunea provocată de unii compuși amari ai căror receptor/ri de amar cu care interacționează nu au fost încă elucidati.

[0021] Mai specific, această invenție se referă la descoperirea unui ligand menționat aici drept compus C care sunt largi proprietăți antagoniste pentru amar, adică blochează sau inhibă în mod apreciabil activarea receptorilor de gust amar hT2R3, 7, 10, 14, 16, 44, 51, 55, 61, 63, 64, 65 și 71 printr-un set divers de liganzi pentru amar și blochează sau inhibă activarea altor șase receptori de gust amar, adică hT2R5, 9, 13, 54, 67 și 75, inhibând de asemenea și amărăciunea provocată de unii compuși amari ai căror receptor/ri de amar cu care interacționează nu au fost încă elucidati.

[0022] De asemenea, mai precis, invenție prevede descoperirea faptului că acest compus antagonist reduce gustul amar al salicinei, un antagonist al hT2R16 și al feniltioureei, un agonist al hT2R51.

[0023] De asemenea, mai specific, această invenție prevede descoperirea faptului că acest același compus antagonist blochează gustul amar provocat de compușii amari care activează receptorii de gust amar multipli, inclusiv omeprazolul, un compus care activează hT2R10, 14 și 75; Rebaudioside A, un îndulcitor natural care activează cel puțin 7 receptori de gust amar; și că acest același compus antagonist mai inhibă, de asemenea, gustul amar provocat de compușii amari, unde receptorul/rii de amar cu care aceștia interacționează este necunoscut, inclusiv dextrometorfan și diphenhydramin.

[0024] Pe această bază, invenția se referă la utilizarea acestui compus și a compușilor conecși în conform invenției în alimente, băuturi, medicamente și alte produse ingerabile pentru a atenua gustul amar al acestora, inclusiv gustul amar provocat de compușii sau liganzii pentru amar neidentificați, în care amărăciunea implică activarea receptorilor pentru amar multipli sau a compușilor amari a căror specificitate a receptorului este nedeterminată.

[0025] De asemenea, prezenta invenție se referă la alimente, băuturi și medicamente care conțin o cantitate din cel puțin unul dintre compușii antagoniști pentru amar identificați suficienti pentru a inhiba sau a bloca gustul amar a acestora.

[0026] Descoperirile invenției au fost făcute utilizând analize bazate pe celule care au măsurat activitatea T2R folosind celule care exprimă o T2R particulară în prezența și absența liganzilorlor penru amar. În particular, așa cum este descris mai detaliat mai jos, liniile celulare HEK care exprimă T2R specifice identificate mai sus pe suprafața lor și care exprimă și o proteină G himeră care se cuplează funcțional la T2R menționate, au fost folosite în analizele bazate pe celule care au detectat modificările concentrațiilor calciului intracelular și s-a găsit că sunt activate în mod specific de compușii amari specifici, în timp ce alte hT2R nu au fost activate în condiții similare.

[0027] Prin urmare, invenția cuprinde utilizarea acestor receptori de gust umani în analize, de preferință analize cu grad ridicat înalt de procesabilitate, pentru a identifica alți compuși care modulează, de preferință blochează activarea acestor receptori de către acești compuși și de către alți compuși amari prezenți în cafea și alimentele și băuturile conexe.

[0028] De asemenea, invenția se referă la utilizarea acestor receptori pentru a identifica compușii particulari prezenți în cafea și în alimentele, băuturile și medicamentele cu aromă de cafea care provoacă un gust amar.

[0029] De asemenea, invenția se referă la utilizarea unui compus antagonist care posedă proprietăți antagoniste dintr-o gamă largă pentru utilizare în analizele in vitro și în testele de gust in vivo pentru a identifica compus(șii) amari sau fracțiunile amare pentru care acest compus inhibă gustul amar provocat astfel și/sau inhibă activarea unuia sau mai multor receptori de gust amar de către compusul amar sau o fracțiune care conține acest compus amar.

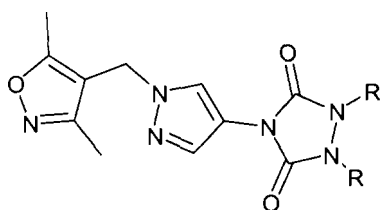
[0030] În plus, invenția se referă în mod specific la utilizarea acestui antagonist cu acțiune largă care acționează în alimente, băuturi, medicamente și alte produse

consumate pentru ingestie de către oameni sau animale, unde gustul amar este atenuat în modul dorit.

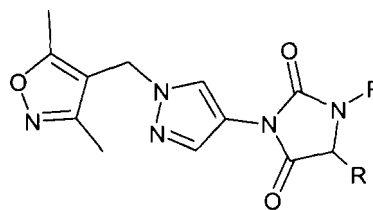
[0031] Invenția cuprinde, de asemenea, analize care includ o etapă suplimentară care evaluează efectul compușilor modulatori identificați în teste de gust umane sau de alt tip și, în particular, evaluează efectul compușilor identificați asupra gustului amar, gust amar provocat în special de cafeaua și fracțiunile derivate din cafea care conțin unul sau mai multe compuși care provoacă o percepție de gust amar.

[0032] În plus, invenția cuprinde producția de cafea și alimente, băuturi și medicamente cu aromă de cafea care au fost tratate pentru a elimina compușii care activează în mod specific acești receptori de gust amar, de exemplu, alimente și băuturi care au fost procesate pentru a elimina sau a reduce cantitatea de compuși amari cuprinși în acestea.

[0033] În unele aspecte, invenția se referă, de asemenea, la clase structurale de compuși reprezentate de cele două structuri date mai jos. Structura 1 prezintă o structură de urazol reprezentativ și structura 2 prezintă o structură de hidantoină reprezentativ.



Structura 1



Structura 2

[0034] Un alt obiect specific al invenției este utilizarea compușilor arătați mai sus și analogii structurii 1 și ai structurii 2 ca blocați pentru gustul amar pentru a reduce gustul amar în aplicațiile alimentare/farmaceutice care sunt mediate de receptorii T2R8, în special cafea și alimente, băuturi și medicamente cu aromă de cafea.

[0035] Un alt obiect al invenției este să confirme că compușii identificați modulează, de preferință inhibă sau blochează gustul amar, de exemplu cel provocat de cafea și

alimentele, băuturile și medicamentele cu aromă de cafea în testele de gust umane sau animale, de preferință testele de gust umane. Exemplul 1 arată datele senzoriale reprezentative pentru unul dintre acești compuși. Datele demonstrează în mod clar o scădere semnificativă a gustului amar pentru un agonist T2R8 specific și o creștere semnificativă a potenței pentru un blocant de gust amar cunoscut T2R8.

[0036] Un alt obiect al invenției este să folosească compușii descriși aici ca aditivi sau modulatori de aromă în compoziții pentru a inhiba sau a bloca gustul amar provocat de compușii care activează în mod specific acești receptori de gust. Un obiect preferat al invenției este de a utiliza un compus care inhibă activarea receptorilor T2R8 pentru a bloca gustul amar al compușilor prezenți în cafea și alimente, băuturi și medicamente cu aromă de cafea.

[0037] Compuși identificați conform invenției pot fi adăugați la compoziții de alimente, băuturi, cosmetice sau medicamente pentru a modula, de preferință a bloca gustul amar declanșat de activarea hT2R8 de către compușii amari prezenți în cafea și în alimentele, băuturile și medicamentele conexe sau compușii legați structural sau alți compuși amari, de exemplu, compușii aflați în alimente și băuturi sau medicamente sau cosmetice care provocă o percepție de gust amar.

OBIECTELE INVENȚIEI

[0038] Un obiect al invenției este de a furniza teste care utilizează hT2R8 și/sau hT2R14 și himeri și variante ale acestora care identifică compușii și compozițiile care provoacă sau blochează gustul amar asociat cafelei și alimentelor, băuturilor și medicamentelor cu aromă de cafea.

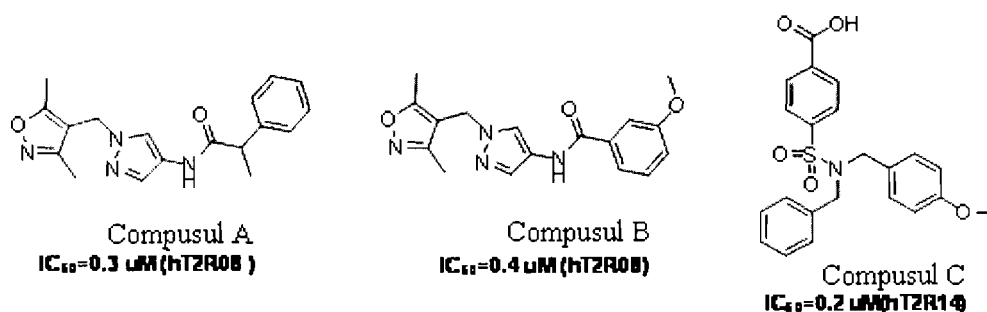
[0039] Un obiect specific al invenției este de a furniza teste care identifică compușii care activează sau care blochează sau modulează activarea și/sau legarea hT2R8 la compușii sau compozițiile care conțin produși responsabili pentru gustul amar al cafelei.

[0040] Este, de asemenea, un obiect specific al invenției acela de a oferi teste care identifică compușii care activează sau care blochează sau modulează activarea

și/sau legarea hT2R14 la compușii sau compozițiile care conțin produși responsabili pentru gustul amar al cafelei.

[0041] Un alt obiect specific al invenției este acela de a furniza compușii specifici identificați utilizând analizele invenției și compozițiile care conțin în special cafea și alimente, băuturi și medicamente cu aromă de cafea.

[0042] Un obiect specific al invenției este acela de a furniza compușii de mai jos care sunt antagoniștii T2R8 și T2R14 despre care s-a dovedit că blochează gustul amar al cafelei.

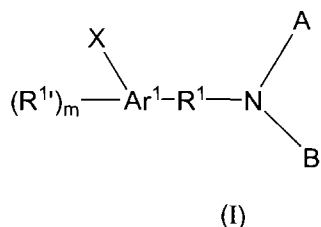


[0043] Un alt obiect specific al invenției este utilizarea compușilor arătați mai sus și a analogilor Compusului A, Compusului B și Compusului C ca blocați ai gustului amar pentru a reduce gustul amar în aplicațiile alimentare/farmaceutice, care este mediată de receptori T2R8 și/sau T2R14, în special cafeaua și alimentele, băuturile și medicamentele cu aromă de cafea.

[0044] Un alt obiect specific al invenției este utilizarea Compusului C și a analogilor acestuia ca blocați ai gustului amar cu acțiune largă pentru a reduce gustul amar în aplicațiile alimentare/farmaceutice, care este mediată de către oricare dintre T2R3, 7, 10, 14, 16, 44, 51, 55, 61, 63, 64, 65 sau 71 umani și/sau T2R5, 9, 13, 54, 67 sau 75 umani, în special în alimente, băuturi și medicamente care conțin compuși amari multipli, compuși amari care interacționează cu multipli receptori de gust amar sau compoziții care conțin compuși amari necunoscuți sau compuși amari în care specificitatea lor receptoare este necunoscută.

[0045] Un alt obiect specific al invenției este furnizarea compuşilor care pot fi reprezentați prin următoarele formule.

[0046] Într-un prim aspect, este prevăzut un compus cu formula structurală (I):



sau o sare, hidrat, solvat sau N-oxid al acestuia în care:

Ar^1 este un ciclu aril, heteroaril sau cicloalchil cu cinci sau șase atomi;

m este 0, 1, 2 sau 3;

R^1 este SO_2 ; $\text{C}=\text{O}$; $\text{C}=\text{S}$; sau $\text{C}=\text{NOR}^4$;

X este selectat din grupul constând din hidrogen, halogen, alchil, alchil substituit, aril, aril substituit, arilalchil, arilalchil substituit, acil, acil substituit, heteroalchil, heteroalchil substituit, heteroaril, heteroaril substituit, heteroarilalchil, heteroarilalchil substituit, CN , NO_2 , OR^6 , $\text{S}(\text{O})_b\text{R}^6$, NR^6R^7 , CONR^6R^7 , CO_2R^6 , $\text{NR}^6\text{CO}_2\text{R}^7$, $\text{NR}^6\text{CONR}^7\text{R}^8$, $\text{NR}^6\text{CSNR}^7\text{R}^8$, $\text{NR}^6\text{C}(=\text{NH})\text{NR}^7\text{R}^8$, $\text{SO}_2\text{NR}^5\text{R}^6$, $\text{NR}^5\text{SO}_2\text{R}^6$, $\text{NR}^5\text{SO}_2\text{NR}^6\text{R}^7$, $\text{B}(\text{OR}^5)(\text{OR}^6)$, $\text{P}(\text{O})(\text{OR}^5)(\text{OR}^6)$ și $\text{P}(\text{O})(\text{R}^5)(\text{OR}^6)$;

fiecare $\text{R}^{1'}$ este selectat în mod independent din grupul constând din hidrogen, halogen, alchil, alchil substituit, aril, aril substituit, arilalchil, arilalchil substituit, acil, acil substituit, heteroalchil, heteroalchil substituit, heteroaril, heteroaril substituit, heteroarilalchil, heteroarilalchil substituit, CN , NO_2 , OR^6 , $\text{S}(\text{O})_b\text{R}^6$, NR^6R^7 , CONR^6R^7 , CO_2R^6 , $\text{NR}^6\text{CO}_2\text{R}^7$, $\text{NR}^6\text{CONR}^7\text{R}^8$, $\text{NR}^6\text{CSNR}^7\text{R}^8$, $\text{NR}^6\text{C}(=\text{NH})\text{NR}^7\text{R}^8$, $\text{SO}_2\text{NR}^5\text{R}^6$, $\text{NR}^5\text{SO}_2\text{R}^6$, $\text{NR}^5\text{SO}_2\text{NR}^6\text{R}^7$, $\text{B}(\text{OR}^5)(\text{OR}^6)$, $\text{P}(\text{O})(\text{OR}^5)(\text{OR}^6)$ și $\text{P}(\text{O})(\text{R}^5)(\text{OR}^6)$;

sau în mod alternativ, X și/sau cel puțin un $\text{R}^{1'}$ împreună cu atomii la care sunt legați formează un ciclu aril, aril substituit, heteroaril, heteroaril substituit, cicloalchil, cicloalchil substituit, cicloheteroalchil sau cicloheteroalchil substituit în care ciclul este condensat opțional cu un alt ciclu aril, aril substituit, heteroaril, heteroaril substituit, cicloalchil, cicloalchil substituit, cicloheteroalchil sau cicloheteroalchil substituit;

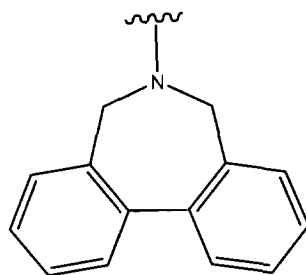
R^4 - R^8 sunt selectați în mod independent din grupul constând din hidrogen, alchil, alchil substituit, aril, aril substituit, arilalchil, arilalchil substituit, heteroalchil,

heteroalchil substituit, heteroaril, heteroaril substituit, heteroarilalchil și heteroarilalchil substituit sau în mod alternativ, R^5 și R^6 , R^6 și R^7 , R^7 și R^8 , împreună cu atomii de care sunt legați formează un ciclu cicloheteroalchil sau cicloheteroalchil substituit;

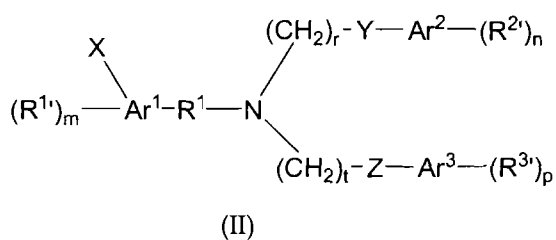
A și B sunt selectați în mod independent din grupul constând din hidrogen, alchil, alchil substituit, aril, aril substituit, arilalchil, arilalchil substituit, acil, acil substituit, heteroalchil, heteroalchil substituit, heteroaril, heteroaril substituit, heteroarilalchil, heteroarilalchil substituit; și

b este 0, 1 sau 2.

[0047] În unele forme de realizare, A și B, împreună cu atomul de azot la care sunt atașate, formează un inel care poate fi condensat cu cicluri adiționale substituite sau nesubstituite și pot să cuprindă cel puțin o legătură dublă. Un exemplu nelimitativ de astfel de cicluri include o grupare având formula:



[0048] În al doilea aspect, invenția prevede compușii cu formula structurală (II) prezentați mai jos:



sau o sare, hidrat, solvat sau N-oxid al acestora în care:

Ar^1 , Ar^2 și Ar^3 sunt în mod independent un ciclu aril, heteroaril sau cicloalchil cu cinci sau șase atomi;

m este 0, 1, 2 sau 3;

n și p sunt în mod independent 0, 1, 2, 3 sau 4;

r și t sunt în mod independent 0, 1 sau 2;

Y și Z sunt în mod independent selectați din grupul constând din CR^6R^7 , $\text{C}=\text{O}$, $\text{C}=\text{S}$, $\text{C}=\text{NOR}^6$, O, NR^6 și $\text{S}(\text{O})_b$;

R^1 este selectat din grupul constând din SO_2 , $C=O$, $C=S$ și $C=NOR^4$;

X poate fi selectat din grupul constând din hidrogen, alchil, alchil substituit, aril, aril substituit, arilalchil, arilalchil substituit, acil, acil substituit, heteroalchil, heteroalchil substituit, heteroaril, heteroaril substituit, heteroarilalchil, heteroarilalchil substituit, CN , NO_2 , $-OR^6$, $S(O)_bR^6$, NR^6R^7 , $CONR^6R^7$, CO_2R^6 , $NR^6CO_2R^7$, $NR^6CONR^7R^8$, $NR^6CSNR^7R^8$, $NR^6C(=NH)NR^7R^8$, $SO_2NR^5R^6$, $NR^5SO_2R^6$, $NR^5SO_2NR^6R^7$, $B(OR^5)(OR^6)$, $P(O)(OR^5)(OR^6)$ și $P(O)(R^5)(OR^6)$;

X este preferabil selectat din grupul constând din hidrogen, heteroalchil, heteroalchil substituit, heteroaril, heteroaril substituit, heteroarilalchil, heteroarilalchil substituit, CN , $S(O)_bR^6$, $CONR^6R^7$, $-CO_2R^6$, $SO_2NR^5R^6$, $NR^5SO_2R^6$, $NR^5SO_2NR^6R^7$, $B(OR^5)(OR^6)$, $P(O)(OR^5)(OR^6)$ și $P(O)(R^5)(OR^6)$.

fiecare R^{1a} este selectat în mod independent din grupul constând din hidrogen, halogen, alchil, alchil substituit, aril, aril substituit, arilalchil, arilalchil substituit, acil, acil substituit, heteroalchil, heteroalchil substituit, heteroaril, heteroaril substituit, heteroarilalchil, substituit heteroarilalchil, CN , NO_2 , OR^6 , $S(O)_bR^6$, NR^6R^7 , $CONR^6R^7$, CO_2R^6 , $NR^6CO_2R^7$, $NR^6CONR^7R^8$, $NR^6CSNR^7R^8$, $NR^6C(=NH)NR^7R^8$, $SO_2NR^5R^6$, $NR^5SO_2R^6$, $NR^5SO_2NR^6R^7$, $B(OR^5)(OR^6)$, $P(O)(OR^5)(OR^6)$ și $P(O)(R^5)(OR^6)$;

fiecare R^{2a} este selectat în mod independent din grupul constând din hidrogen, halogen, alchil, alchil substituit, aril, aril substituit, arilalchil, arilalchil substituit, acil, acil substituit, heteroalchil, heteroalchil substituit, heteroaril, heteroaril substituit, heteroarilalchil, heteroarilalchil substituit, CN , NO_2 , OR^6 , $S(O)_bR^6$, NR^6R^7 , $CONR^6R^7$, CO_2R^6 , $NR^6CO_2R^7$, $NR^6CONR^7R^8$, $NR^6CSNR^7R^8$, $NR^6C(=NH)NR^7R^8$, $SO_2NR^5R^6$, $NR^5SO_2R^6$, $NR^5SO_2NR^6R^7$, $B(OR^5)(OR^6)$ și $P(O)(OR^5)(OR^6)$;

fiecare R^{3a} este selectat în mod independent din grupul constând din hidrogen, halogen, alchil, alchil substituit, aril, aril substituit, arilalchil, arilalchil substituit, acil, acil substituit, heteroalchil, heteroalchil substituit, heteroaril, heteroaril substituit, heteroarilalchil, heteroarilalchil substituit, CN , NO_2 , OR^6 , $S(O)_bR^6$, NR^6R^7 , $CONR^6R^7$, CO_2R^6 , $NR^6CO_2R^7$, $NR^6CONR^7R^8$, $NR^6CSNR^7R^8$, $NR^6C(=NH)NR^7R^8$, $SO_2NR^5R^6$, $NR^5SO_2R^6$, $NR^5SO_2NR^6R^7$, $B(OR^5)(OR^6)$, $P(O)(OR^5)(OR^6)$ și $P(O)(R^5)(OR^6)$;

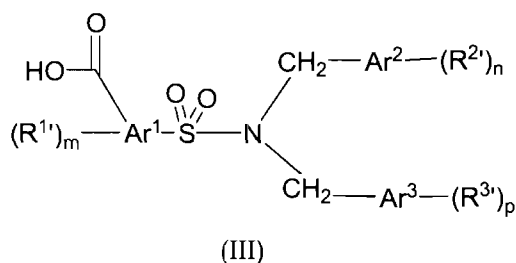
sau în mod alternativ, X și/sau cel puțin unul dintre R^{1a} împreună cu atomii la care sunt legați formează un aril, aril substituit, heteroaril, heteroaril substituit, cicloalchil, cicloalchil substituit, cicloheteroalchil sau cicloheteroalchil substituit ciclu în care ciclul este în mod opțional condensat cu ciclu alt aril, aril substituit, heteroaril,

heteroaril substituit, cicloalchil, cicloalchil substituit, cicloheteroalchil sau cicloheteroalchil substituit;

R^4 - R^8 sunt în mod independent hidrogen, alchil, alchil substituit, aril, aril substituit, arilalchil, arilalchil substituit, heteroalchil, heteroalchil substituit, heteroaril, heteroaril substituit, heteroarilalchil sau heteroarilalchil substituit sau în mod alternativ, R^5 și R^6 , R^6 și R^7 , R^7 și R^8 , împreună cu atomii la care sunt legați formează un ciclu cicloheteroalchil sau cicloheteroalchil substituit;

b este 0, 1 sau 2.

[0049] Într-un alt aspect, invenția prevede compuși cu formula structurală (III) prezentați mai jos:



sau o sare, hidrat, solvat sau N-oxid a acestora, în care:

Ar^1 , Ar^2 și Ar^3 sunt în mod independent un ciclu aril, heteroaril sau cicloalchil cu cinci sau șase atomi și Ar^2 și Ar^3 poate fi omis în mod opțional;

m este 0, 1, 2 sau 3;

n și p sunt în mod independent 0, 1, 2, 3 sau 4;

fiecare $R^{1'}$ este în mod independent selectat din grupul constând din hidrogen, halogen, alchil, alchil substituit, aril, aril substituit, arilalchil, arilalchil substituit, acil, acil substituit, heteroalchil, heteroalchil substituit, heteroaril, heteroaril substituit, heteroarilalchil, heteroarilalchil substituit, CN, NO_2 , OR^6 , $S(O)_bR^6$, NR^6R^7 , $CONR^6R^7$, CO_2R^6 , $NR^6CO_2R^7$, $NR^6CONR^7R^8$, $NR^6CSNR^7R^8$, $NR^6C(=NH)NR^7R^8$, $SO_2NR^5R^6$, $NR^5SO_2R^6$, $NR^5SO_2NR^6R^7$, $B(OR^5)(OR^6)$, $P(O)(OR^5)(OR^6)$ și $P(O)(R^5)(OR^6)$;

fiecare $R^{2'}$ este în mod independent selectat din grupul constând din hidrogen, halogen, alchil, alchil substituit, aril, aril substituit, arilalchil, arilalchil substituit, acil, acil substituit, heteroalchil, heteroalchil substituit, heteroaril, heteroaril substituit, heteroarilalchil, heteroarilalchil substituit, CN, NO_2 , OR^6 , $S(O)_bR^6$, NR^6R^7 , $CONR^6R^7$,

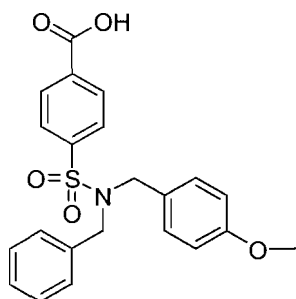
CO_2R^6 , $\text{NR}^6\text{CO}_2\text{R}^7$, $\text{NR}^6\text{CONR}^7\text{R}^8$, $\text{NR}^6\text{CSNR}^7\text{R}^8$, $\text{NR}^6\text{C(=NH)NR}^7\text{R}^8$, $\text{SO}_2\text{NR}^5\text{R}^6$, $\text{NR}^5\text{SO}_2\text{R}^6$, $\text{NR}^5\text{SO}_2\text{NR}^6\text{R}^7$, $\text{B(OR}^5\text{)(OR}^6\text{)}$, $\text{P(O)(OR}^5\text{)(OR}^6\text{)}$ și $\text{P(O)(R}^5\text{)(OR}^6\text{)}$;

fiecare R^{3i} este în mod independent selectat din grupul constând din hidrogen, halogen, alchil, alchil substituit, aril, aril substituit, arilalchil, arilalchil substituit, acil, acil substituit, heteroalchil, heteroalchil substituit, heteroaril, heteroaril substituit, heteroarilalchil, heteroarilalchil substituit, CN, NO_2 , OR^6 , $\text{S(O)}_b\text{R}^6$, NR^6R^7 , CONR^6R^7 , CO_2R^6 , $\text{NR}^6\text{CO}_2\text{R}^7$, $\text{NR}^6\text{CONR}^7\text{R}^8$, $\text{NR}^6\text{CSNR}^7\text{R}^8$, $\text{NR}^6\text{C(=NH)NR}^7\text{R}^8$, $\text{SO}_2\text{NR}^5\text{R}^6$, $\text{NR}^5\text{SO}_2\text{R}^6$, $\text{NR}^5\text{SO}_2\text{NR}^6\text{R}^7$, $\text{B(OR}^5\text{)(OR}^6\text{)}$, $\text{P(O)(OR}^5\text{)(OR}^6\text{)}$ și $\text{P(O)(R}^5\text{)(OR}^6\text{)}$;

R^5R^8 sunt în mod independent hidrogen, alchil, alchil substituit, aril, aril substituit, arilalchil, arilalchil substituit, heteroalchil, heteroalchil substituit, heteroaril, heteroaril substituit, heteroarilalchil sau heteroarilalchil substituit sau în mod alternativ, R^5 și R^6 , R^6 și R^7 , R^7 și R^8 , împreună cu atomii la care sunt legați formează un ciclu cicloheteroalchil sau cicloheteroalchil substituit;

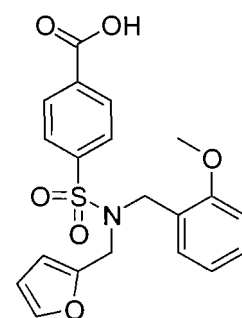
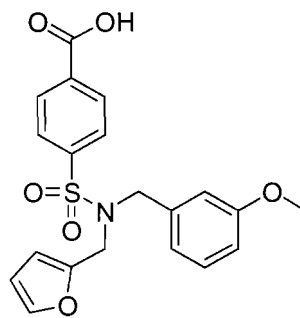
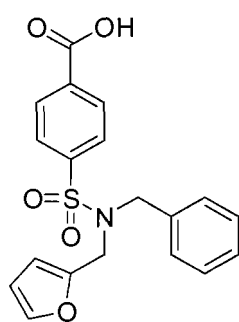
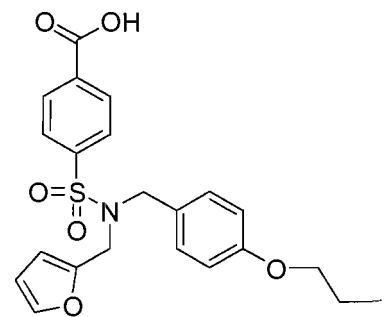
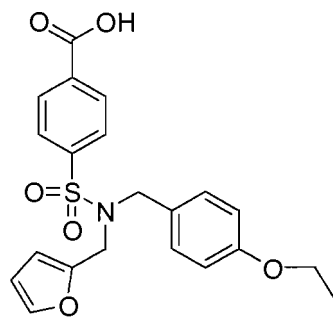
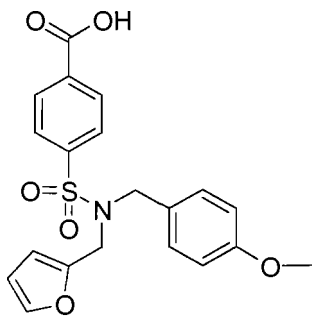
b este 0, 1 sau 2.

[0050] În încă un alt aspect, invenția oferă un compus având structura de mai jos:



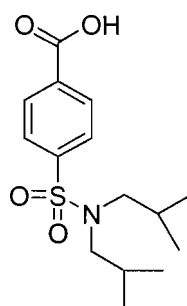
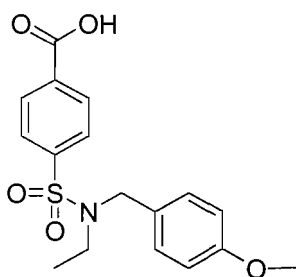
sau o sare, hidrat, solvat sau N-oxid al acestuia.

[0051] În încă un alt aspect, invenția prevede compuși având structura de mai jos:



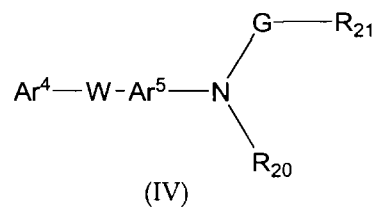
sau o sare, hidrat, solvat sau N-oxid al acestuia.

[0052] În încă alte forme de realizare, invenția prevede compuși având structura de mai jos:



sau o sare, hidrat, solvat sau N-oxid al acestora.

[0053] Într-un aspect conex este furnizat un compus cu formula structurală (IV):



sau o sare, hidrat, solvat sau N-oxid al acestuia în care:

Ar^4 și Ar^5 sunt în mod independent un ciclu aril sau heteroaril cu cinci sau șase atomi;

W este selectat din grupul constând din CR^6R^7 , $C=O$, $C=S$; $C=NOR^6$; O , NR^6 , S , SO , SO_2 și $(CH_2)_n$;

n este 0, 1, 2 sau 3;

G este selectat din grupul constând din CR^6R^7 , $C=O$, $C=S$, $C=NOR^6$ și $S(O)_b$;

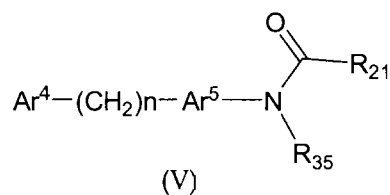
R^{20} este selectat din grupul constând din hidrogen, arilalchenil, heteroarilalchenil, arilalchil, heteroarilalchil, aril, heteroaril, alchil, alcoxi-alchil, alchenil, cicloalchil, cicloalchenil și derivați substituiți;

R^{21} este selectat din grupul constând dintr-un arilalchenil, heteroarilalchenil, arilalchil, heteroarilalchil, aril, heteroaril, alchil, alcoxi-alchil, alchenil, cicloalchil, cicloalchenil și derivați substituiți;

R^6 și R^7 sunt în mod independent selectați din grupul constând din hidrogen, alchil, alchil substituit, aril, aril substituit, arilalchil, arilalchil substituit, heteroalchil, heteroalchil substituit, heteroaril, heteroaril substituit, heteroarilalchil sau heteroarilalchil substituit sau în mod alternativ, R^6 și R^7 , împreună cu atomii la care sunt legați formează un ciclu cicloheteroalchil sau cicloheteroalchil substituit; și

b este 0, 1 sau 2.

[0054] Într-un alt aspect conex, este furnizat un compus cu formula structurală (V):



sau o sare, hidrat, solvat sau N-oxid al acestuia în care:

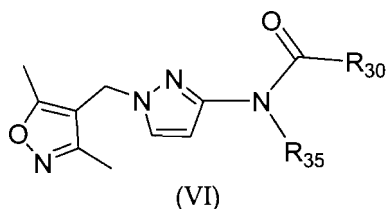
Ar^4 și Ar^5 sunt în mod independent un ciclu aril sau heteroaril cu cinci sau șase atomi;

n este 0, 1, 2 sau 3;

R^{21} este selectat din grupul constând dintr-un arilalchenil, heteroarilalchenil, arilalchil, heteroarilalky, aril, heteroaril, alchil, alcoxi-alchil, alchenil, cicloalchil, cicloalchenil și derivați substituiți;

R^{35} este selectat din grupul constând din hidrogen, alchil și alchil substituit.

[0055] În încă alte forme de realizare suplimentare ale invenției, este furnizat un compus cu formula structurală (VI)

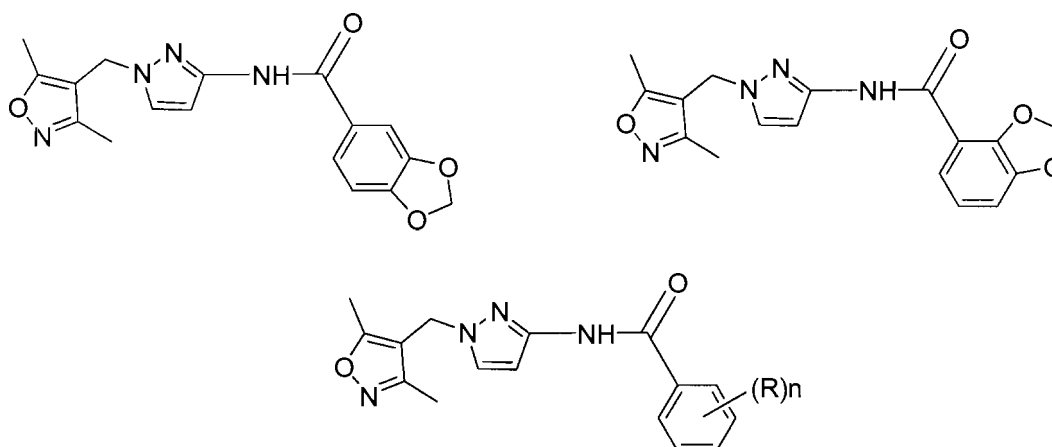


sau o sare, hidrat, solvat sau N-oxid al acestuia în care:

R^{30} este selectat din grupul constând dintr-un arilalchenil, heteroarilalchenil, arilalchil, hereoarilalky, aril, heteroaril, alchil, alcoxi-alchil, alchenil, cicloalchil, cicloalchenil și derivați substituiți;

R^{35} este selectat din grupul constând din hidrogen, alchil și alchil substituit.

[0056] În încă alte forme de realizare suplimentare, invenția prevede compuși având structura de mai jos:

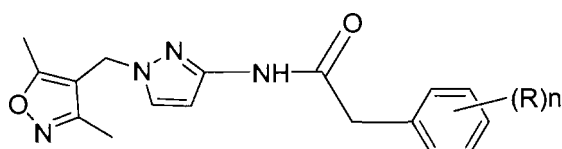


sau o sare, hidrat, solvat sau N-oxid al acestora,

în care fiecare R este în mod independent Cl, MeO, CN, EtO, OH, Me, $-SO_2Me$, F sau H și

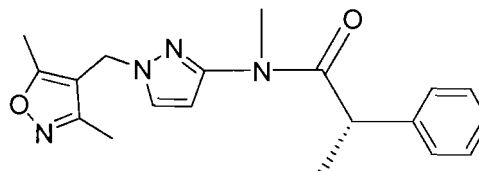
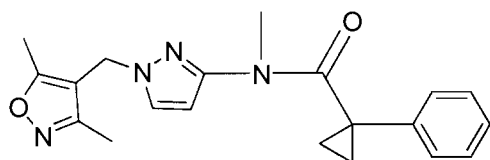
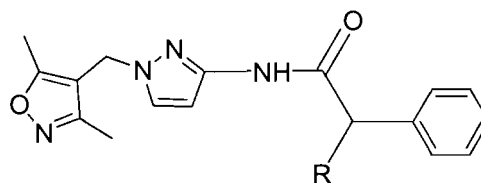
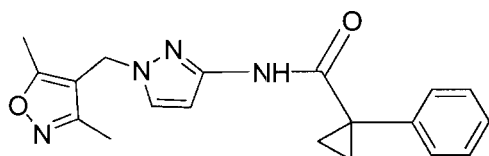
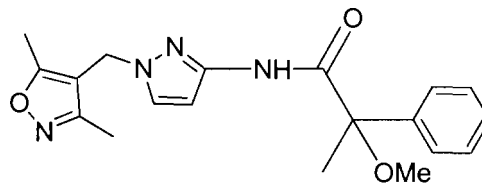
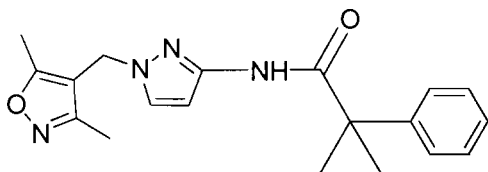
n este 0,1,2,3 sau 4.

[0057] În încă alte forme de realizare, invenția prevede compuși având structura de mai jos:



sau o sare, hidrat, solvat sau N-oxid al acestora,
în care fiecare R este în mod independent MeO sau OH și
n este 0,1,2,3 sau 4.

[0058] În încă alte forme de realizare, invenția prevede compuși având structura de
mai jos:



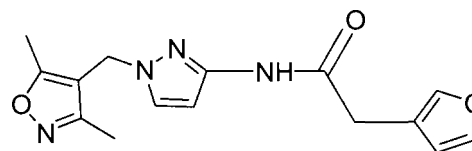
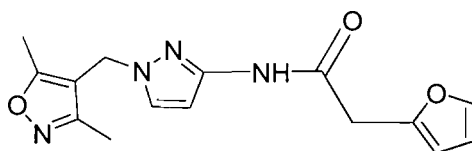
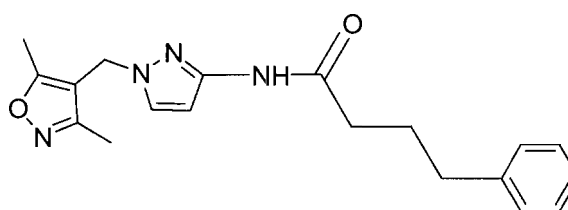
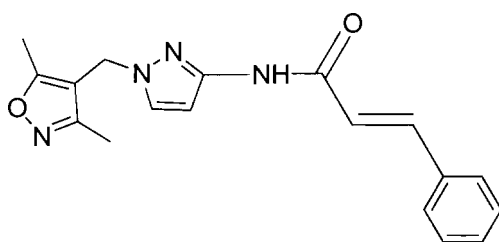
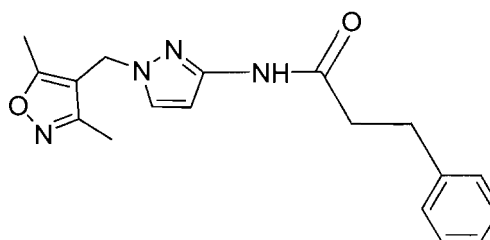
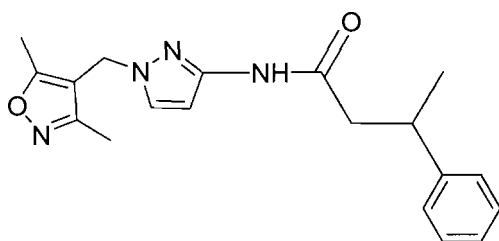
sau o sare, hidrat, solvat sau N-oxid al acestora,
în care R este H, Me, Et, OCOMe, CH₂OH, OMe sau Ph.

Chemical structures of 11 compounds (1-11) are shown, all featuring a 2-methyl-5-methoxy-1,2,4-oxadiazole group linked to a 1H-imidazole-4-carboxamide moiety, which is further substituted with various heterocyclic groups.

- 1: 2-methyl-5-methoxy-1,2,4-oxadiazole-3-ylmethyl-1H-imidazole-4-carboxamide-1-ylpyrrole-2-carboxamide
- 2: 2-methyl-5-methoxy-1,2,4-oxadiazole-3-ylmethyl-1H-imidazole-4-carboxamide-1-ylpyrrole-3-carboxamide
- 3: 2-methyl-5-methoxy-1,2,4-oxadiazole-3-ylmethyl-1H-imidazole-4-carboxamide-1-ylpyrrole-4-carboxamide
- 4: 2-methyl-5-methoxy-1,2,4-oxadiazole-3-ylmethyl-1H-imidazole-4-carboxamide-1-ylpyrrole-5-carboxamide
- 5: 2-methyl-5-methoxy-1,2,4-oxadiazole-3-ylmethyl-1H-imidazole-4-carboxamide-1-ylpyrrole-2-carboxamide
- 6: 2-methyl-5-methoxy-1,2,4-oxadiazole-3-ylmethyl-1H-imidazole-4-carboxamide-1-ylpyrrole-3-carboxamide
- 7: 2-methyl-5-methoxy-1,2,4-oxadiazole-3-ylmethyl-1H-imidazole-4-carboxamide-1-ylpyrrole-4-carboxamide
- 8: 2-methyl-5-methoxy-1,2,4-oxadiazole-3-ylmethyl-1H-imidazole-4-carboxamide-1-ylpyrrole-5-carboxamide
- 9: 2-methyl-5-methoxy-1,2,4-oxadiazole-3-ylmethyl-1H-imidazole-4-carboxamide-1-ylpyrrole-2-carboxamide
- 10: 2-methyl-5-methoxy-1,2,4-oxadiazole-3-ylmethyl-1H-imidazole-4-carboxamide-1-ylpyrrole-3-carboxamide
- 11: 2-methyl-5-methoxy-1,2,4-oxadiazole-3-ylmethyl-1H-imidazole-4-carboxamide-1-ylpyrrole-4-carboxamide

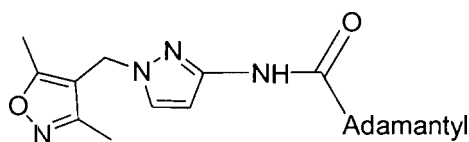
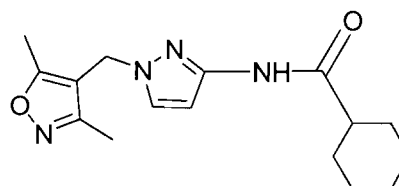
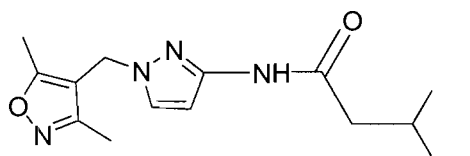
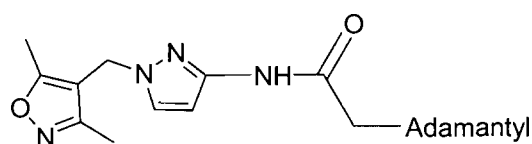
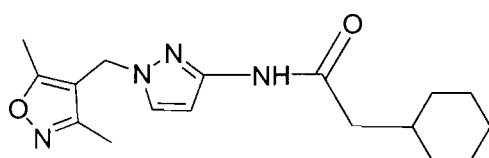
sau o sare, hidrat, solvat sau N-oxid al acestora.

[0060] În încă alte forme de realizare, invenția prevede compuși având structura de mai jos:



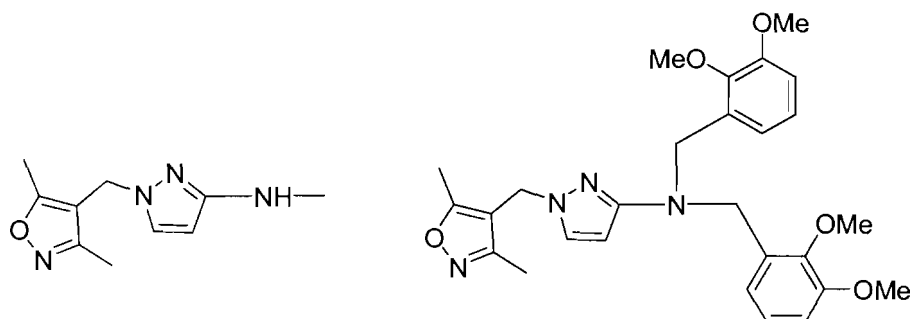
sau o sare, hidrat, solvat sau N-oxid al acestora.

[0061] În încă alte forme de realizare, invenția prevede compuși având structura de mai jos:



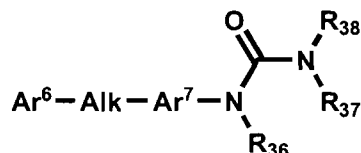
sau o sare, hidrat, solvat sau N-oxid al acestora.

[0062] În încă alte forme de realizare, invenția prevede compuși având structura de mai jos:



sau o sare, hidrat, solvat sau N-oxid al acestora.

[0063] Într-un aspect, invenția se referă la un compus cu formula:



sau o sare, hidrat, solvat, N-oxid sau promedicament al acestuia, în care Ar^6 și Ar^7 sunt, același sau diferit, în mod independent unul de celălalt, o grupare aril cu cinci sau șase atomi sau o grupare heteroaril cu cinci sau șase atomi;

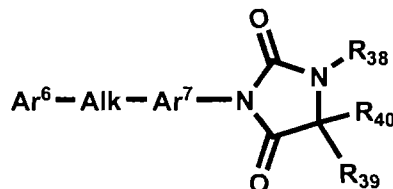
Alk este o grupare alchil, în mod opțional întreruptă de un heteroatom;

R_{36} și R_{37} sunt, același sau diferit în mod independent unul de celălalt, H, alchil sau R_{36} și R_{37} , împreună cu atomii la care sunt atașați, formează un heterociclu cu cinci sau șase atomi opțional substituit; și

R_{38} este H, alchil substituit sau nesubstituit, cicloalchil alchil substituit sau nesubstituit, heterocicloalchil alchil substituit sau nesubstituit, aril substituit sau nesubstituit, arilamidoalchil substituit sau nesubstituit, heteroarilamidoalchil substituit sau nesubstituit, arilalchil substituit sau nesubstituit, arilalcoxi substituit sau nesubstituit, heteroaril substituit sau nesubstituit, heteroarilalchil substituit sau nesubstituit sau haloalchil.

[0064] Într-un aspect, compușii invenției conțin un heterociclu de cinci atomi. Într-o formă de realizare, heterociclu de cinci atomi este o hidantoină sau o uree ciclică substituită sau nesubstituită.

[0065] Într-o formă de realizare, hidantoina este o hidantoină cu formula:



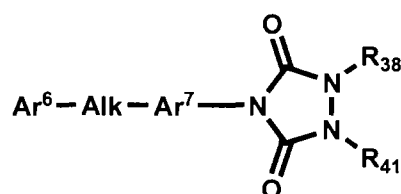
sau o sare, hidrat, solvat, N-oxid sau promedicament a acesteia, în care Ar^6 și Ar^7 sunt, același sau diferit în mod independent unul de celălalt, o grupare aril cu cinci sau șase atomi sau o grupare heteroaril cu cinci sau șase atomi;

Alk este o grupare alchil, în mod opțional întreruptă de un heteroatom;

R_{38} este H, alchil substituit sau nesubstituit, cicloalchil alchil substituit sau nesubstituit, heterocicloalchilalchil substituit sau nesubstituit, aril substituit sau nesubstituit, arilamidoalchil substituit sau nesubstituit, heteroarilamidoalchil substituit sau nesubstituit, arilalchil substituit sau nesubstituit, arilalcoxi substituit sau nesubstituit, heteroaril substituit sau nesubstituit, heteroarilalchil substituit sau nesubstituit sau haloalchil; și

R_{39} și R_{40} sunt, același sau diferit în mod independent unul de celălalt, H, alchil substituit sau nesubstituit, cicloalchil alchil substituit sau nesubstituit, heterocicloalchilalchil substituit sau nesubstituit, aril substituit sau nesubstituit, arilamidoalchil substituit sau nesubstituit, arilalchilamidoalchil substituit sau nesubstituit, heteroarilamidoalchil substituit sau nesubstituit, heteroarilalchilamidoalchil substituit sau nesubstituit, arilalchil substituit sau nesubstituit, arilalcoxi substituit sau nesubstituit, heteroaril substituit sau nesubstituit, heteroarilalchil substituit sau nesubstituit, haloalchil sau R_{39} și R_{40} , împreună cu atomul de carbon la care sunt atașați, formează o grupare C=O sau o grupare alchenil substituită sau nesubstituită.

[0066] În alt aspect, compușii invenției conțin un heterociclu cu cinci atomi care este un urazol. Într-o formă de realizare, urazolul este un urazol cu formula:



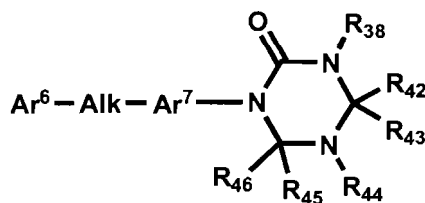
sau o sare, hidrat, solvat, N-oxid sau promedicament al acestuia, în care Ar^6 și Ar^7 sunt, același sau diferit în mod independent unul de celălalt, o grupare aril cu cinci sau șase atomi sau o grupare heteroaril cu cinci sau șase atomi;

Alk este o grupare alchil, în mod opțional întrerupt de un heteroatom;

R_{38} este H, alchil substituit sau nesubstituit, cicloalchil alchil substituit sau nesubstituit, heterocicloalchil alchil substituit sau nesubstituit, aril substituit sau nesubstituit, arilamidoalchil substituit sau nesubstituit, heteroarilamidoalchil substituit sau nesubstituit, arilalchil substituit sau nesubstituit, arilalcoxi substituit sau nesubstituit, heteroaril substituit sau nesubstituit, heteroarilalchil substituit sau nesubstituit sau haloalchil; și

R_{41} este H, alchil substituit sau nesubstituit, cicloalchil alchil substituit sau nesubstituit, heterocicloalchil alchil substituit sau nesubstituit, aril substituit sau nesubstituit, arilamidoalchil substituit sau nesubstituit, arilalchilamidoalchil substituit sau nesubstituit, heteroarilamidoalchil substituit sau nesubstituit, heteroarilalchilamidoalchil substituit sau nesubstituit, arilalchil substituit sau nesubstituit, arilalcoxi substituit sau nesubstituit, heteroaril substituit sau nesubstituit, heteroarilalchil substituit sau nesubstituit sau haloalchil.

[0067] În alt aspect, compuşii invenției conțin un heterociclu cu șase atomi. Într-o formă de realizare, heterociclul cu șase atomi este un heterociclu cu șase atomi cu formula:

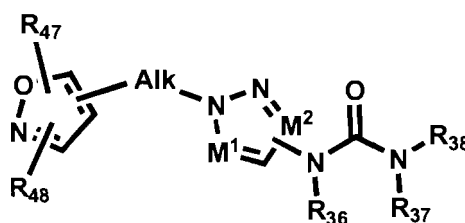


sau o sare, hidrat, solvat, N-oxid sau promedicament al acestuia,

în care R_{38} este H, alchil substituit sau nesubstituit, cicloalchil alchil substituit sau nesubstituit, heterocicloalchilalchil substituit sau nesubstituit, aril substituit sau nesubstituit, arilamidoalchil substituit sau nesubstituit, heteroarilamidoalchil substituit sau nesubstituit, arilalchil substituit sau nesubstituit, arilalcoxi substituit sau nesubstituit, heteroaril substituit sau nesubstituit, heteroarilalchil substituit sau nesubstituit sau haloalchil; și

R_{42} , R_{43} , R_{44} , R_{45} și R_{46} sunt, același sau diferit în mod independent unul de celălalt, H, alchil substituit sau nesubstituit, cicloalchil alchil substituit sau nesubstituit, arilalchil substituit sau nesubstituit, arilalcoxi substituit sau nesubstituit, heteroaril substituit sau nesubstituit, heteroarilalchil substituit sau nesubstituit sau R_{42} și R_{43} sau R_{45} și R_{46} , împreună cu atomii de carbon la care este atașat fiecare, formează o grupare C=O.

[0068] În alt aspect, invenția se referă la un compus cu formula:



sau o sare, hidrat, solvat, N-oxid sau promedicament al acestuia,

în care Alk este o grupare alchil, în mod opțional întrerupt de un heteroatom;

M^1 este N sau CR_{49} , în care R_{49} este H sau alchil substituit sau nesubstituit;

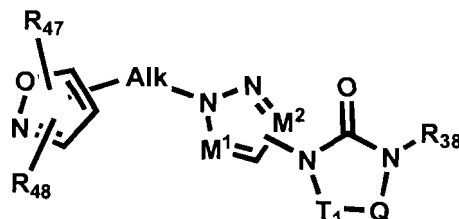
M^2 este N sau CR_{50} , în care R_{50} este H sau alchil substituit sau nesubstituit;

R_{36} și R_{37} sunt, același sau diferit în mod independent unul de celălalt, H, alchil sau, R_{36} și R_{37} , împreună cu atomii la care sunt atașați, formează un heterociclu cu cinci sau șase atomi opțional substituit; și

R_{38} este H, alchil substituit sau nesubstituit, cicloalchil alchil substituit sau nesubstituit, heterocicloalchilalchil substituit sau nesubstituit, aril substituit sau nesubstituit, arilamidoalchil substituit sau nesubstituit, heteroarilamidoalchil substituit sau nesubstituit, arilalchil substituit sau nesubstituit, arilalcoxi substituit sau nesubstituit, heteroaril substituit sau nesubstituit, heteroarilalchil substituit sau nesubstituit sau haloalchil;

R₄₇ este H, alchil substituit sau nesubstituit, alcoxi substituit sau nesubstituit, aril substituit sau nesubstituit, arilalchil substituit sau nesubstituit sau halo; și R₄₈ este H, alchil substituit sau nesubstituit, alcoxi substituit sau nesubstituit, aril substituit sau nesubstituit, arilalchil substituit sau nesubstituit sau halo.

[0069] În încă alt aspect, invenția se referă la un compus cu formula:



sau o sare, hidrat, solvat, N-oxid sau promedicament al acestuia, în care Alk este o grupare alchil, în mod opțional întrerupt de un heteroatom; T₁ este C=O și Q este CR₅₁R₅₂ sau NR₅₁, în care R₅₁ și R₅₂ sunt, același sau diferit în mod independent unul de celălalt, H, alchil substituit sau nesubstituit, cicloalchil alchil substituit sau nesubstituit, heterocicloalchilalchil substituit sau nesubstituit, aril substituit sau nesubstituit, arilamidoalchil substituit sau nesubstituit, arilalchilamidoalchil substituit sau nesubstituit, heteroarilamidoalchil substituit sau nesubstituit, heteroarilalchilamidoalchil substituit sau nesubstituit, arilalchil substituit sau nesubstituit, arilalcoxi substituit sau nesubstituit, heteroaril substituit sau nesubstituit, heteroarilalchil substituit sau nesubstituit, haloalchil sau R₅₁ și R₅₂, împreună cu atomul de carbon la care sunt atașați, formează o grupare C=O sau o grupare alchenil substituită sau nesubstituită;

M¹ este N sau CR₄₉, în care R₄₉ este H sau alchil substituit sau nesubstituit;

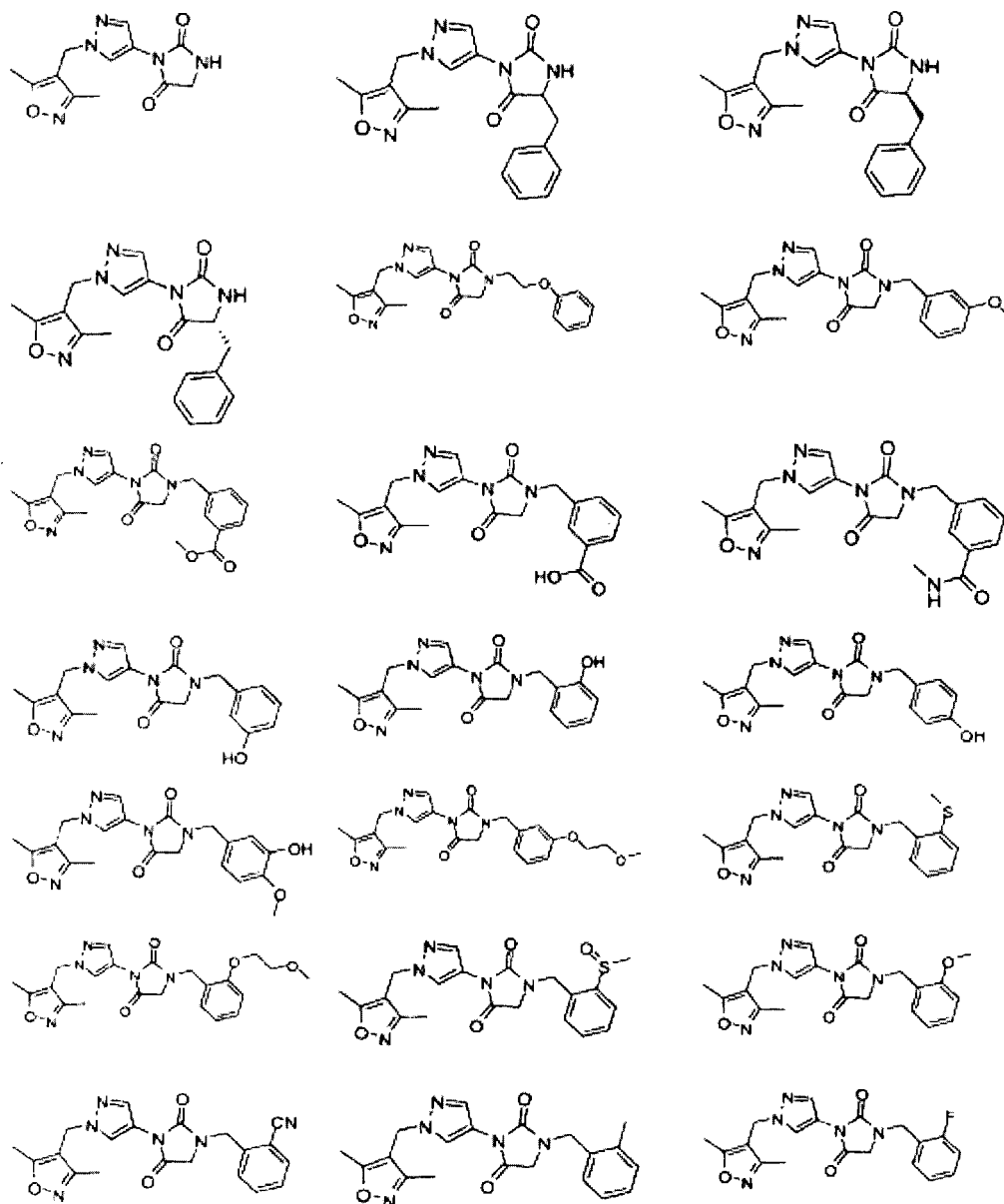
M² este N sau CR₅₀, în care R₅₀ este H sau alchil substituit sau nesubstituit;

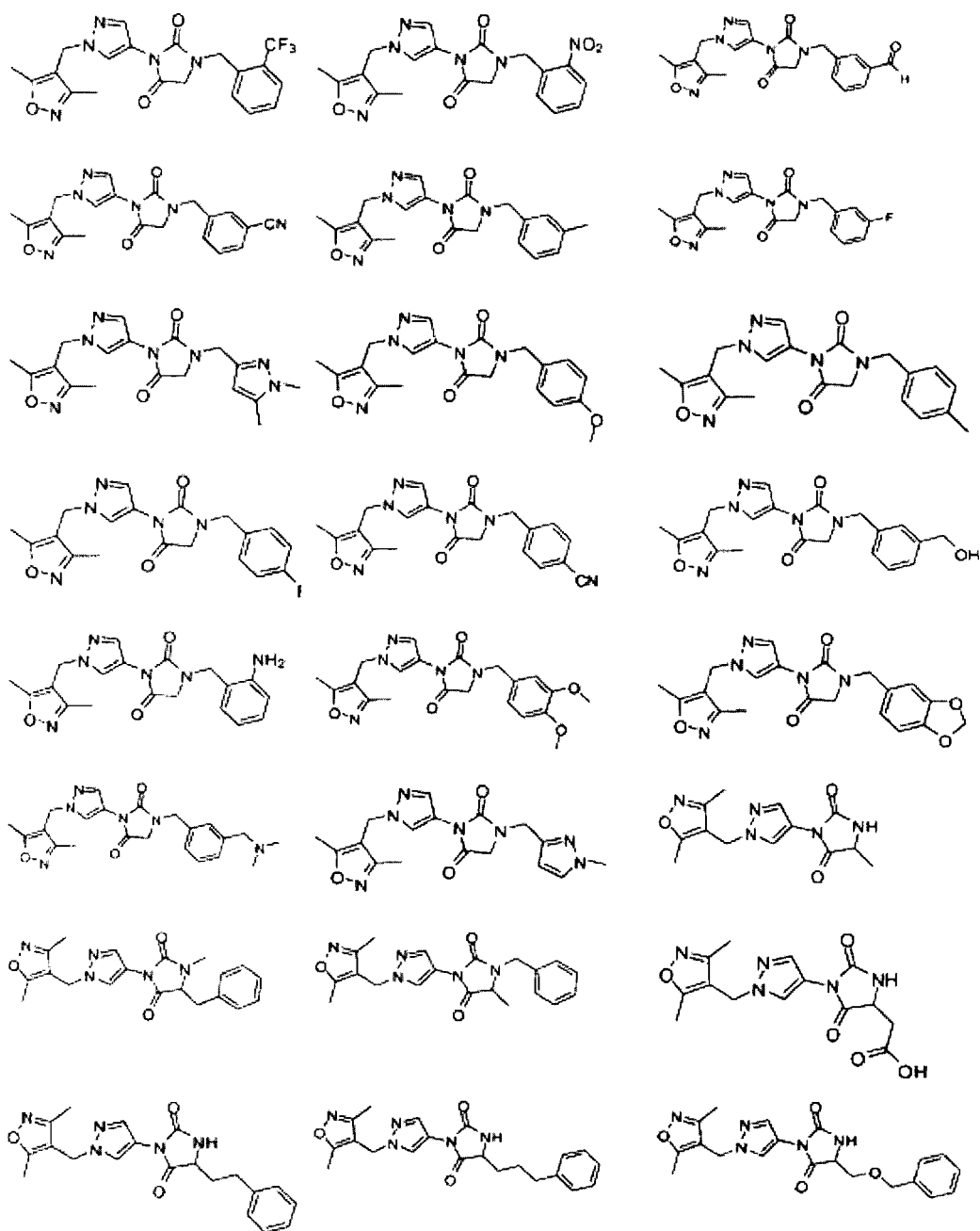
R₃₈ este H, alchil substituit sau nesubstituit, cicloalchil alchil substituit sau nesubstituit, heterocicloalchilalchil substituit sau nesubstituit, aril substituit sau nesubstituit, arilamidoalchil substituit sau nesubstituit, heteroarilamidoalchil substituit sau nesubstituit, arilalchil substituit sau nesubstituit, arilalcoxi substituit sau nesubstituit, heteroaril substituit sau nesubstituit, heteroarilalchil substituit sau nesubstituit sau haloalchil;

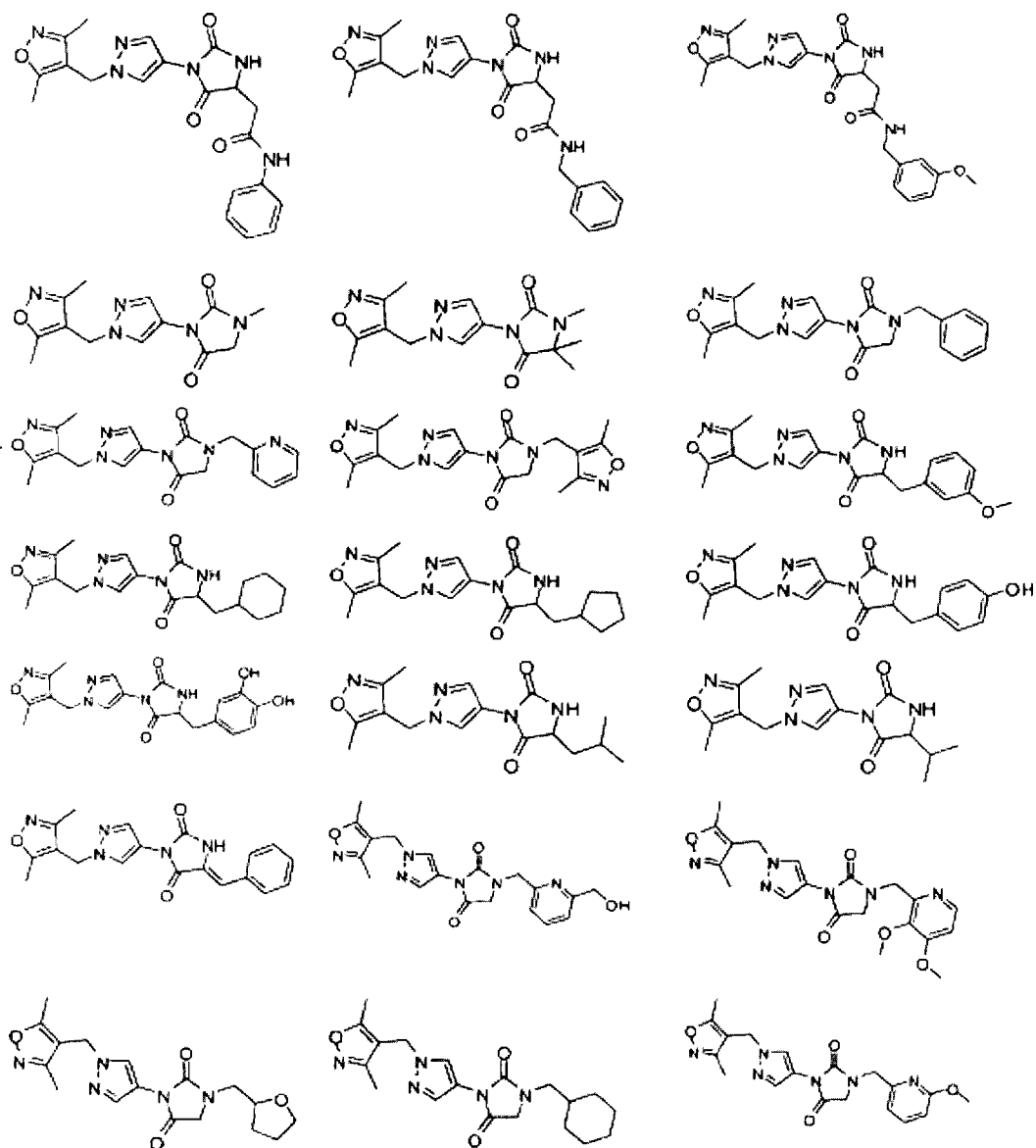
R₄₇ este H, alchil substituit sau nesubstituit, alcoxi substituit sau nesubstituit, aril substituit sau nesubstituit, arilalchil substituit sau nesubstituit sau halogen; și

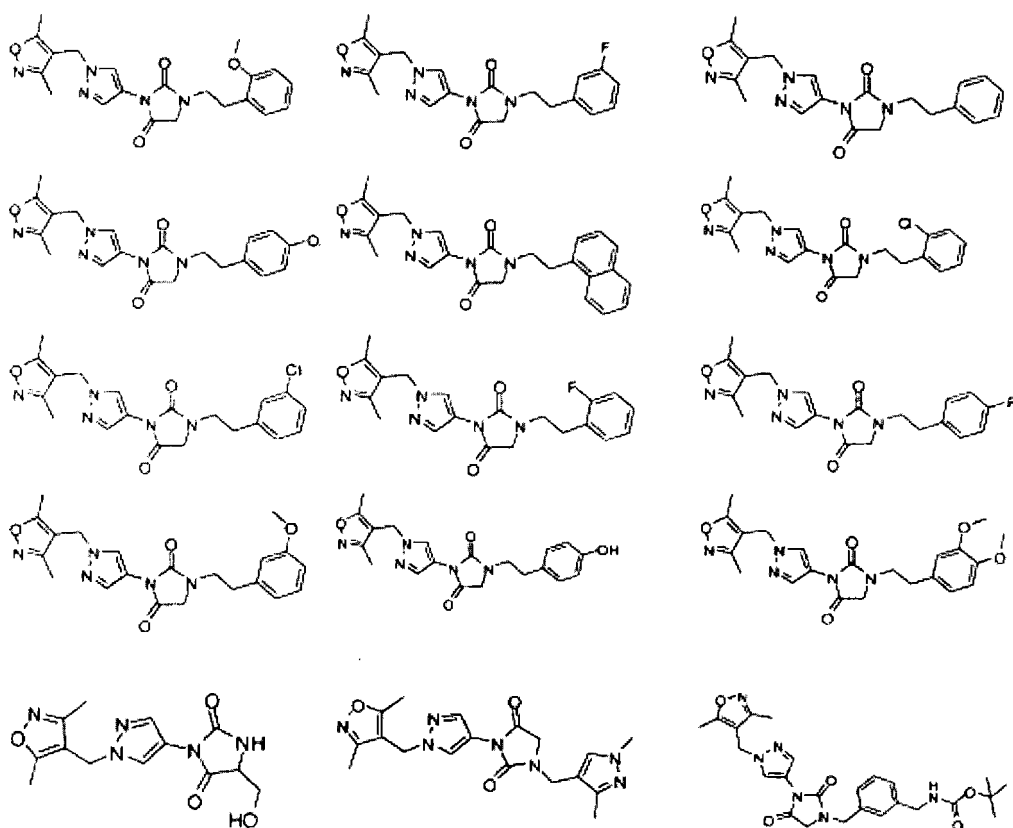
R₄₈ este H, alchil substituit sau nesubstituit, alcoxi substituit sau nesubstituit, aril substituit sau nesubstituit, arilalchil substituit sau nesubstituit sau halogen.

[0070] În altă formă de realizare, invenția se referă la un compus cu formula:



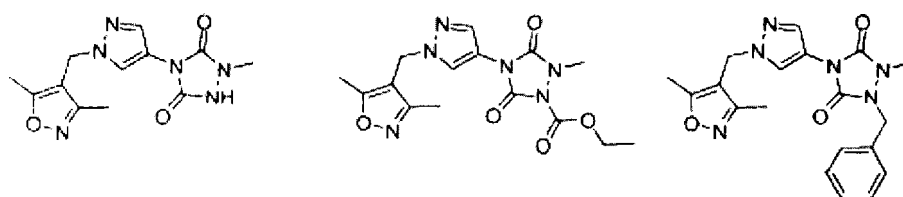


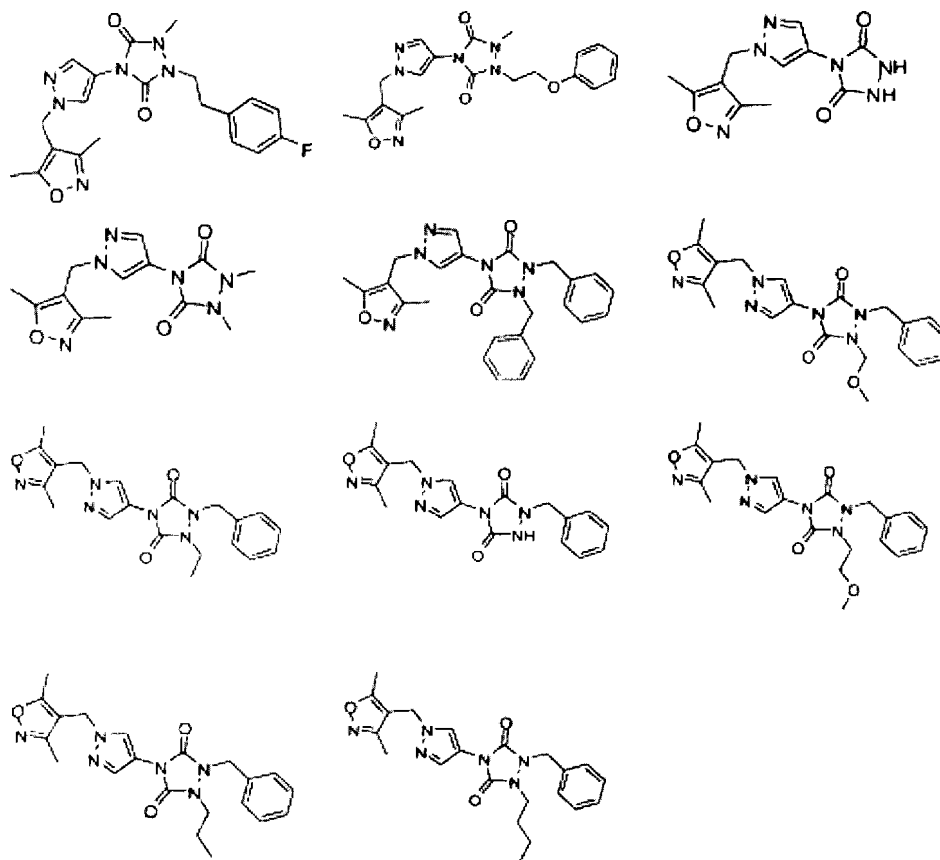




sau o sare, hidrat, solvat, N-oxid sau promedicament al acestuia.

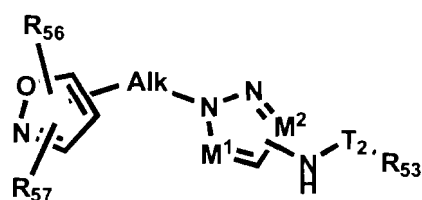
[0071] În alt aspect, invenția se referă la un compus cu formula:





sau o sare, hidrat, solvat, N-oxid sau promedicament al acestuia.

[0072] În încă alt aspect, invenția se referă la o metodă de obținere a unui compus cu formula:



sau o sare, hidrat, solvat, N-oxid sau promedicament al acestuia,

în care Alk este o grupare alchil, în mod opțional întrerupt de un heteroatom;

T₂ este C=S, C=O sau S(O)₂;

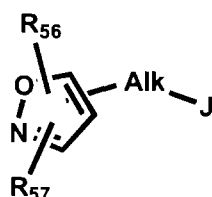
R₅₃ este alchil substituit sau nesubstituit, cicloalchil substituit sau nesubstituit, heteroaril substituit sau nesubstituit, aril substituit sau nesubstituit sau arilalchil substituit sau nesubstituit;

M¹ este N sau CR₅₄, în care R₅₄ este H sau alchil substituit sau nesubstituit;

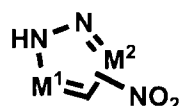
M² este N sau CR₅₅, în care R₅₅ este H sau alchil substituit sau nesubstituit;

R_{56} este H, alchil substituit sau nesubstituit, alcoxi substituit sau nesubstituit, aril substituit sau nesubstituit, arilalchil substituit sau nesubstituit sau halogen; și

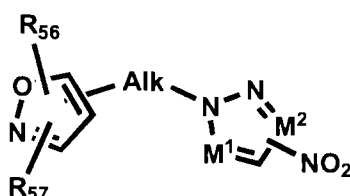
R_{57} este H, alchil substituit sau nesubstituit, alcoxi substituit sau nesubstituit, aril substituit sau nesubstituit, arilalchil substituit sau nesubstituit sau halogen; în care metoda cuprinde reacția unui compus cu formula:



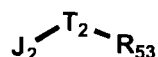
în care R_{56} , R_{57} și Alk sunt definite mai sus și J este o grupare fugace; cu un compus cu formula:



în care M^1 și M^2 sunt definite mai sus pentru a da un compus cu formula

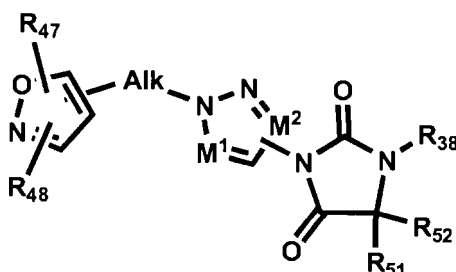


având o grupare NO_2 ; reducerea grupării NO_2 pentru a da un compus având o grupare NH_2 ; și reacția compusului având o grupare NH_2 cu un compus cu formula



în care J_2 este o grupare fugace și T_2 și R_{53} sunt definite mai sus.

[0073] În încă alt aspect, invenția se referă la o metodă de obținere a unui compus cu formula:



sau o sare, hidrat, solvat, N-oxid sau promedicament al acestuia,
în care Alk este o grupare alchil, în mod opțional întrerupt de un heteroatom;
R₅₁ și R₅₂ sunt, același sau diferit în mod independent unul de celălalt, H,
alchil substituit sau nesubstituit, cicloalchil alchil substituit sau nesubstituit,
heterocicloalchilalchil substituit sau nesubstituit, aril substituit sau nesubstituit,
arilamidoalchil substituit sau nesubstituit, arilalchilamidoalchil substituit sau
nesubstituit, heteroarilamidoalchil substituit sau nesubstituit,
heteroarilalchilamidoalchil substituit sau nesubstituit, arilalchil substituit sau
nesubstituit, arilalcoxi substituit sau nesubstituit, heteroaril substituit sau
nesubstituit, heteroarilalchil substituit sau nesubstituit, haloalchil sau R₅₁ și
R₅₂, împreună cu atomul de carbon la care sunt atașați, formează o grupare
alchenil substituit sau nesubstituit;

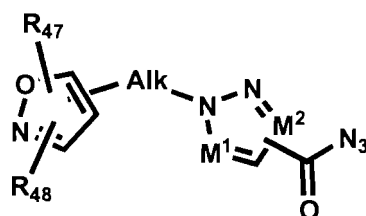
M¹ este N sau CR₄₉, în care R₄₉ este H sau alchil substituit sau nesubstituit;

M² este N sau CR₅₀, în care R₅₀ este H sau alchil substituit sau nesubstituit;

R₃₈ este H, alchil substituit sau nesubstituit, cicloalchil alchil substituit sau
nesubstituit, heterocicloalchilalchil substituit sau nesubstituit, aril substituit sau
nesubstituit, arilamidoalchil substituit sau nesubstituit, heteroarilamidoalchil
substituit sau nesubstituit, arilalchil substituit sau nesubstituit, arilalcoxi
substituit sau nesubstituit, heteroaril substituit sau nesubstituit, heteroarilalchil
substituit sau nesubstituit sau haloalchil;

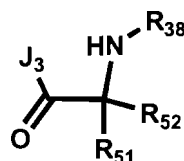
R₄₇ este H, alchil substituit sau nesubstituit, alcoxi substituit sau nesubstituit,
aril substituit sau nesubstituit, arilalchil substituit sau nesubstituit sau halogen;
și

R₄₈ este H, alchil substituit sau nesubstituit, alcoxi substituit sau nesubstituit,
aril substituit sau nesubstituit, arilalchil substituit sau nesubstituit sau halogen;
în care metoda cuprinde încălzirea unui compus cu formula:



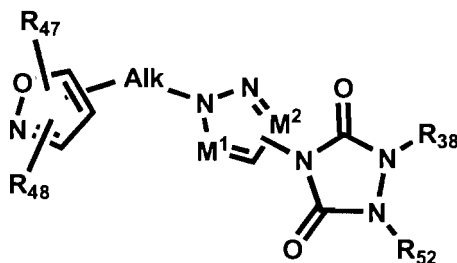
în care R_{47} , R_{48} , Alk, M^1 și M^2 sunt definite mai sus;

pentru transformarea grupării $-\text{CON}_3$ într-o grupare $-\text{N}=\text{C}=\text{O}$ și apoi reacția cu un compus cu formula:



în care J_3 este o grupare fugace și R_{38} , R_{51} și R_{52} sunt definite mai sus.

[0074] În încă alt aspect, invenția se referă la o metodă de obținere a unui compus cu formula:



sau o sare, hidrat, solvat, N-oxid sau promedicament al acestuia,

în care Alk este o grupare alchil, în mod opțional întrerupt de un heteroatom;

R_{52} este H, alchil substituit sau nesubstituit, cicloalchil alchil substituit sau nesubstituit, heterocicloalchilalchil substituit sau nesubstituit, aril substituit sau nesubstituit, arilamidoalchil substituit sau nesubstituit, arilalchilamidoalchil substituit sau nesubstituit, heteroarilamidoalchil substituit sau nesubstituit, heteroarilalchilamidoalchil substituit sau nesubstituit, arilalchil substituit sau nesubstituit, arilalcoxi substituit sau nesubstituit, heteroaril substituit sau nesubstituit, heteroarilalchil substituit sau nesubstituit, haloalchil;

M^1 este N sau CR_{49} , în care R_{49} este H sau alchil substituit sau nesubstituit;

M^2 este N sau CR_{50} , în care R_{50} este H sau alchil substituit sau nesubstituit;

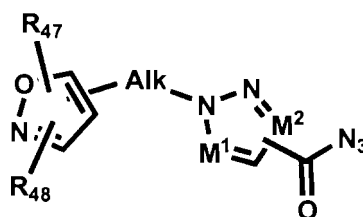
R_{38} este H, alchil substituit sau nesubstituit, cicloalchil alchil substituit sau nesubstituit, heterocicloalchilalchil substituit sau nesubstituit, aril substituit sau

nesubstituit, arilamidoalchil substituit sau nesubstituit, heteroarilamidoalchil substituit sau nesubstituit, arilalchil substituit sau nesubstituit, arilalcoxi substituit sau nesubstituit, heteroaril substituit sau nesubstituit, heteroarilalchil substituit sau nesubstituit sau haloalchil;

R_{47} este H, alchil substituit sau nesubstituit, alcoxi substituit sau nesubstituit, aril substituit sau nesubstituit, arilalchil substituit sau nesubstituit sau halo; și

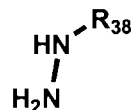
R_{48} este H, alchil substituit sau nesubstituit, alcoxi substituit sau nesubstituit, aril substituit sau nesubstituit, arilalchil substituit sau nesubstituit sau halo;

în care metoda cuprinde încălzirea unui compus cu formula:



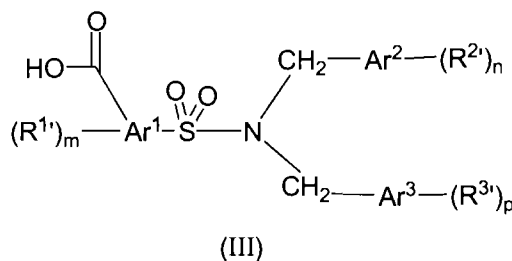
în care R_{47} , R_{48} , Alk, M^1 și M^2 sunt definite mai sus;

pentru transformarea grupării $-\text{CON}_3$ într-o grupare $-\text{N}=\text{C}=\text{O}$ și apoi reacția cu o hidrazină cu formula:



în care R_{38} este definită mai sus.

[0075] În încă alt aspect, invenția se referă la o metodă de obținere a unui compus cu formula:



sau o sare, hidrat, solvat sau N-oxid al acestuia în care:

Ar^1 , Ar^2 și Ar^3 sunt în mod independent un ciclu aril, heteroaril sau cicloalchil cu cinci sau șase atomi și Ar^2 și Ar^3 pot fi omiși în mod opțional;

m este 0, 1, 2 sau 3;

n și p sunt în mod independent 0, 1, 2, 3 sau 4;

fiecare $R^{1'}$ este în mod independent selectat din grupul constând din hidrogen, halogen, alchil, alchil substituit, aril, aril substituit, arilalchil, arilalchil substituit, acil, acil substituit, heteroalchil, heteroalchil substituit, heteroaril, heteroaril substituit, heteroarilalchil, heteroarilalchil substituit, 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) și P(O)(R⁵)(OR⁶);

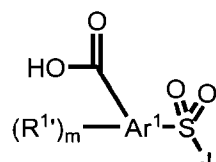
fiecare $R^{2'}$ este în mod independent selectat din grupul constând din hidrogen, halogen, alchil, alchil substituit, aril, aril substituit, arilalchil, arilalchil substituit, acil, acil substituit, heteroalchil, heteroalchil substituit, heteroaril, substituit heteroaril, heteroarilalchil, heteroarilalchil substituit, 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) și P(O)(R⁵)(OR⁶);

fiecare $R^{3'}$ este în mod independent selectat din grupul constând din hidrogen, halogen, alchil, alchil substituit, aril, aril substituit, arilalchil, arilalchil substituit, acil, acil substituit, heteroalchil, heteroalchil substituit, heteroaril, heteroaril substituit, heteroarilalchil, heteroarilalchil substituit, 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) și P(O)(R⁵)(OR⁶);

$R^{5'}R^8$ sunt în mod independent hidrogen, alchil, alchil substituit, aril, aril substituit, arilalchil, arilalchil substituit, heteroalchil, heteroalchil substituit, heteroaril, heteroaril substituit, heteroarilalchil sau substituit heteroarilalchil sau în mod alternativ, R⁶ și R⁷, R⁷ și R⁸, împreună cu atomii la care sunt legați formează un ciclu cicloheteroalchil sau cicloheteroalchil substituit;

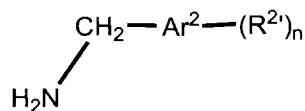
b este 0, 1 sau 2;

în care metoda cuprinde reacția unui compus cu formula:



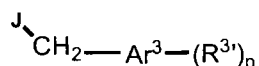
în care J este o grupare fugace;

cu un compus cu formula:



pentru a da un produs; și

reacția produsului cu un compus cu formula:



în care J este o grupare fugace.

[0076] Un alt obiect al invenției este să folosească compușii identificați în testele descrise aici ca aditivi sau modulatori de aromă în compoziții cu scopul de a inhiba sau de a bloca gustul amar provocat de compușii care activează în mod specific acești receptori de gust. Un obiect preferat al invenției este utilizarea unui compus care inhibă activarea cel puțin a unuia dintre receptorii T2R uman identificați mai sus, pentru a bloca gustul amar al compușilor prezenți în cafea și în alimentele, băuturile și medicamentele cu aromă de cafea.

[0077] Un alt obiect al invenției este folosirea compușilor prezentei invenții ca blocați pentru gustul amar cu acțiune largă în scopul de a inhiba sau de a bloca gustul amar provocat de compușii care activează în mod specific receptorii de gust hT2R8, liganzii care activează receptorii multipli de gust amar, compușii amari având specificitate de receptor necunoscută sau compozițiile care conțin compuși amari necunoscuți sau multipli. Într-un formă de realizare, compușii invenției sunt utilizați pentru a inhiba activarea cel puțin a unuia dintre receptorii umani T2R identificați mai sus, blocând astfel gustul amar al compușilor prezenți în cafea și alimentele, băuturile și medicamentele cu aromă de cafea. Un alt obiect al invenției este confirmarea faptului că compușii identificați modulează, de preferință inhibă sau blochează gustul amar provocat, de exemplu, de cafea și de alimentele, băuturile și medicamentele cu aromă de cafea în testele de gust umane sau animale, de preferință testele umane de gust.

[0078] Un alt obiect al invenției este folosirea compușilor identificați în testele descrise aici ca aditivi sau modulatori de aromă în compoziții cu scopul de a inhiba

sau de a bloca gustul amar provocat de compușii care activează în mod specific acești receptori de gust. Un obiect preferat al invenției este utilizarea unui compus care inhibă activarea cel puțin a unuia dintre receptorii T2R uman identificați mai sus, pentru a bloca gustul amar al compușilor prezenți în cafea și în alimentele, băuturile și medicamentele cu aromă de cafea.

[0079] Într-o formă de realizare preferată în mod special, Compusul C și analogii acestuia sunt utilizați ca blocați pentru gustul amar cu acțiune largă în scopul de a inhiba sau de a bloca gustul amar provocat de compușii care activează în mod specific receptorii de gust hT2R3, 7, 10, 14, 16, 44, 51, 55, 61, 63, 64, 65, 71 și/sau hT2R5, 9, 13, 54, 67 și receptori 75, liganzii care activează receptorii multipli de gust amar, compușii amari având specificitate de receptor necunoscută sau compozițiile care conțin compuși amari necunoscuți sau multipli. Având în vedere proprietățile antagoniste largi ale compusului C, acesta ar trebui să atenueze în mod substanțial gustul amar al celor mai mulți compuși amari și al compozițiilor care le conțin. Un obiect preferat al invenției este utilizarea unui compus care inhibă activarea cel puțin a unuia dintre receptorii umani T2R identificați mai sus cum ar fi compusul C sau un analog în scopul de a bloca gustul amar al compușilor prezenți în cafea și în alimentele, băuturile și medicamentele cu aromă de cafea.

DESCRIEREA DETALIATĂ A FIGURILOR

[0080] FIG. 1 se referă la experimentele în cadrul cărora o fracțiune amară parțial purificată de la cafea este folosită pentru a examina 25 umane T2R în celulele HEK transfectate tranzitoriu așa cum este descris în cererile anterioare ale solicitantului brevetului, incluse prin referință aici. Așa cum se arată în Fig. 1, fracțiunea de cafea a activat celulele HEK293 transfectate tranzitoriu cu hT2R8 și hT2R14 în analiza imagistică a calciului. Un colorant albastru FD&C a fost utilizat pentru a reduce nivelul de fluorescență al fracțiunii de cafea, care ar interfera cu analiza.

[0081] FIG. 2 este un grafic al $\Delta F/F$ față de log din fracțiunea de cafea care arată răspunsul dependent de doză al hT2R8 și hT2R14 la o fracțiune cu gust amar

derivată din cafea. Analiza a fost efectuată cu ajutorul liniilor celulare stabile hT2R8 și hT2R14 și detector de fluorescență automat FLIPR.

[0082] FIG. 3 este un grafic al procentului de inhibare al activității hT2R8 față de log din concentrația unui compus și arată inhibarea în funcție de doză pentru compușii A și B pe o linie celulară stabilă de exprimare hT2R8.

[0083] FIG. 4 este un grafic al procentului de inhibare al activității hT2R14 față de log din concentrația compusului C și arată inhibarea în funcție de doză pentru compusul C pe o linie celulară stabilă de exprimare hT2R8.

[0084] FIG. 5 prezintă activitatea inhibitorie a compusului C față de diferiți (2) receptori de gust amar umani.

[0085] FIG. 6 este un grafic al activității receptorului ca funcție de log din concentrația de zaharină. FIG. 6 prezintă relațiile doză-răspuns și efectele zaharinei asupra activităților receptorului în variantele de expresie ale celulelor transfectate ale hT2R43, hT2R44 și hT2R8. hT2R8 este mai puțin receptiv la zaharină în analiza in vitro decât "degustătorul" hT2R43-W35 și alelele hT2R44-W35, dar răspunde mai bine decât "ne-degustătorul" hT2R43-S35 și alelele hT2R44-R35.

DESCRIERE DETALIATĂ A INVENȚIEI

[0086] În conformitate cu prezenta invenție, compușii prezentei invenții pot fi utilizați pentru a atenua sau a reduce gustul amar al compozițiilor, de exemplu, o compoziție ingerabilă. Așa cum este folosită aici, o compoziție "ingerabilă" include orice substanță destinată consumului pe cale orală singură sau împreună cu o altă substanță. Compoziția ingerabilă include atât, "alimente sau băuturi", cât și "produse necomestibile". Prin "alimente sau băuturi" se înțelege orice produs comestibil destinat consumului de către oameni sau animale, incluzând solide, semi-solide sau lichide (de exemplu, băuturi). Termenul de "produse necomestibile" sau "compoziție necomestibilă" include suplimente, nutraceutice, alimente funcționale (de exemplu, orice aliment proaspăt sau prelucrat revendicat a avea proprietăți de promovare a

sănătății și/sau de prevenire a boli, în afară de funcția nutrițională de bază de furnizare a nutrienților), produse farmaceutice și OTC, produse de igienă orală, cum ar fi produse pentru îngrijirea dinților și ape de gură, produse cosmetice cum ar fi balsamuri de buze și alte produse de îngrijire personală.

[0087] Compoziția ingerabilă include, de asemenea, o compoziție farmaceutică, medicamentoasă sau comestibilă sau, alternativ într-o formulare, de exemplu, o formulare farmaceutică sau medicamentosă sau un produs sau formulare alimentară sau băutură.

[0088] Compușii prezentei invenții pot fi furnizați, de asemenea, în mod individual sau în combinație, cu orice compoziție ingerabilă cunoscută sau descoperită mai târziu. De exemplu, compoziția ingerabilă poate fi o compoziție comestibilă sau o compoziție necomestibilă. Prin "compoziție comestibilă" se înțelege orice compoziție care poate fi consumată ca aliment de către oameni sau animale, inclusiv solide, gel, pastă, material spumos, semi-solide, lichide sau amestecuri ale acestora. Prin "compoziție necomestibilă" se înțelege orice compoziție care nu este destinată să fie consumată sau utilizată de către oameni sau animale ca aliment, inclusiv solide, gel, pasta, material spumos, semi-solide, lichide sau amestecuri ale acestora. Compoziția necomestibilă include, dar nu se limitează la compoziție medicală, care se referă la o compoziție necomestibilă destinată a fi utilizată de către oameni sau animale în scopuri terapeutice. În "animal" este inclus orice animal neuman cum ar fi, de exemplu, animalele de fermă și animalele de companie.

[0089] Într-un formă de realizare, compușii invenției pot fi adăugați la o compoziție necomestibilă sau produs necomestibil, cum ar fi suplimentele, nutraceuticele, alimente funcționale (de exemplu, orice alimente proaspete sau prelucrate revendicate a avea proprietăți de promovare a sănătății și/sau de prevenire a bolii, în afară de funcția nutritivă de bază de furnizare a nutrienților), produse farmaceutice și OTC, produse de igienă orală, cum ar fi produse pentru îngrijirea dinților și ape de gură, produse cosmetice cum ar fi balsamuri de buze și alte produse de îngrijire personală.

[0090] În general, produsele “over the counter” (OTC) și produsele de igienă orală se referă în general la produse pentru uz casnic și/sau de uz personal care pot fi vândute fără prescripție medicală și/sau fără vizită la un profesionist în medicină. Exemple de produse OTC includ, dar nu se limitează la vitamine sau suplimente alimentare; analgezice topice și/sau anestezice; remedii împotriva tusei, răcelii și alergiei; remedii antihistaminice și/sau antialergice; și combinații ale acestora. Vitaminele și suplimentele alimentare includ, dar nu sunt limitate la vitamine, suplimente alimentare, băuturi nutritive tonice/îmbuteliate, vitamine specifice copiilor, suplimente alimentare, orice alte produse de sau referitoare la sau care furnizează compuși nutritivi și combinații ale acestora. Analgezicele topice și/sau anestezicele includ orice creme/unguente/geluri topice folosite pentru a atenua durerile și suferințele superficiale sau profunde, de exemplu, durerile musculare: gel de dinți; patch-uri cu ingredient analgezic și combinații ale acestora. Remediile împotriva tusei, răcelii și alergiei includ, dar nu se limitează la decongestionante, remedii împotriva tusei, preparate faringiene, bomboane medicinale, antihistaminice și remedii specifice copiilor împotriva tusei, frigului și alergiei, produse combinate. Remediile antihistaminice și/sau antialergice includ, dar nu se limitează la orice tratamente sistemice pentru febra fânului, alergii nazale, mușcături și înțepături de insecte. Exemplele de produse de igienă orală includ, dar nu se limitează la benzi de curățare a gurii, pastă de dinți, periute de dinți, ape de gură/soluții pentru clătirea dinților, produse de îngrijire a protezelor dentare, odorizante pentru gură, înălbitori pentru dinți pentru acasă și ață dentară.

[0091] Într-o altă formă de realizare, compușii prezentei invenții pot fi adăugați în produse sau formulări alimentare sau băuturi. Exemple de produse sau formulări alimentare și băuturi includ, dar nu sunt limitate la acoperiri, glazuri pentru produse comestibile sau orice entitate inclusă în categoria supă, categoria alimente procesate uscate, categoria băuturi, categoria masă de-a gata, categoria de alimente păstrate sau conservate, categoria de alimente procesate congelate, categoria de alimente procesate refrigerate, categoria alimente de tip snack, categoria de bunuri coapte, categoria cofetărie, categoria de produse lactate, categoria înghețată, categoria înlocuitori de masă, categoria paste făinoase și fidea și categoria sosuri, dressing-uri,

condimente, categoria alimente pentru copii și/sau categoria de produse pentru tartine.

[0092] În general, categoria supă se referă la supe păstrate/conservate, deshidratate, instant, refrigerate, UHT și congelate. În sensul prezentei definiții, supă(e) înseamnă un aliment preparat din carne, carne de pasăre, pește, legume, cereale, fructe și alte ingrediente, gătit într-un lichid care poate include piese vizibile din unele sau din toate aceste ingrediente. Acesta poate fi limpede (ca o supă) sau groasă (ca o cremă), omogenă, sub formă de piure sau compactă, gata de consum, semicondensată sau condensată și poate fi servită caldă sau rece, ca un prim fel sau ca felul principal al unei mese sau ca o gustare între mese (sorbită ca o băutură). Supa poate fi utilizată ca ingredient pentru prepararea altor componente ale mesei și poate varia de la ciorbe (supă limpede) la sosuri (supe pe bază cremă sau de brânză).

[0093] "Categoria de alimente culinare și deshidratate" reprezintă de obicei: (i) de produse de ajutor pentru gătit cum ar fi: pulberi, granule, paste, produse lichide concentrate, inclusiv bulion concentrat, bulion și de produse tip bulion în cuburi presate, formă de Tabelulte sau pulbere sau granulate, care sunt vândute separat ca produs finit sau ca ingredient într-un produs, sosuri și amestecuri pe bază de rețetă (indiferent de tehnologie), (ii) produse pentru soluții de masă cum ar fi: supe uscate deshidratate și congelate, inclusiv amestecuri de supe deshidratate, supe instant deshidratate, supe deshidratate gata de gătit, preparate deshidratate sau ambientale de feluri de mâncare gata făcute, recipiente cu mâncare ce se pot reînchide incluzând feluri de mâncare cu paste, cartofi și orez și (iii) produse de înfrumusețare a meselor, cum ar fi: condimente, marinate, sosuri pentru salate, topping-uri pentru salate, umectant, granule, amestecuri bătute, produse pentru tartine stabile, sosuri pentru grătar, amestecuri pe bază de rețetă lichide, concentrate, sosuri sau amestecuri de sosuri, inclusiv amestecuri pe bază de rețetă pentru salată, vândute ca produs finit sau ca ingredient într-un produs, fie deshidratat, fie lichid, fie congelat.

[0094] Categoria băuturi reprezintă de obicei băuturi, amestecuri de băuturi și concentrate, inclusiv, dar nefiind limitate la băuturi carbogazoase și necarbogazoase,

băuturi alcoolice și nealcoolice, băuturi gata de băut, formulări lichide concentrate pentru prepararea băuturilor precum sifon și amestecuri precursoroare de băuturi anhidre sub formă de pulbere. Categoria băuturi include de asemenea băuturi alcoolice, băuturi racoritoare, băuturi sportive, băuturi izotonice și băuturi calde. Băuturile alcoolice includ, dar nu se limitează la bere, cidru de mere/pere, FAB, vin și băuturi spirtoase. Băuturile racoritoare includ, dar nu sunt limitate la băutur carbonatate, cum ar fi băuturile carbonatate cola și non-cola, suc de fructe, cum ar fi suc, nectar, băuturi sucuri și de băuturi cu aromă de fructe; apă îmbuteliată, care include apă carbogazoasă, apa de izvor și purificat/apă de masă; băuturi funcționale, care pot fi carbogazoase sau încă și includă băuturi pentru sport, energie sau elixir; concentrate, cum ar fi concentratele lichide și pulbere se doza gata-de-băut. Băuturile calde includ, dar nu sunt limitate la cafea, cum ar fi în stare proaspătă (de exemplu, preparată), instant, cafea combinată, lichidă, gata-de-băut, băuturi de cafea solubile și uscate, amestecuri de băuturi de cafea și concentrate (siropuri, pur, formulat sau sub formă de pulbere; exemplu de "sub formă de pulbere" este un produs care cuprinde din cafea, îndulcitor și lapte condensat, toate sub formă de pulbere); ceai, cum ar fi ceai negru, verde, alb, oolong și aromat; și alte băuturi calde inclusiv pulberi aromate, pe bază de malț sau pe bază de plante, granule, blocuri sau amestecuri de Tabelulte cu lapte sau apă.

[0095] Categoria de alimente tip Snack se referă în general la orice aliment care poate fi o masă ușoară, obișnuită, inclusiv, dar nelimitată la snacks-uri dulci și sărate și batoane tip snack. Exemple de alimente snack includ, dar nu se limitează la snacks-uri de fructe, cartofi prăjiți/crocanți, snacks-uri extrudate, tortilla/chips-uri de porumb, floricele de porumb, covrigei, nuci și alte gustări dulci și picante. Exemple de astfel de batoane tip snack includ, dar nu se limitează la batoane tip granola/muesli, batoane de mic dejun, batoane de energie, batoane de fructe și alte batoane tip snack.

[0096] Categoria bunuri coapte se referă în general la orice produs comestibil în procesul de pregătire care implică expunerea la căldură sau lumină excesivă. Exemple de bunuri coapte includ, dar nu sunt limitate la pâine, chifle, prăjituri, brișe, cereale, produse de patiserie prajite, produse de patiserie, vafe, tortilla, biscuiți,

plăcinte, baghete, tarte, quiche, tort, orice alimente coapte precum și orice combinație a acestora.

[0097] Categoria înghețată se referă în general la desertul congelat care conține smântână și zahăr și aromă. Exemple de înghețată includ, dar nu se limitează la: înghețată impuls; înghețată pentru acasă; iaurt congelat și smântână înghețată artizanală; înghețată pe bază de soia, ovăz, fasole (de exemplu, fasole roșie și fasole mung) și orez.

[0098] Categoria cofetărie se referă în general la produsele comestibile care sunt dulci la gust. Exemple de produse de cofetărie includ, dar nu se limitează la bomboane, gelatine, produse de cofetărie din ciocolată, dulciuri, gumă și altele, și orice produse combinate.

[0099] Categoria înlocuitori de masă se referă în general orice aliment destinat să înlocuiască mesele normale, în special pentru persoanele care au probleme de sănătate sau de fitness. Exemple de astfel de înlocuitori de masă includ, dar nu se limitează la produse de slăbit și produse de convalescență.

[0100] Categoria masă de-a gata se referă în general la orice aliment care poate fi servit ca masă fără pregătire sau prelucrare extensivă. Masa de-a gata include produsele care au avut "proprietățile" din rețetă adăgate de către producător, având ca rezultat un grad ridicat de pregătire, finalizare și comoditate. Exemple de astfel de masă de-a gata includ, dar nu se limitează la mese de-a gata păstrate/conservate, congelate, uscate, refrigerate; amestecuri pentru cină; pizza congelată; pizza refrigerată; și salate preparate.

[0101] Categoria paste făinoase și fidea/tăiței include orice paste făinoase și/sau fidea/tăiței, inclusiv, dar nelimitate la paste conservate, uscate și refrigerate/proaspete; și fidea/tăiței simplă, instant, refrigerată, congelată și snack.

[0102] Categoria de alimente conservate/păstrate include, dar nu se limitează la produse din carne și carne conservată/păstrată, pește/fructe de mare, legume, roșii,

fasole, fructe, mese de-a gata, supă, paste făinoase și alte alimente conservate/păstrate.

[0103] Categoria de alimente congelate prelucrate include, dar nu se limitează la carne rosie prelucrată congelată, carne de pasăre prelucrată, pește /fructe de mare prelucrate, legume prelucrate, înlocuitori de carne, cartofi prelucrați, produse de panificație, deserturi, mese de-a gata, pizza, supă, fidea , precum și alte alimente congelate.

[0104] Categoria alimente prelucrate uscate include, dar nu se limitează la orez, amestecuri de desert, mese de-a gata uscate, supă deshidratată, supă instant, paste uscate, fidea/tăiței simplă și fidea/tăiței instant.

[0105] Categoria alimente prelucrate refrigerate include, dar nu se limitează la carne prelucrată refrigerată, produse din pește/de fructe de mare prelucrate, kituri pentru masa de prânz, fructe proaspete tăiate, masa de-a gata, pizza, salate preparate, supă, paste proaspete și fidea/tăiței.

[0106] Categoria sosuri, dressinguri și condimente include, dar nu se limitează la paste și piureuri de roșii, cuburi de bulion/concentrate, ierburi și condimente, glutamat monosodic (MSG), sosuri de masă, sosuri pe bază de soia, sosuri pentru paste, sosuri umede/de gătit, amestecuri de sosuri uscate/pulbere, ketchup, maioneză, muștar, sosuri pentru salate, vinegrete, umectanți, produse murate și alte sosuri, dressinguri și condimente.

[0107] Categoria alimente pentru copii include, dar nu este limitată la formule pe bază de lapte sau soia; și alimente pentru copii preparate, uscate și altele.

[0108] Categoria alimente pentru tartine include, dar nu se limitează la gemuri și conserve, miere, ciocolată pentru tartine, tartine pe bază de nuci, precum și tartine pe bază de drojdie.

[0109] Categoria de produse lactate se referă în general la produsele comestibile produse din lapte de mamifere. Exemple de produse lactate includ, dar nu se limitează la produse din lapte de băut, brânză, băuturi din iaurt și lapte acru și alte produse lactate.

[0110] Exemple suplimentare pentru compozițiile comestibile, în special în produse sau formule de alimente și băuturi sunt furnizate după cum urmează. Compozițiile comestibile de exemplu includ unul sau mai multe produse de cofetărie, produse de cofetărie din ciocolată, tablete, produse en-gros, produse la saci, sortimente la cutie, sortimente la cutii standard, miniaturi prin învelite prin răsucire, ciocolată aseasonată, ciocolata cu jucării, biscuiți cu cremă, alte produse de cofetărie din ciocolată, produse mentolate, produse mentolate standard, pastile mentolate, dulciuri fierte, pastile, gume, jeleuri și produse de mestecat, toffee, caramele și nuga, bomboane medicale, acadele, lemn dulce, alte produse de cofetărie zaharoase, gumă, gumă de mestecat, gumă îndulcită, gumă fără zahăr, gumă funcțională, gumă de mestecat pentru bule, pâine, pâine ambalată/industrială, pâine neambalată/artizanală, produse de patiserie, checuri, checuri ambalate/industriale, checuri neambalate/artizanale, prăjiturile, biscuiți înveliți în ciocolată, biscuiți tip sandwich, biscuiți umpluți, biscuiți cu cimbru și pișcoturi, înlocuitori de pâine, cereale pentru micul dejun, cereale rte, cereale pentru micul dejun familiale, fulgi, fulgi de cereale, alte cereale, cereale pentru micul dejun pentru copii, cereale calde, înghețată, înghețată impulse, înghețată lactată porție unică, înghețată apoasă porție unică, înghețată lactată porții multiple, înghețată apoasă porții multiple, înghețată pentru acasă, înghețată lactată pentru acasă, deserturi de înghețată, înghețată vrac, înghețată apoasă pentru acasă, iaurt congelat, înghețată artizanală, produse lactate, lapte, lapte proaspăt/pasteurizat, lapte gras proaspăt/pasteurizat, lapte semidegresat proaspăt/pasteurizat, lapte cu durată mare de valabilitate/UHT, lapte gras cu durată mare de valabilitate/UHT, lapte semidegresat cu durată mare de valabilitate/UHT, lapte degresat cu durată mare de valabilitate/UHT, lapte de capră, lapte condensat/evaporat, lapte simplu condensat/evaporat, lapte condensat aromatizat, funcțional și altele, băuturi din lapte aromatizate, băuturi din lapte numai cu aromă, băuturi din lapte aromatizate cu suc de fructe, lapte de soia, băuturi din lapte acru, băuturi lactate fermentate, lapte condensat pentru cafea (de exemplu, aditivi pe bază de lapte sau nelactați sau lapte

condensat pentru băuturi de cafea), lapte praf, băuturi din lapte praf cu aromă, smântână, brânză, brânză prelucrată, brânză prelucrată tartinabilă, brânză prelucrată netartinabilă, brânză neprelucrată, branza neprelucrată tartinabilă, cașcaval, cașcaval ambalat, cașcaval neambalat, iaurt, iaurt simplu/natural, iaurt cu aromă, iaurt cu fructe, iaurt probiotic, iaurt de băut, iaurt de băut regulat, iaurt de băut probiotic, deserturi refrigerate și stabile în raft, deserturi pe bază de lapte, deserturi pe bază de soia, snack-uri refrigerate, brânză proaspătă și brânză dulce, brânză proaspătă și brânză dulce simple, brânză proaspătă și brânză dulce aromatizate, brânză proaspătă și brânză dulce cu cimbru, snacks-uri dulci și cu cimbru, snack-uri de fructe, cartofi prăjiți/crocanți, snacks-uri extrudate, tortilla/chips-uri de porumb, floricele de porumb, covrigei, nuci, alte gustări dulci și picante, batoane de tip snack, batoane din granule, batoane pentru micul dejun, batoane energetice, batoane de fructe, alte batoane tip snack, produse de înlocuire a mesei, produse de slăbire, băuturi de convalescență, mâncăruri de-a gata, mâncăruri de-a gata conservate, mâncăruri de-a gata congelate, mâncăruri de-a gata uscate, mâncăruri de-a gata refrigerate, amestecuri pentru cină, pizza congelată, pizza refrigerată, supă, supă conservată, supa deshidratată, supă instant, supă refrigerată, supă fierbinte, supă congelată, paste, paste conservate, paste uscate, paste refrigerate/proaspete, fidea, tăiței simpli, tăiței instant, tăiței instant la cană/bol, tăiței instant la husă, fidea refrigerată, gustare cu tăiței, alimente conservate, carne conservată și produse din carne, pește/fructe de mare conservate, legume conservate, roșii conservate, fasole conservată, fructe conservate, masă de-a gata conservată, supă conservată, paste făinoase conservate, alte alimente conservate, alimente congelate, carne roșie prelucrată congelată, carne de pasăre procesată congelată, pește/fructe de mare prelucrate congelate, legume prelucrate congelate, înlocuitori de carne congelați, cartofi congelați, cartofi chipsuri gătiți la cuptor, alte produse din cartofi gătiți la cuptor, cartofi congelați negătiți, produse de patiserie congelate, deserturi congelate, mese de-a gata congelate, pizza congelată, supă congelată, tăiței congelați, alte alimente congelate, alimente uscate, amestecuri pentru desert, masă de-a gata uscată, supă deshidratată, supă instant, paste uscate, tăiței simpli, tăiței instant, tăiței instant la cupă/bol, tăiței instant la husă, alimente refrigerate, carne procesată refrigerată, produse din pește/fructe de mare refrigerate, pește procesat refrigerat, pește acoperit refrigerat, pește afumat refrigerat, set pentru masa de prânz refrigerat,

masă de-a gata refrigerată, pizza refrigerată, supă refrigerată, paste refrigerate/proaspete, fidea refrigerată, uleiuri și grăsimi, ulei de măsline, uleiuri de legume și oleaginoase, grăsimi de gătit, unt, margarină, uleiuri și grăsimi tartinabile, uleiuri și grăsimi tartinabile funcționale, sosuri, dressing-uri și condimente, paste și piureuri de roșii, cuburi de bulion/concentrate, cuburi de concentrate, granule în sos, concentrate și baze lichide, ierburi și condimente, sosuri fermentate, sosuri pe bază de soia, sosuri pentru paste, sosuri umede, sosuri uscate/amestecuri de pulberi, ketchup, maioneză, maioneză obișnuit, muștar, sosuri pentru salate, sosuri pentru salate obișnuite, sosuri pentru salată cu conținut redus de grăsime, vinegrete, umectanți, produse murate, alte sosuri, dressing-uri și condimente, alimente pentru copii, formule de lapte, formule standard de lapte, formule asemănătoare laptelui, formule de lapte pentru copii mici, formule de lapte hipoalergenic, alimente preparate pentru copii, alimente uscate pentru copii, alte alimente pentru copii, produse tartinabile, gemuri și conserve, miere, ciocolată tartinabilă, produse tartinabile pe bază de nuci și produse tartinabile pe bază de drojdie. Compozițiile comestibile din exemple includ, de asemenea, produse de cofetărie, produse de patiserie, înghețată, produse lactate, snacks-uri dulci și cu cimbru, batoane tip snack, produse înlocuitori de masă, masă de-a gata, supe, paste, fidea, alimente conservate, alimente congelate, alimente uscate, alimente refrigerate, uleiuri și grăsimi, alimente pentru copii sau produse tartinabile sau un amestec ale acestora. Compozițiile comestibile din exemple includ, de asemenea, cereale pentru micul dejun, băuturi dulci sau compoziții concentrate solide sau lichide pentru prepararea băuturilor. Compozițiile comestibile din exemple includ, de asemenea, alimente cu aroma de cafea (de exemplu, înghețata cu aroma de cafea).

[0111] În mod tipic, o cantitate suficientă pentru a atenua sau a reduce gustul amar asociat unei compoziții (de exemplu o compoziție ingerabilă) se adaugă la compoziție pentru a atenua sau a reduce gustul amar asociat compoziției în comparație cu compozițiile care sunt preparate fără compuşii prezentei invenții, considerate pentru ființe umane sau animale. Sau, în cazul testării formulării, evaluată după majoritatea unui grup de, de exemplu, opt testeri de gust umani, prin proceduri cunoscute în mod uzual în domeniu.

[0112] Concentrația eficace a compușilor prezentei invenții pentru a atenua sau a reduce gustul amar asociat unei compoziții va depinde, desigur, de multe variabile, incluzând tipul specific al compoziției comestibile și al celorlalte ingrediente ale sale diferite, variabilitatea genetică naturală și preferințele individuale și starea de sănătate a diferiților oameni care testează prin gustare compozițiile și efectul subiectiv al compusului particular asupra gustului unor astfel de compuși chemosenzoriali. În unele forme de realizare, concentrația compușilor prezentei invenții, eficace pentru a atenua sau a reduce gustul amar asociat cu o compoziție, este de la circa 0.001 ppm pe minut până la circa 100 ppm, de exemplu, de la circa 0,1 ppm la circa 100 ppm, de la circa 1 ppm la circa 25 ppm, de la circa 1 ppm la circa 10 ppm, de la circa 0,1 ppm la circa 10 ppm, de la circa 0,01 ppm la circa 30 ppm, de la circa 0.05 ppm la circa 10 ppm, de la circa 0,01 ppm la circa 5 ppm, de la circa 0,02 ppm la circa 2 ppm sau de la circa 0,01 ppm la circa 1 ppm.

[0113] Se are în vedere faptul că, în unele forme de realizare ale prezentei invenții, va fi utilizat un amestec din unul sau mai mulți compuși ai prezentei invenții pentru a atenua sau a reduce gustul amar asociat compoziției. Concentrația unuia sau mai multor compuși poate fi aceeași sau concentrația fiecărui compus poate fi diferită.

[0114] Înainte de a descrie în continuare invenția, sunt furnizate următoarele definiții.

[0115] Termenul familia "T2R" include variante polimorfe, alele, mutanți și omologi care: (1) au identitate de secvență de aminoacid de circa 30-40%, mai specific identitate de secvență de aminoacid de circa 40, 50, 60, 70, 75, 80, 85, 90, 95, 96, 97, 98 sau 99% cu T2R dezvăluit mai jos și în cererile Zuker (ID) (2001) și Adler (Id.) (2001) incluse aici prin referire într-o fereastră de circa 25 aminoacizi, optim 50-100 aminoacizi; (2) se leagă în mod specific de anticorpii crescuți față de un imunogen care cuprinde o secvență de aminoacid selectat din grupul format din secvențe T2R dezvăluite mai jos, și *modifică conservativ variantele acestora*; (3) hibridizează în mod specific (cu un număr de cel puțin circa 100, opțional cel puțin circa 500-1000 nucleotide) în condiții de stricte hibridizare la o secvență selectată din grupul constând din secvențe de ADN T2R dezvăluite mai jos și *modifică conservativ variantele acestora*; (4) cuprind o secvență identică în proporție de cel puțin circa

40% cu o secvență de aminoacid selectat din grupul constând din secvențe de aminoacid T2R dezvăluite mai jos sau (5) sunt amplificați de primeri care se hibridizează în mod specific în condiții stricte de hibridizare cu secvențele T2R descrise.

[0116] În particular, acești "T2R" includ receptorii de gust GPCR menționați aici ca hT2R8 și hT2R14 având secvențe de acid nucleic și secvențe de aminoacid furnizate în această cerere și variante, alele, mutanți, ortologi și himere ale acestora care se leagă în mod specific la liganzii pentru amar care sunt identificați aici și alți compuși înrudiți structural și compuși amari.

[0117] Deși genele T2R prezintă o divergență substanțială a secvențelor atât la nivelul de proteinei, cât și al ADN-ului, s-a constatat că toate T2R izolate până în prezent conțin anumite secvențe consens în regiuni particulare care sunt identice sau care dețin ~~sa~~ cel puțin o identitate de secvență în proporție de cel puțin 70-75% față de secvența consens T2R identificată anterior în Adler și colab. (WO 01/77676 A1 (2001) și Zuker și colab. WO 01/18050 A2, ambele încorporate aici prin referință în integralitatea lor.

[0118] În mod topologic, anumiți GPCR chemosenzoriali au un "domeniu N-terminal", "domenii extracelulare," un "domeniu transmembranar", cuprinzând șapte regiuni transmembranare și bucle citoplasmice și extracelulare corespunzătoare, "regiuni citoplasmice" și o "regiune C-terminală" (a se vedea, de exemplu, Hoon și colab., Cell, 96:541-51 (1999); Buck & Axel, Cell, 65:175-87 (1991)). Aceste regiuni pot fi identificate structural folosind metode cunoscute specialistului în domeniu, cum ar fi programele de analiza secvențială care identifică domeniile hidrofobe și hidrofile (a se vedea, de exemplu, Stryer, Biochemistry, (ed. a 3-a 1988); a se vedea, de asemenea, orice număr al programelor de analiză secvențială bazate pe Internet, cum ar fi cele găsite la dot.imgen.bcm.tmc.edu). Aceste regiuni sunt utile pentru a obține proteine himerice și pentru analizele in vitro ale invenției, de exemplu analizele de legare a ligandului. De exemplu, T2R himeric se poate obține prin combinarea regiunii extracelulare a unui T2R și regiunea transmembranară a altui T2R dintr-o specie identică sau diferită.

[0119] "Domeniile extracelulare" se referă, prin urmare, la domeniile polipeptidelor T2R care ies în evidență din membrana celulară și sunt expuse la fața extracelulară a celulei. Aceste regiuni ar include "domeniul N-terminal" care este expus la fața extracelulară a celulei, precum și buclele extracelulare ale domeniului transmembrantar care sunt expuse la fața extracelulară a celulei, adică buclele extracelulare dintre regiunile transmembranare 2 și 3, regiunile transmembranare 4 și 5 și regiunile transmembranare 6 și 7. "Domeniul N-terminal" pornește la N-terminus și se extinde la o regiune aproape de începutul regiunii transmembranare. Aceste regiuni extracelulare sunt utile pentru testele de legare a ligandului în vitro, faza solubilă și solidă. În plus, regiunile transmembranare descrise mai jos pot fi implicate, de asemenea, în legarea ligandului, fie în combinație cu regiunea extracelulară, fie singură și prin urmare sunt utile, de asemenea, pentru testele de legare a ligandului în vitro.

[0120] "Celula de expresie T2R" cuprinde aici celulele recombinante care exprimă o secvență T2R umană conform invenției, precum și celule de expresie T2R endogene. Astfel de celule sunt cuprinse în sistemul lingual și sistemul gastrointestinal și includ celulele din cavitatea bucală cum ar fi papilele gustative exprimate pe limbă, precum și celulele din sistemul gastro-intestinal și organele asociate, cum ar fi celulele perie în tractul gastro-intestinal, celulele enteroendocrine cum ar fi STC-1. Aceste celule pot exprima, de asemenea, o proteină G, cum ar fi gustducin, transducin, $G_{\alpha 15}$ sau $G_{\alpha 16}$. Celulele care exprima T2R specifice pot fi identificate și izolate prin metode cunoscute, cum ar fi prin separarea celulelor FACS și/sau prin procedurile de izolare a celulelor cu granule magnetice.

[0121] "Domeniul transmembrantar", care cuprinde cele șapte "regiuni" transmembranare, se referă la domeniul polipeptidelor T2R care se află în membrana plasmatică și pot include, de asemenea, buclele extracelulare și citoplasmice (intracelulare) corespunzătoare menționate, de asemenea, ca "regiuni transmembranare". Cele șapte regiuni transmembranare și buclele citoplasmice extracelulare pot fi identificate prin utilizarea metodelor standard, astfel cum este descris în Kyte & Doolittle, J. Mol. Biol., 157:105-32 (1982)) sau în Stryer de mai sus.

[0122] "Domeniile citoplasmatică" se referă la domeniile proteinelor T2R care sunt orientate către interiorul celulei, de exemplu, "domeniul C-terminal", iar buclele intracelulare ale domeniului transmembranar, de exemplu buclele intracelulare dintre regiunile transmembranare 1 și 2, regiunile transmembranare 3 și 4 și regiunile transmembranare 5 și 6. "Domeniul C-terminal" se referă la regiunea care se întinde de la capătul ultimei regiuni transmembranare până la C-terminus al proteinei și care este în mod normal situat în citoplasmă.

[0123] Termenul "receptor 7-transmembranar" înseamnă o polipeptidă aparținând unei superfamilii de proteine transmembranare care au șapte regiuni care traversează membrana plasmatică de șapte ori (astfel, cele șapte regiuni sunt denumite "transmembranare" sau domenii "TM", de la TM I la TM VII). Familiile de receptori olfactivi și anumiți receptori de gust aparțin fiecare acestei superfamilii. Polipeptidele receptorului 7-transmembranar au structuri primare, secundare și terțiare similare și caracteristice, după cum s-a discutat în detaliu mai jos.

[0124] Termenul "regiune ligand-legătură" se referă la secvențe derivate dintr-un receptor chemosenzorial sau de gust care încorporează în mod substanțial domeniile transmembranare II-VII (TM II la VII). Regiunea poate fi capabilă să lege un ligand și, mai particular, un compus care provoacă gustul.

[0125] Termenul "domeniu de translocare membranară plasmatică" sau simplu "domeniu de translocare" înseamnă un domeniu polipeptidic care, atunci când este încorporat în gruparea amino terminus a unei secvențe care codifică polipeptida, poate "însoți" sau "transloca" cu mare eficiență proteina ("fuziune") hibrid la membrana plasmatică celulară. De exemplu, poate fi folosit un "domeniu de translocare" particular, derivat inițial din gruparea amino terminus a polipeptidei receptorului uman rodopsina, un receptor 7-transmembranar. Alt domeniu de translocare a fost derivat din secvența rodopsină bovină și este, de asemenea, util pentru facilitarea translocării. Secvențele derivate din rodopsină sunt eficiente în mod particular în translocarea proteinei de fuziune 7-transmembranare pentru la membrana plasmatică.

[0126] "Echivalența funcțională" înseamnă abilitatea și eficiența domeniului în translocarea proteinelor nou translocate la membrana plasmatică, la fel de eficientă ca un domeniu de translocare din exemple, cum ar fi unul derivat din rodopsină în condiții similare; eficiențele relative pot fi măsurate (în termeni cantitativi) și comparate așa cum este descris aici. Domeniile care intră în domeniul de aplicație al invenției pot fi determinate prin screening de rutină pentru eficiența lor în translocarea polipeptidelor nou sintetizate la membrana plasmatică într-o celulă (mamifere, *Xenopus* și altele), cu aceeași eficiență ca domeniul de translocare lung de douăzeci de aminoacizi SEQ ID NO:1.

[0127] Expresia "efecte funcționale", în contextul analizelor pentru testarea compușilor care modulează transducția gustului mediată de un membru al familiei T2R include determinarea oricărui parametru care este în mod indirect sau direct sub influența receptorului, de exemplu, efecte funcționale, fizice și chimice. Acesta include legarea ligandului, modificările fluxului de ioni, potențialul de membrană, fluxul de curent, transcrierea, legarea proteinei G, fosforilarea sau defosforilarea GPCR, transducția semnalului, interacțiunile receptor-ligand, concentrațiile celui de-al doilea mesager (de exemplu, cAMP, cGMP, IP3 sau Ca^{2+} intracelular), in vitro, in vivo și ex vivo și include, de asemenea, alte efecte fiziologice cum ar fi creșterea sau scăderea eliberării neurotransmițătorului sau a hormonilor.

[0128] Prin "determinarea efectului funcțional" este prezentat testul pentru un compus care mărește sau micșorează un parametru care este direct sau indirect sub influența unui membru al familiei T2R, de exemplu efecte funcționale, fizice și chimice. Astfel de efecte funcționale pot fi măsurate prin orice mijloace cunoscute specialistului în domeniu, de exemplu, modificări ale caracteristicilor spectroscopice (de exemplu, fluorescență, absorbantă, indicii de refracție), hidrodinamice (de exemplu, forma), cromatografice sau proprietățile de solubilitate, plasturi, vopseluri sensibile la tensiune, curenți celulari întregi, eflux radioizotopic, markeri inductibili, expresia genei ovocitului T2R; expresia celulelor de cultură tisulară T2R; activarea transcripției genelor T2R; teste de legare a ligandului; modificări de tensiune, potențial de membrană și conductanță; teste de flux ionic; modificări ale

mesagerilor secundari intracelulari, cum ar fi de cAMP, cGMP și inozitol trifosfat (IP3); modificări ale nivelului de calciu intracelular; eliberarea neurotransmițătorului și altele.

[0129] "Inhibitori", "activatori" și "modulatori" ai receptorilor proteinelor T2R sunt folosite alternativ pentru a se referi la inhibitorii, activarea sau modularea moleculelor identificate cu ajutorul testelor in vitro și in vivo pentru transducția gustului, de exemplu, liganzii agoniști, antagoniștii și omologii lor și mimeticele. Inhibitorii sunt compuși care, de exemplu, dacă sunt legați, blochează parțial sau total stimularea, scad, previn, întârzie activarea, inactivează, desensibilizează sau micșorează transducția gustului, de exemplu, antagoniștii. Activatorii sunt compuși care, de exemplu, dacă sunt legați, stimulează, cresc, deschid, activează, facilitează, măresc activarea, sensibilizează sau cresc transducția gustului, de exemplu, agoniștii. Modulatorii includ compuși care, de exemplu, modifică interacțiunea unui receptor cu proteinele extracelulare care leagă activatorii sau inhibitorii (de exemplu, ebnerin și alți membri ai familiei de purtători hidrofobi); Proteine G; chinaze (de exemplu, omologi ai rodopsin chinazei și receptori ai chinazelor beta-adrenergice care sunt implicați în dezactivarea și desensibilizarea unui receptor); și arestine, care, de asemenea, dezactivează și desensibilizează receptorii). Modulatorii includ versiuni modificate genetic ale membrilor familiei T2R, de exemplu, cu activitate modificată, precum și liganzi naturali și sintetici, antagoniști, agoniști, molecule chimice mici și altele.

[0130] Astfel de teste pentru inhibitori și activatori includ, de exemplu, expresia membrilor familiei T2R în celule sau membrane celulare, aplicând compuși modulatori prezumptivi în prezența sau absența compușilor care modulează, de exemplu, compuși amari și apoi determinarea efectelor funcționale asupra transducției gustului, așa cum este descris mai sus. Eșantioanele sau analizele care cuprind membri ai familiei T2R care sunt tratați cu un potențial activator, inhibitor sau modulator sunt comparate cu probe martor fără inhibitor, activator sau modulator pentru a examina gradul de modulare. Probelor martor (netratate cu modulator) li se atribuie o valoare relativă a activității T2R de 100%. Inhibirea unui T2R este atinsă atunci când valoarea activității T2R raportată la martor este de circa 80%, opțional

50% sau 25-0%. Activarea unui T2R este atinsă atunci când valoarea activității T2R raportată la martor este mai mare cu 110%, opțional 150%, opțional 200-500% sau 1000-3000%.

[0131] Termenii "purificat", " purificat în mod substanțial" și "izolat", așa cum sunt utilizați aici, se referă la starea de a fi liber de alți compuși diferiți cu care compusul invenției este asociat în mod normal în starea sa naturală. De preferat, "purificat", " purificat în mod substanțial" și "izolat" înseamnă că compoziția cuprinde cel puțin 0,5%, 1%, 5%, 10% sau 20% și, cel mai preferabil cel puțin 50% sau 75% din masa, în greutate, a unui eșantion dat. Într-un formă de realizare preferată, acești termeni se referă la compusul invenției cuprinzând cel puțin 95% din masa, în greutate, a unui eșantion dat. Așa cum sunt folosiți aici, termenii "purificat", " purificat în mod substanțial" și "izolat", atunci când se referă la un acid nucleic sau la o proteină, sau la acizi nucleici sau proteine, se referă, de asemenea, la o stare de purificare sau de concentrare diferită față de cea care apare în mod natural în corpul mamiferelor, în special la om. Orice grad de purificare sau de concentrare mai mare decât cea care se produce în mod natural în corpul mamiferelor, în special la om, inclusiv (1) purificarea din alte structuri sau compuși asociați sau (2) asocierea cu structurile sau compușii la care este asociat în mod normal, în corpul mamiferelor, în special al omului, sunt cuprinse în sensul termenului "izolat". Acidul nucleic sau proteina sau clasele de acizi nucleici sau proteine descrise aici pot fi izolate sau altfel asociate cu structurile sau compușii la care nu sunt asociați în mod normal în natură, conform unei varietăți dintre metodele și procedeele cunoscute specialistului în domeniu.

[0132] Așa cum este folosit aici, termenul "izolat", atunci când se referă la un acid nucleic sau polipeptidă, se referă la o stare de purificare sau de concentrare diferită de cea care se produce în mod natural în corpul mamiferelor, în special la om. Orice grad de purificare sau de concentrare mai mare decât cea care se produce în mod natural în organism, inclusiv (1) purificare din alte structuri sau compuși asociate care apar natural sau (2) asocierea cu structurile sau compușii la care nu este asociat în mod normal în organism sunt în înțelesul termenului "izolat", așa cum este utilizat aici. Acizii nucleici sau polipeptidele descrise aici pot fi izolate sau asociate altfel cu

structurile sau compușii la care nu sunt asociate în mod normal în natură, conform unei varietăți a metodelor și procedeeleor specialistului în domeniu.

[0133] După cum folosiți aici, termenii "amplifică" și "amplificare" se referă la utilizarea oricărei metodologii de amplificare adecvate pentru a genera sau a detecta acidul nucleic exprimat recombinant sau natural, așa cum este descris în detaliu mai jos. De exemplu, invenția furnizează metode și reactivi (de exemplu, perechea de primeri de oligonucleotide specifice) pentru amplificarea (de exemplu, prin reacția în lanț a polimerazei, PCR) acizilor nucleici ai invenției (de exemplu, secvențele compus-legătură ce provoacă gustul ale invenției) exprimați natural (de exemplu, genomic sau ARNm) sau recombinant (de exemplu, ADNc), in vivo sau in vitro.

[0134] Termenul "vector de expresie" se referă la orice sistem de expresie recombinantă în scopul de a exprima o secvență de acid nucleic a invenției in vitro sau in vivo, constitutiv sau inductibil, în orice celulă, inclusiv celulă procariotă, drojdie, fungică, de plante, insecte sau de mamifere. Termenul include sisteme de expresie liniare sau circulare. Termenul include sisteme de expresie care rămân episomale sau integrate în genomul celulei gazdă. Sistemele de expresie pot avea capacitatea de a se auto-replica sau nu, adică să conducă doar expresia tranzitorie într-o celulă. Termenul include expresia recombinantă "casete care conțin numai elementele minime necesare pentru transcrierea acidului nucleic recombinant".

[0135] Termenul "bibliotecă" reprezintă un preparat care este un amestec de molecule diferite de acizi nucleici sau polipeptide, cum ar fi biblioteca de regiuni ligand-legătură receptoare de gust particular senzoriale generate recombinant, generate prin amplificarea acidului nucleic cu perechi de primeri degenerați sau pe o colecție izolată de vectori care încorporează regiunile ligand-legătură amplificate sau un amestec de celule, fiecare transfectată aleator cu cel puțin un vector care codifică un receptor de gust.

[0136] Termenul "acid nucleic" sau "secvență de acid nucleic" se referă la o oligonucleotidă dezoxi-ribonucleotidică sau ribonucleotidică în formă simplă sau cu dublă înfășurare. Termenul cuprinde acizi nucleici, adică oligonucleotide, care conțin

analogi cunoscuți de nucleotide naturale. Termenul cuprinde, de asemenea, structuri de tip acid nucleic cu catene principale sintetizate.

[0137] Cu excepția cazului în care se indică altfel, o secvență de acid nucleic particulară, cuprinde de asemenea, în mod implicit, variante modificate conservativ ale acesteia (de exemplu, substituții ale codonului degenerat) și secvențe complementare, precum și secvența indicată în mod explicit. În mod specific, substituțiile codonului degenerat pot fi obținute prin generarea, de exemplu, a secvențelor în care poziția a treia a unuia sau mai multor codoni selectați este substituită cu amestec de baze și/sau reziduuri deoxiinozinice (Batzer și colab., *Nucleic Acid Res.*, 19:5081 (1991); Ohtsuka și colab., *J. Biol. Chem.*, 260:2605-08 (1985); Rossolini și colab., *Mol. Cell. Sonde*, 8:91-98 (1994)). Termenul de acid nucleic este utilizat interschimbabil cu gena, cADN, mRNA, oligonucleotid și polinucleotid.

[0138] Termenii "polipeptidă", "peptidă" și "proteină" sunt folosite alternativ aici pentru a se referi la un polimer al reziduurilor de aminoacizi. Termenii se aplică polimerilor de aminoacizi în care unul sau mai multe reziduuri de aminoacizi este un mimetic chimic artificial al unui aminoacid natural corespunzător, precum și polimerilor de aminoacizi naturali și polimerilor de aminoacizi care nu apar în mod natural.

[0139] așa cum este folosit aici, "alchil", precum și alte grupări care au prefixul "alk", cum ar fi, de exemplu, alcoxi, alcanoil, alchenil, alchinil și altele, reprezintă catene de carbon, care pot fi liniare sau ramificate sau combinații ale acestora. Exemplele de grupări alchil includ metil, etil, propil, izopropil, butil, sec- și terț-butil, pentil, hexil, heptil și altele. Grupările alchil preferate au 1-4 atomi de carbon. "Alchenil" și alți termeni asemănători includ catene de carbon care conțin cel puțin o legătură nesaturată carbon-carbon. "Alchinil" și alți termeni asemănători includ catene de carbon care conțin cel puțin o legătură triplă carbon-carbon bond.

[0140] Termenul "cicloalchil" reprezintă carbocicluri care nu conțin heteroatomi și includ carbocicluri saturate mono-, bi- și triciclice, precum și sisteme ciclice condensate. Exemplele de cicloalchil includ ciclopropil, ciclobutil, ciclopentil,

ciclohexil, decahidronaftalenă, adamantan, indanil, indenil, fluorenil, 1,2,3,4-tetrahidronaftalena și altele.

[0141] Termenul "aril" reprezintă un substituent aromatic, care este un singur inel sau mai multe inele condensate împreună. Grupările de aril din exemple includ, fără limitare, grupări fenil, naftil, antracenil, piridinil, pirazinil, pirimidinil, triazinil, tiofenil, furanil, pirolil, oxazolil, imidazolil, triazolil și tetrazolil. Grupările aril care conțin unul sau mai mulți heteroatomi (de exemplu, piridinil) sunt adesea denumite "grupări heteroaril." Atunci când sunt formate din inele multiple, cel puțin unul dintre constituenții ciclici este aromatic. În unele forme de realizare, cel puțin unul din mai multe inele cuprinde un heteroatom, formând astfel grupări aril care conțin un heteroatom. Grupările aril care conțin un heteroatom includ, fără limitare, grupări benzoxazolil, benzimidazolil, chinoxalinil, benzofuranil și 1H-benzo[d][1,2,3]triazolil. Grupările aril care conțin un heteroatom includ, de asemenea, fără limitare, grupări 2,3-dihidrobenczo[b][1,4]dioxinil și benzo[d][1,3]dioxolil. Grupările aril care conțin un heteroatom includ, de asemenea, cicluri aromatice condensate cu un ciclu heterociclic care conține cel puțin un heteroatom și cel puțin o grupare carbonil. Aceste grupări includ, fără limitare, grupări dioxo tetrahydrochinoxalinil și dioxo tetrahydroquinazolinil.

[0142] Termenul "arilalcoxi" reprezintă o grupare aril legată la o grupare alcoxi.

[0143] Termenul "arilamidoalchil" reprezintă un aril-C(O)NR-alchil sau aril-NRC(O)-alchil.

[0144] Termenul "arilalchilamidoalchil" reprezintă un aril-alchil-C(O)NR-alchil sau aril-alchil-NRC(O)-alchil, unde R este orice grupare adecvată enumerată mai jos.

[0145] Termenul "arilalchil" se referă la o grupare aril legată la o grupare alchil.

[0146] Termenul "halogen" sau "halo" se referă la clor, brom, fluor sau iod.

[0147] Termenul de "grupare fugace" se referă la o grupare funcțională sau atom care pot fi înlocuite de către o altă grupare funcțională sau atom într-o reacție de substituție, cum ar fi o reacție de substituție nucleofilă. Cu titlu de exemplu, grupările fugace reprezentative includ grupări clorură, bromură și iodură; grupări ester sulfonice, cum ar fi mesilat, tosilat, brosilat, nosilat și altele; și grupări aciloxi, cum ar fi acetoxi, trifluoroacetoxi și altele.

[0148] Termenul "haloalchil" reprezintă o grupare alchil având unul sau mai mulți atomi de halogen (de exemplu, CF₃).

[0149] Termenul "heteroalchil" se referă la un radical alchil care cuprinde un heteroatom, cum ar fi N, O, P, B, S sau Si. Heteroatomul poate fi conectat la restul radicalului heteroalchil printr-o legătură saturată sau nesaturată. Astfel, un alchil substituit cu o grupare, cum ar fi heterocicloalchil, heterocicloalchil substituit, heteroaril, heteroaril substituit, alcoxi, ariloxi, boril, fosfino, amino, silil, tio sau seleno, se află în sfera de aplicare a termenului heteroalchil. Exemplele de heteroalchili includ, dar nu sunt limitate la ciano, de benzoil, 2-piridil și 2-furil.

[0150] Termenul "heteroarilalchil" reprezintă o grupare heteroaril la care este atașată o grupare alchil.

[0151] Termenul "heterociclu" reprezintă un ciclu monociclic sau policiclic care cuprinde atomi de carbon și de hidrogen, având opțional 1 sau 2 legături multiple și atomii ciclului conțin cel puțin un heteroatom, în mod specific 1 - 4 heteroatomi, selectați independent dintre azot, oxigen și sulf. Structurile de inel heterociclic includ, dar nu se limitează la compuși mono-, bi-, și tri-ciclici. Heterociclurile specifice sunt monociclic sau biciclic. Heterociclurile reprezentative includ uree ciclică, morfolinil, pirolidinonil, pirolidinil, piperidinil, piperazinil, hidantoinil, valerolactamil, oxiranil, oxetanil, tetrahidrofuranil, tetrahidropiranil, tetrahidropiridinil, tetrahidropirimidinil, tetrahidrotiofenil, tetrahidrotiopianil, tetrazolil și urazolil. Un ciclu heterociclic poate fi nesubstituit sau substituit. Heterociclurile preferate sunt heterocicluri cu 5- și 6-atomi, în special hidantoinil și urazolil.

[0152] Termenul "heterocicloalchil" se referă la o grupare cicloalchil în care cel puțin unul dintre atomi de carbon din ciclu este înlocuit cu un heteroatom (de exemplu, O, S sau N).

[0153] Termenul "heterocicloalchilalchil" reprezintă o grupare heterocicloalchil la care este atașată o grupare alchil.

[0154] Termenul "substituit" prevede și permite în mod specific una sau mai multe substituții care sunt obișnuite în domeniu. Cu toate acestea, este înțeles în general de specialistul în domeniu că substituenții trebuie să fie selectați astfel încât să nu afecteze în mod negativ caracteristicile utile ale compusului sau să nu interfereze negativ cu funcția sa. Substituenții adecvați pot include, de exemplu, grupări halogen, grupări perfluoroalchil, grupări perfluoroalcoxi, grupări alchil, grupări alchenil, grupări alchinil, grupări hidroxi, grupări oxo, grupări mercapto, grupări alchiltio, grupări alcoxi, grupări aril sau heteroaril, grupări ariloxi sau heteroariloxi, grupări aralchil sau heteroaralchil, grupări aralcoxi sau heteroaralcoxi, grupări amino, grupări alchil- și dialchilamino, grupări carbamoil, grupări alchilcarbonil, grupări carboxil, grupări alcoxicarbonil, grupări alchilaminocarbonil, grupări dialchilamino carbonil, grupări arilcarbonil, grupări ariloxicarbonil, grupări alchilsulfonil, grupări arilsulfonil, grupări cicloalchil, grupări ciano, grupări C₁-C₆ alchiltio, grupări ariltio, grupări nitro, grupări keto, grupări acil, grupări boronat sau boronil, grupări fosfat sau fosfonil, grupări sulfamil, grupări sulfonil, grupări sulfinil și combinații ale acestora. În cazul combinațiilor substituite, cum ar fi "arilalchil substituit", poate fi substituită fie gruparea aril, fie gruparea alchil, sau pot fi substituite ambele grupări aril și alchil cu unul sau mai mulți substituenți. În plus, în unele cazuri, substituenții adecvați se pot combina pentru a forma unul sau mai multe cicluri, după cum este cunoscut specialistului în domeniu.

[0155] Compușii descriși aici conțin una sau mai multe legături duble și astfel pot da naștere izomerilor cis/trans, precum și altor izomeri conformaționali. Invenția prezentă include toți izomerii astfel posibili, precum și amestecuri ale unor astfel de izomeri.

[0156] Compușii descriși aici și în particular substituenții descriși mai sus pot conține unul sau mai mulți centri de asimetrie și pot da naștere astfel la diastereoizomeri și izomeri optici. Invenția prezentă include toți diastereoizomerii astfel posibili, precum și amestecuri racemice ale acestora, enantiomeri lor puri, în mod substanțial, în stare de rezoluție, toți izomerii geometrici posibili și sărurile acceptabile ale acestora. În plus, sunt de asemenea incluse amestecuri de stereoizomeri, precum și stereoizomeri specifici izolați. Pe parcursul procedurilor de sinteză folosite pentru a prepara astfel de compuși sau în utilizarea procedurilor de racemizare sau epimerizare cunoscute specialistului în domeniu, produsele unor astfel de proceduri pot fi un amestec de stereoizomeri.

[0157] Așa cum este folosit aici, termenul "săruri" și "săruri acceptabile farmaceutic" se referă la derivați ai compușilor dezvoltăți în care compusul mamă este modificat prin obținerea sărurilor cu un acid sau cu o bază ale acestuia. Exemplele de săruri acceptabile farmaceutic includ, dar nu sunt limitate la săruri cu acizi minerali sau organici ale grupărilor bazice cum ar fi aminele; și săruri de metale alcaline sau organice ale grupărilor acide cum ar fi acizii carboxilici. Sărurile acceptabile farmaceutic includ săruri neconvenționale toxice sau săruri cuaternare de amoniu ale compusului mamă format, de exemplu, din acizi anorganici sau organici netoxici. De exemplu, astfel de săruri convenționale netoxice le includ pe cele derivate de la acizi anorganici cum ar fi clorhidric, bromhidric, sulfuric, sulfamic, fosforic și azotic; și sărurile preparate din acizi organici cum ar fi acetic, propionic, succinic, glicolic, stearic, lactic, malic, tartric, citric, ascorbic, pamoic, maleic, hidroximaleic, fenilacetic, glutamic, benzoic, salicilic, sulfanilic, 2-acetoxibenzoic, fumaric, toluensulfonic, metansulfonic, etan disulfonic, oxalic și isetionic și altele.

[0158] Sărurile acceptabile farmaceutic de prezentei invenții pot fi sintetizate din compusul mamă care conține un radical bazic sau acid prin metode chimice convenționale. În general, astfel de săruri pot fi preparate prin reacția formelor de acid sau bază libere ale acestor compuși cu o cantitate stoechiometrică a bazei sau acidului adecvat în apă sau într-un solvent organic sau într-un amestec al celor două; în general, sunt de preferat mediile neapoase ca eterul, acetatul de etil, etanolul, izopropanolul sau acetonitrilul. Liste de săruri adecvate se găsesc în *Remington's*

Pharmaceutical Sciences, ed. a 17-a, Mack Publishing Company, Easton, Pa, 1985, pag. 1418, a căror divulgare este încorporată aici introduse prin referință.

[0159] Termenul "solvat" reprezintă un compus sau o sare a acestuia care include și o cantitate stoechiometrică sau nestoechiometrică de solvent legat prin forțe intermoleculare necovalente. În cazul în care solventul este apa, solvatul este un hidrat.

[0160] Termenul "promedicament" reprezintă un derivat al unui compus care poate hidroliza, oxida sau reacționa altfel în condiții biologice (in vitro sau in vivo) pentru a furniza un compus activ, în particular un compus al invenției. Exemplele de promedicamente includ, dar nu se limitează la derivații și metabolizii unui compus al invenției care includ radicali biohidrolizabili cum ar fi amide biohidrolizabile, esteri biohidrolizabili, carbamați biohidrolizabili, carbonați biohidrolizabili, ureide biohidrolizabile și analogi de fosfat biohidrolizabili. Promedicamentele specifice ale compușilor cu grupări funcționale carboxil sunt esterii de alchil inferiori ai acidului carboxilic. Esterii carboxilat sunt formați în mod convenabil prin esterificarea oricăreia dintre radicalii acidului carboxilic prezenți pe moleculă. Promedicamentele pot fi preparate de obicei folosind metode binecunoscute, cum ar fi cele descrise de *Burger's Medicinal Chemistry and Drug Discovery* ed. a 6-a (Donald J. Avraam, ed., 2001, Wiley) și *Design and Application of Prodrugs* (H. Bundgaard ed., 1985, Harwood Academic Publishers Gmfh).

[0161] Așa cum este folosit aici și dacă nu este indicat altfel, termenii "amidă biohidrolizabilă", "ester biohidrolizabil", "carbamat biohidrolizabil", "carbonat biohidrolizabil", "ureido biohidrolizabil", "fosfat biohidrolizabil" reprezintă o amidă, un ester, un carbamat, un carbonat, un ureido sau respectiv un fosfat al un compus care fie: 1) nu interferează cu activitatea biologică a compusului, dar îi poate conferi acestui compus proprietăți avantajoase in vivo, cum ar fi adsorbție, durată al acțiunii sau debut al acțiunii; sau 2) este biologic inactiv, dar este transformat in vivo în compusul biologic activ. Exemplele de esteri biohidrolizabili includ, dar nu se limitează la esteri de alchil inferiori, esteri alcoxiaciloxi, esteri alchil acilamino alchil și esteri de colină. Exemplele de amide biohidrolizabile includ, dar nu se limitează la

alchil amide inferioare, alfa-aminoacid amide, alcoxiacil amide și alchilaminoalchilcarbonil amide. Exemplele de carbamați biohidrolizabili includ, dar nu se limitează la alchilamine inferioare, etilendiamine substituie, aminoacizi, hidroxi alchilamine, amine heterociclice și heteroaromatice și polieter amine.

[0162] Așa cum este folosit aici, termenul "analogi ai acestora" în contextul compușilor dezvăluiți aici include diastereoizomeri, hidrați, solvați, săruri, promedicamente și N-oxizi ai compușilor.

[0163] "Domeniul translocăție", "regiunea ligand-legătură" și compozițiile receptoare himerice descrise aici includ, de asemenea, "analogi," sau "variante conservative" și "mimetice" ("peptidomimetice"), cu structuri și activitate care corespunde în mod substanțial cu secvențele din exemple. Astfel, termenii "variante conservativă" sau "analogă" sau "mimetică" se referă la o polipeptidă care are o secvență de aminoacid modificată, astfel încât schimbarea(ile) să nu modifice substanțial structura și/sau activitatea polipeptidei (variante lui conservativă), astfel cum sunt definite aici. Acestea includ variații modificate conservativ ale unei secvențe de aminoacid, adică substituții, aditii sau stergeri de aminoacizi ale acestor reziduuri care nu sunt critice pentru activitatea proteinei, sau substituția aminoacizilor cu reziduuri având proprietăți similare (de exemplu, acide, bazice, încărcate pozitiv sau negativ, polare sau nepolare, etc), astfel încât, substituțiile aminoacizilor, chiar și critice, nu modifică în mod substanțial structura și/sau activitatea.

[0164] Mai particular, "variantele modificate conservativ" se aplică atât secvențelor de aminoacizi, cât și de acid nucleic. În ceea ce privește anumite secvențe de acid nucleic, variantele modificate conservativ se referă la acei acizi nucleici care codifică secvențe de aminoacizi identice sau în esență identice de acid sau în cazul în care acidul nucleic nu codifică o secvență de aminoacid, la secvențele identice în esență. Din cauza degenerării codului genetic, un număr mare de acizi nucleici identici funcțional codifică orice proteină dată.

[0165] De exemplu, toți codonii GCA, GCC, GCG și CGU codifică aminoacidul alanina. Astfel, la fiecare poziție în care o alanină este specificată de un codon,

codonul poate fi alterat la oricare dintre codonii corespunzători descriși fără alterarea polipeptidei codificate.

[0166] Astfel de variații ale acidului nucleic sunt "variații tăcute", care sunt o specie de variații modificate conservativ. Fiecare secvență de acid nucleic de aici, care codifică o polipeptidă, descrie, de asemenea, fiecare variație "tăcută" posibilă a acidului nucleic. Un specialist în domeniu va recunoaște faptul că fiecare codon într-un acid nucleic (cu excepția AUG, care este de obicei singurul codon pentru metionină și TGG, care este de obicei singurul codon pentru triptofan) poate fi modificat pentru a permite obținerea unei molecule identice funcțional. În consecință, fiecare variație tăcută a unui acid nucleic care codifică o polipeptidă este implicit în fiecare secvență descrisă.

[0167] Tabelele de substituție conservativă care furnizează aminoacizi similari funcțional sunt binecunoscute în domeniu. De exemplu, un ghid exemplar pentru a selecta substituțiile conservative include (reziduu original, urmată de substituție exemplară): ala/gly sau ser; arg/lys; asn/gln sau his; asp/glu; cys/ser; gin/asn; gly/asp; gly/ala sau pro; his/asn sau gln; ile/leu sau val; leu/ile sau val; lys/arg sau gln sau glu; met/leu sau tyr sau ile; phe/met sau leu sau tyr; ser/thr; thr/ser; trp/tyr; tyr/trp sau phe; val/ile sau leu. Un ghid exemplar alternativ folosește următoarele șase grupe, fiecare conținând aminoacizi, care sunt substituții conservative unul pentru altul: 1) Alanina (A), Serina (S), Treonina (T); 2) Acid aspartic (D), Acid glutamic (E); 3) Asparagina (N), Glutamina (Q); 4) Arginina (R), Lizina (I); 5) Isoleucina (I), Leucina (L), Metionina (M), Valina (V); și 6) Fenilalanina (F), Tirozina (Y), Triptofan (W); (a se vedea, de asemenea, de exemplu, Creighton, Proteins, W.H. Freeman and Company (1984); Schultz and Schimer, Principles of Protein Structure, Springer-Verlag (1979)). Un specialist în domeniu va aprecia că substituțiile identificate mai sus nu sunt singurele substituții conservative posibile. De exemplu, pentru anumite scopuri, se pot considera toți aminoacizii încărcăți ca substituții conservative unul pentru celălalt, indiferent dacă sunt pozitivi sau negativi. În plus, substituțiile individuale, eliminările și adăruțiile care modifică, adaugă sau șterg un singur aminoacid sau un procent mic de aminoacizi într-o secvență codificată pot fi, de asemenea, considerat "variații modificate conservativ."

[0168] Termenii "mimetic" și "peptidomimetic" se referă la un compus chimic sintetic care are în mod substanțial aceleași caracteristici structurale și/sau functionale ale polipeptidei, de exemplu, domenii de translocare, regiuni ligand-legătură sau receptori himerici ai invenției. Mimeticul poate fi în întregime compus din analogi sintetici, nenaturali ai aminoacizilor sau poate fi o moleculă himerică de aminoacizi peptidici parțial naturali și analogi de aminoacizi parțial nenaturali. Mimeticul poate încorpora, de asemenea, orice cantitate de substituții conservative de aminoacizi naturali, atâta timp cât aceste substituții, de asemenea, nu alterează în mod substanțial structura și/sau activitatea mimeticului.

[0169] Ca și în polipeptide invenției, care sunt variante conservative, experimentele de rutină vor stabili dacă un mimetic este în domeniul de aplicare al invenției, și anume că structura și/sau funcția sa nu este alterată substanțial. Compozițiile mimetice polipeptidice pot conține orice combinație de componente structurale nenaturale, care sunt de obicei din trei grupări structurale: a) grupări de legătură reziduale, altele decât lanțurile de legături amidice naturale ("peptidă de legătură"); b) reziduuri nenaturale în locul reziduurilor de aminoacizi naturali sau c) reziduuri care induc mimetism secundar structural, adică, pentru a induce sau a stabili o structură secundară, de exemplu, un viraj beta, viraj gama, foaie beta, conformație alfa helix și altele. O polipeptidă poate fi caracterizată ca un mimetic atunci când toate sau unele dintre reziduurile sale sunt reunite prin mijloace chimice, altele decât legăturile peptidice naturale. Reziduurile peptidomimetice individuale pot fi reunite prin de legături peptidice, alte legături chimice sau mijloace de cuplare, cum ar fi, de exemplu, glutaraldehida, esterii N-hidroxisuccinimidici, maleimidele bifuncționale, N,N'-diciclohexilcarbodiimidele (DCC) sau N,N'-diisopropilcarbodiimidele (DIC). Grupările de legătură, care pot fi o alternativă la lanțurile de legături amidice naturale ("peptidă de legătură"), includ, de exemplu, chetometilen (de exemplu, $-C(=O)-CH_2$ pentru $-C(=O)-NH-$), aminometilena (CH_2NH), etilena, olefina ($CH.dbd.CH$), eterul (CH_2O), tioeterul (CH_2-S), tetrazolul (CN_4), tiazolul, retroamida, tioamida sau esterul (a se vedea, de exemplu, Spatola, Chemistry and Biochemistry of Amino Acids, Peptides and Proteins, Vol. 7, 267-357, Marcell Dekker, Peptide Backbone Modifications, NY (1983)). O polipeptidă

poate fi, de asemenea, caracterizată ca un mimetic prin conținerea tuturor sau a unor reziduuri nenaturale în locul reziduurilor de aminoacizi naturali; reziduurile nenaturale sunt descrise bine în literatura științifică și de brevete.

[0170] O "etichetă" sau un "radical detectabil" este o compoziție detectabilă prin mijloace spectroscopice, fotochimice, biochimice, imunochimice sau chimice. De exemplu, etichetele utile includ ^{32}P , vopsele fluorescente, reactivi cu densitate electronică, enzime (de exemplu, așa cum utilizate în mod obișnuit într-un ELISA), biotină, digoxigenin sau haptene și proteine care pot fi făcute detectabile, de exemplu, prin incorporarea unei radioetichete în peptidă sau utilizate pentru detectarea anticorpilor reactivi în mod specific cu peptida.

[0171] O "probă de acid nucleic sau oligonucleotidă etichetată" este cea care este legată fie covalent, printr-un linker sau o legătură chimică, sau necovalent, prin intermediul legăturilor ionice, van der Waals, electrostatice sau de hidrogen la o etichetă astfel ca prezența sondei să poată fi detectată prin detectarea prezenței etichetei legate de sondă.

[0172] Așa cum este folosit aici, "o sondă sau oligonucleotid de acid nucleic" este definită ca un acid nucleic capabil de legare la un acid nucleic țintă a secvenței complementare prin una sau mai multe tipuri de legături chimice, de obicei, prin perechi de baze complementare, de obicei, prin formarea legăturii de hidrogen. Așa cum este folosit aici, o sondă poate include baze naturale (de exemplu, A, G, C sau T) sau modificate (7-deazaguanosin, inozin, etc.) În plus, bazele într-o sondă pot fi unite printr-o legătură, alta decât o legătură phosphodiester, atât timp cât nu interfereze cu hibridizare. Astfel, de exemplu, sondele pot fi acizi nucleici peptidici în care s-au alăturat bazele constitutive prin legături peptidice, mai degrabă decât legături fosfodiester. Va fi de înțeles de specialistul în domeniu că sondele pot lega secvențele vizate lipsite de complementaritatea completă cu secvența sondei, în funcție de rigurozitatea condițiilor de hibridizare. Sondele sunt etichetate opțional direct cu izotopi, chromofori, lumifori, chromogeni sau etichetate indirect, cum ar fi cu biotină la care un complex streptavidin se poate lega mai târziu. Prin testarea

prezenței sau absenței sondei, se poate detecta prezența sau absența secvenței sau subsecvenței selectate.

[0173] Termenul "heterolog", atunci când este utilizat cu referire la porțiuni ale unui acid nucleic, indică faptul că acidul nucleic cuprinde două sau mai multe subsecvențe care nu se găsesc în aceeași relație una față de cealaltă în natură. De exemplu, acidul nucleic este de obicei produse recombinant, având două sau mai multe secvențe de la gene care nu au legătură aranjate pentru a face un nou acid nucleic funcțional, de exemplu, un promotor dintr-o sursă și o regiune de codificare de la o altă sursă. În mod similar, o proteină heterologă indică faptul că proteina cuprinde două sau mai multe subsecvențe care nu se găsesc în aceeași relație una față de cealaltă în natură (de exemplu, o proteină de fuziune).

[0174] Un "promotor" este definit ca o serie de secvențe de acid nucleic care direcționează transcrierea unui acid nucleic. Așa cum este folosit aici, un promotor include secvențe de acid nucleic necesare în apropiere de site-ul de începere a transcrierii, cum ar fi în cazul unui promotor de tip II polimerază, un element TATA. Un promotor include de asemenea, opțional, elemente potențatoare sau represoare distale, care pot fi amplasate în număr de mai multe mii de perechi bază de la începutul site-ul de transcriere. Un promotor "constitutiv" este un promotor care este activ în cele mai multe condiții de mediu și de dezvoltare. Un promotor "inductibil" este un promotor care este activ în conformitate cu Regulamentul de mediu sau de dezvoltare. Termenul de "legat operabil" se referă la o legătură funcțională între o secvență martor de expresie a acidului nucleic (cum ar fi un promotor sau o serie de site-uri de legare a factorului de transcripție) și o secvență de acid nucleic secundară, în care expresia secvenței martor direcționează transcripția acidului nucleic corespunzător celei de-a doua secvențe.

[0175] Așa cum este folosit aici, "recombinant" se referă la o polinucleotidă sintetizată sau în alt mod manipulată in vitro (de exemplu, "polinucleotidă recombinantă"), la metode de utilizare a polinucleotidelor recombinante pentru a produce produse genă în celule sau alte sisteme biologice sau la o polipeptidă ("proteină recombinantă"), codificate de o polinucleotidă recombinantă. "Mijloace

recombinante" cuprinde, de asemenea, ligarea/ligation acizilor nucleici având diferite regiuni de codificare sau domenii sau secvențe promotor din diferite surse într-o casetă de expresie sau vector pentru exprimarea, de exemplu, a expresiei inductibile sau constitutive a unei proteine de fuziune care cuprinde un domeniu de translocare al invenției și o secvență de acid nucleic amplificat utilizând un primer al invenției.

[0176] Expresia "hibridizează selectiv (sau în mod specific) la" se referă la legarea, duplexarea sau hibridizarea a unei molecule numai la o anumită secvență de nucleotidă în condiții stricte de hibridizare, atunci când această secvență este prezentă într-un amestec complex (de exemplu, ADN sau ARN bibliotecă sau total celular).

[0177] Expresia "condiții de hibridizare stricte" se referă la condițiile în care o sondă va hibridiza la subsecvența sa țintă, de obicei într-un amestec complex de acid nucleic, nu și la alte secvențe. Condițiile stricte sunt dependente de secvență și vor fi diferite în diferite circumstanțe. Secvențele mai lungi hibridizează în mod specific la temperaturi mai mari. Un ghid extensiv de hibridizare a acizilor nucleici se găsește în Tijssen, *Techniques in Biochemistry and Molecular Biology--Hybridization with Nucleic Probes*, "Overview of principles of hybridization and the strategy of nucleic acid assays" (1993). În general, condițiile stricte sunt selectate pentru a fi cu circa 5-10°C mai mici decât punctul de topire termică (T_m) pentru secvența specifică, la un pH cu putere ionică definită. T_m este temperatura (la putere ionică, pH și concentrație nucleică definite) la care 50% din sondele/probes complementare țintei hibridizează la secvența țintă la echilibru (când secvențele țintă sunt prezente în exces, la T_m , 50% din sonde sunt ocupate la echilibru). Condițiile stricte vor fi cele în care concentrația de sare este mai mică de circa 1.0 M ioni de sodiu, în mod tipic de circa 0.01 la 1.0 M concentrație de ioni de sodiu (sau alte săruri) la pH între 7.0 și 8.3, iar temperatura este cel puțin de circa 30°C pentru sondele scurte (de exemplu, 10 la 50 nucleotide) și de cel puțin circa 60°C pentru sondele lungi (de exemplu, mai mari de 50 nucleotide). Condițiile stricte pot fi, de asemenea, obținute cu un adaos de agenți destabilizatori, cum ar fi formamida. Pentru hibridare selectivă sau specifică, un semnal pozitiv este cel

puțin de două ori cel de bază, opțional de 10 ori hibridizarea de bază. Condițiile stricte de hibridizare din exemple pot fi după cum urmează: 50% formamidă, 5xSSC, și 1% SDS, incubare la 42°C or 5xSSC, 1% SDS, incubare la 65°C cu apă în 0.2xSSC și 0.1% SDS la 65°C. Astfel de etape de hibridizare și spălări se pot efectua, de exemplu, timp de 1, 2, 5, 10, 15, 30, 60 minute sau mai mult.

[0178] Acizii nucleici care nu hibridizează unul în celălalt în condiții stricte sunt încă în mod substanțial legați dacă polipeptidele pe care le codifică sunt legate în mod substanțial. Acest lucru se întâmplă, de exemplu, când o copie a unui acid nucleic este creat folosind degenerarea maximă a codonului permisă de codul genetic. În astfel de cazuri, acizii nucleici hibridizează de obicei în condiții de hibridizare stricte moderate. "Condițiile de hibridizare stricte moderate" din exemple includ o hibridizare într-un tampon de 40% formamidă, NaCl 1 M, SDS 1% la 37°C și o spălare în 1xSSC la 45°C. Astfel de etape de hibridizare și spălare se pot efectua, de exemplu, timp de 1, 2, 5, 10, 15, 30, 60 de minute sau mai mult. O hibridizare pozitivă este de cel puțin de două ori baza. Specialistul în domeniu va recunoaște cu ușurință că hibridizarea alternativă și condițiile de spălare pot fi utilizate pentru a oferi condiții de stringență similare.

[0179] "Anticorprii" se referă la o polipeptidă care cuprinde o regiune cadru dintr-o genă imunoglobulină sau fragmente ale acesteia care se leagă în mod specific și recunoaște un antigen. Genele imunoglobulină recunoscute includ genele de regiune constantă kappa, lambda, alfa, gama, delta, epsilon și mu, precum și nenumăratele genele de regiune variabilă imunoglobulina. Catenele scurte sunt clasificate fie kappa, fie lambda. Catenele lungi sunt clasificate ca gamma, mu, alfa, delta sau epsilon, care, la rândul lor, definesc clasele de imunoglobuline IgG, IgM, IgA, IgD și respectiv IgE.

[0180] O unitate structurală imunoglobulină din exemple (anticorpi) cuprinde un tetramer. Fiecare tetramer este compus din două perechi identice de catene de polipeptidă, fiecare pereche având o catenă "ușoară/scurtă" (circa 25 kDa) și una "lungă/grea" (în jur de 50-70 kDa). N-terminus al fiecărei catene definește o regiune

variabilă de circa 100 la 110 sau mai mulți aminoacizi responsabili în primul rând de recunoașterea antigenului. Termenii catenă ușoară variabilă (V_L) și catenă grea variabilă (V_H) se referă la aceste catene, respectiv ușoară și grea.

[0181] Un "anticorp himeric" este o moleculă de anticorp în care (a) regiunea constantă sau o parte a acesteia este alterată, înlocuită sau schimbată, astfel încât site-ul de legare a antigenului (regiune variabilă) este legat la o regiune constantă a unei clase diferite sau alterate, funcție efectoră și/sau specii sau la o moleculă diferită în întregime, care conferă proprietăți noi anticorpului himeric, de exemplu enzimă, toxină, hormon, factor de creștere, medicament etc; sau (b) regiunea variabilă sau o parte a acesteia, este alterată, înlocuită sau schimbată cu o regiune variabilă având o specificitate antigenică diferită sau alterată.

[0182] Un anticorp "anti-T2R" este un anticorp sau fragment de anticorp care se leagă în mod specific la o polipeptidă codificată de o genă T2R, ADNc sau o subsecvență a acestora.

[0183] Termenul "analiză imunologică" este o analiză care folosește un anticorp pentru a lega în mod specific un antigen. Analiza imunologică este caracterizată prin utilizarea unor proprietăți de legare specifice ale unui anticorp particular pentru a izola, ținti și/sau cuantifica antigenul.

[0184] Expresia "leagă în mod specific (sau selectiv)" la un anticorp sau, "imunoreactivă în mod specific (sau selectiv) cu", când se referă la o proteină sau peptidă, se referă la o reacție de legare care este determinantă în prezența proteinei într-o populație eterogenă de proteine și alte produse biologice. Astfel, în condiții desemnate de analize imunologice, anticorpul specificat se leagă la o proteină particulară de cel puțin două ori față de bază și nu se leagă în mod substanțial într-o cantitate semnificativă de alte proteine prezente în eșantion. Legătura specifică la un anticorp în astfel de condiții poate necesita un anticorp care este selectat pentru specificitatea sa pentru o proteină particulară.

[0185] De exemplu, anticorpii policlonali crescuți la un membru al familiei T2R de la anumite specii, cum ar fi șobolan, șoarece sau om pot fi selectați pentru a obține numai acei anticorpi policlonali care sunt imunoreactivi în mod specific cu polipeptida T2R sau o porțiune imunogenică a acesteia și nu cu alte proteine, cu excepția ortologilor sau variantelor polimorfe și alele ale polipeptidei T2R. Această selecție poate fi atinsă prin extragerea anticorpilor care reacționează încrucișat cu moleculele T2R de la alte specii sau alte molecule T2R. Anticorpii pot fi selectați, de asemenea, pentru a recunoaște numai membrii familiei T2R GPCR, dar nu GPCR de la alte familii. O varietate de formate de analize imunologice pot fi utilizate pentru a selecta anticorpii în mod specific imunoreactivi cu o proteină particulară. De exemplu, analizele imunologice ELISA în fază solidă sunt folosite de obicei pentru a selecta anticorpii imunoreactivi în mod specific cu o proteină (a se vedea, de exemplu, Harlow & Lane, Antibodies, A Laboratory Manual, (1988), pentru o descriere a formatelor analizelor imunologice și condițiilor care pot fi utilizate pentru a determina imunoreactivitatea specifică). În mod tipic, o reacție specifică sau selectivă va fi cel puțin de două ori semnalul de fond sau zgomot și mai mult, de obicei mai mult de 10 la 100 ori baza.

[0186] Expresia "asociat selectiv cu" se referă la capacitatea unui acid nucleic de a "hibridiza selectiv" cu altul definit mai sus sau la capacitatea unui anticorp de a "se lega selectiv (sau specific)" la o proteină, astfel cum sunt definite mai sus.

[0187] Termenul "vector de expresie" se referă la orice sistem de expresie recombinantă în scopul de a exprima o secvență de acid nucleic a invenției in vitro sau in vivo, constitutiv sau inductibil, în orice celulă, inclusiv celulă de procariot, drojdie, fungi, de plante, insecte sau de mamifere. Termenul include sisteme de expresie liniare sau circulare. Termenul include sisteme de expresie care rămân episomale sau se integrează în genomul celulei gazdă. Sistemele de expresie pot avea capacitatea de a se autoreplica sau nu, adică, să conducă doar expresia tranzitorie într-o celulă. Termenul include expresia recombinantă "casete care conțin numai elementele minime necesare pentru transcripția acidului nucleic recombinant".

[0188] Prin celula gazdă "" se înțelege o celulă care conține un vector de expresie și sprijină replicarea sau expresia vectorului de expresie. Celulele gazdă pot fi celule procariote, cum ar fi E. coli sau celule eucariote, cum ar fi drojdie, insectă, amfibian sau celule de mamifere, cum ar fi CHO, HeLa, HEK-293 și altele, de exemplu, celule de cultură, explant și celule in vivo.

[0189] Bazată pe cele de mai sus, invenția actuală furnizează analize de identificare a compușilor care modulează, de preferință blochează, activarea specifică a receptorilor de gust amar umani identificați anterior prin compuși amari, de exemplu, compuși amari prezenți în cafea și extractele derivate din aceasta și structural conexe și alți compuși amari. În special, invenția prevede analize pe bază de celule pentru identificarea compușilor care modulează (de exemplu, blochează), activarea hT2R8 și hT2R14. Acești compuși vor modula gustul amar asociat cu acești receptori de gust la subiecții umani. Acest lucru va fi confirmat în testele de gust.

[0190] De asemenea, invenția identifică și oferă un antagonist cu largi proprietăți antagoniste care poate fi utilizat în produsele alimentare, băuturi, medicamente și alte materiale pentru ingestie umană sau animală care conțin compuși cunoscuți și necunoscuți amari, unde gustul amar este dorit a fi minimizat sau eliminat.

[0191] Faptul că receptorii de gust de mai sus răspund în mod specific la compusul/compușii cu gust amar prezenți în cafea și la compușii amari specifici care interacționează cu unul, mai mulți sau receptori de gust amar necunoscuți a fost determinat, în esență, folosind sistemul de expresie HEK293 și metodele imagistice ale calciului raportate în alte publicații, precum și cererile de brevet depuse de către cesionarul prezent, de exemplu, SUA Serial No. 10/191,058 și 09/825,882, ambele încorporate aici prin referință în integralitatea lor. Mai precis, inventatorii prezenți au transfectat celule HEK293 cu o hT2R particulară, marcată cu o etichetă de aminoacid 35 al rodopsinei (SEQ ID NO: 1) împreună cu o proteină himeră G (G16gust44), care cuprinde secvența proteinei G, și anume G_{α16} modificată prin înlocuirea reziduurilor aminoacidului carboxi-44 cu cele ale

gustducin-ei și a înregistrat răspunsurile acestor celule la liganzi de amar specifici, prin metode imagistice ale calciului.

[0192] Mai exact, inventatorii au folosit o analiză bazată pe celule de mamifer pentru a monitoriza activitățile hT2R. Pentru testele imagistice ale calciului, celulele au fost însămânțate în plăci de cultură tisulară cu 48 de godeuri. 24 ore mai târziu, celulele au fost transfectate tranzitorii cu o plasmidă de expresie (pEAK10), care conține o secvență de acid nucleic hT2R și o plasmidă (pEAK10) care conține o proteină G himerică (G16gust44). După alte 24 ore, celulele au fost incubate cu un colorant fluorescent specific pentru calciu (Fluo-4; Sonde moleculare). Celulele încărcate sunt expuse la diferite molecule amare și activarea unei hT2R duce la activarea G16gust44, care, la rândul său, duce la mobilizarea calciului în interiorul celulelor. Această creștere a concentrației de calciu modifică proprietățile de fluorescență ale colorantului de calciu în interiorul celulelor. Aceste modificări sunt monitorizate utilizând microscopia de fluorescență.

[0193] Inventatorii au folosit, de asemenea, sistemul automatizat fluorimetric FLIPR folosind un protocol ușor diferit. O linie de celule HEK293 care exprimă stabil G16gust44 a fost transfectată cu o plasmidă de expresie hT2R; după 24 de ore, celulele sunt încărcate și analizate pe FLIPR.

[0194] După ce este identificat un ligand pentru o hT2R particulară, este generată o linie de celule HEK293 care exprimă stabil atât hT2R, cât și G16gust44, facilitând testele de screening viitoare pentru a identifica alți liganzi care activează hT2R particular sau care modulează (blochează sau intensifică) activarea acestui hT2R de către un alt ligand pentru amar, cum ar fi un compus amar conținut în cafea. Acest lucru previne necesitatea transfecției tranzitorii.

[0195] După cum se arată în figuri, astfel de experimente au arătat că hT2R8 și hT2R14 răspund la compușii amari prezenți în cafea și au identificat compușii care inhibă sau blochează gustul amar de cafea. De asemenea, experimentele din figura 5 și Exemplul 3 de mai jos dezvăluie proprietățile antagoniste largi ale compusului C în particular.

[0196] Aceste rezultate indică faptul că celulele care au identificat receptorii de gust hT2R pot fi utilizate în teste pentru a identifica liganzii care modulează gustul amar asociat cu cel puțin una dintre hT2R particulare menționate, precum și testele pentru detectarea compușilor responsabili pentru gustul amar.

[0197] De preferință, aceste analize vor utiliza o celulă de testare care exprimă un ADN care codifică un hT2R având una din secvențele de aminoacizi identificate mai jos. Cu toate acestea, se anticipează că fragmentele, ortologii, variantele sau himerale acestor polipeptide receptoare care își păstrează proprietățile funcționale ale acestor receptori de gust amar, adică răspund la unii compuși amari, vor fi de asemenea utili în aceste teste. Exemplele de astfel de variante includ variante de îmbinare, polimorfisme ale unei singure nucleotide, variante allelice și mutații produse prin mijloace recombinante sau chimice sau apărute în mod natural. Mai jos sunt prezentate mijloacele pentru izolarea și exprimarea T2R care sunt utilizate în testele prezentei invenții și testele care sunt preconizate pentru utilizare în prezenta invenție pentru a identifica compușii care inhibă activarea acestor receptori.

Izolarea și exprimarea T2R

[0198] Izolarea și exprimarea T2R sau a fragmentelor sau variantelor acestora ale invenției se pot efectua prin proceduri de clonare bine stabilite folosind sonde sau primeri construiți pe bază de secvențe de acizi nucleici ai T2R este dezvăluită în cerere. Pot fi identificate, de asemenea, secvențe înrudite cu T2R, din baze de date genomice umane sau de la alte specii, utilizând secvențele dezvăluite aici și tehnologii de căutare cunoscute bazate pe computer, de exemplu, căutarea secvenței BLAST. Într-o formă de realizare particulară, pseudogenes dezvăluite aici pot fi utilizate pentru a identifica alelele funcționale sau genele asociate.

[0199] Vectorii de expresie pot fi apoi folosiți pentru a infecta sau transfecta celulele gazdă pentru exprimarea funcțională a acestor secvențe. Aceste gene și vectori pot fi obținute și exprimate in vitro sau in vivo. Specialistul în domeniu va recunoaște

faptul că fenotipurile dorite pentru alterarea și controlul expresiei acidului nucleic pot fi obținute prin modularea expresiei sau activității genelor și a acizilor nucleici (de exemplu promotorii, potențatorii și altele) în cadrul vectorilor invenției. Oricare dintre metodele cunoscute descrise pentru creșterea sau reducerea expresiei sau activității poate fi utilizată. Invenția poate fi practică în legătură cu orice metodă sau protocol cunoscute în domeniu, care sunt bine descrise în literatura științifică și de brevete.

[0200] În mod alternativ, acești acizi nucleici pot fi sintetizați in vitro prin tehnici de sinteză chimică binecunoscute, așa cum este descris, de exemplu, în 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); Brevetul U. S. 4458066. Fragmente de ADN dublu-înfășurate/stranded pot fi obținute apoi fie prin sintetizarea lanțului complementar și conectarea lanțurilor împreună, în condiții corespunzătoare, fie prin adăugarea lanțului complementar folosind ADN-polimeraza cu o secvență de primer adecvat.

[0201] Tehnici de manipulare a acizilor nucleici, cum ar fi, de exemplu, pentru generarea mutațiilor în secvențe, subclonarea, etichetarea sondelor, secvențiere, hibridare și altele sunt bine descrise în literatura științifică și de brevete. A se vedea, de exemplu, Sambrook, ed., Molecular Cloning: A Laboratory Manual (ed. a 2-a), Vol. 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, Partea I, Theory and Nucleic Acid Preparation, Elsevier, NY (1993).

[0202] Acizii nucleici, vectorii, capsidele, polipeptidele și altele pot fi analizate și cuantificate prin oricare dintre un număr de mijloace generale, binecunoscute specialistului în domeniu. Acestea includ, de exemplu, metodele biochimice de

analiză, cum ar fi RMN, spectrofotometrie, radiografie, electroforeză, electroforeză capilară, cromatografia lichidă de înaltă performanță (HPLC), cromatografie în strat subțire (TLC) și cromatografie de hiperdifuziune, diverse metode imunologice, de exemplu, reacții cu precipitina lichid sau gel, imunodifuzie, immunoelectroforeză, radioimunoanalize (RIA), testele imunosorbent legat de enzimă (ELISA), teste imunofluorescente, analiza Southern, analiza Northern, analiza dot-blot, electroforeză în gel (de exemplu, SDS-PAGE), RT-PCR, PCR cantitativă, altă metodă de amplificare a acid nucleic sau țintei sau semnalului, radioetichetarea, numărarea scintilațiilor și cromatografia de afinitate.

[0203] Primerii oligonucleotidului pot fi folosiți pentru a amplifica acizii nucleici care codifică o regiune ligand-legătură T2R. Acizii nucleici descriși aici pot fi, de asemenea, clonați sau măsurați cantitativ, utilizând tehnici de amplificare. Metodele de amplificare sunt, de asemenea, binecunoscute în domeniu și includ, de exemplu, reacția în lanț a polimerazei (PCR) (ed. Innis, PCR Protocols, a Guide to Methods and Applications, Academic Press, NY (1990); ed. Innis, Strategii PCR, Academic Press, Inc, NY (1995)); reacții ale catenei ligasa (LCR) (Wu, Genomics, 4:560 (1989); Landegren, Science, 241:1077 (1988); Barringer, Gene, 89:117 (1990)); amplificarea transcrierii (Kwoh, PNAS, 86:1173 (1989)); replicarea secvențială auto-susținută (Guatelli, PNAS, 87:1874 (1990)); Q Beta replicase amplification (Smith, J. Clin. Microbiol. , 35:1477-91 (1997)); automated Q-beta replicase amplification assay (Burg, Mol. Cell. Probes, 10:257-71 (1996)); și alte tehnici mediate de ARN polimeraza alte (de exemplu, NASBA, Cangene, Mississauga, Ontario). A se vedea, de asemenea, Berger, Methods Enzymol., 152:307-16 (1987); Sambrook; Ausubel; Brevetul US. No. 4683195 și 4683202; Sooknanan, Biotechnology, 13:563-64 (1995).

[0204] Odată amplificați, acizii nucleici, fie individual, fie ca biblioteci, pot fi clonați în conformitate cu metodele cunoscute în domeniu, dacă se dorește, în oricare dintr-o varietate de vectori utilizând metodele biologiei moleculare de rutină; metodele de clonare in vitro a acizilor nucleici amplificați sunt descrise, de exemplu, în Brevetul US Nr.5426039. Pentru a facilita clonarea secvențelor amplificate, site-urile de enzime cu restricție pot fi "construite în" perechea primer PCR. De

exemplu, site-urile Pst I și Bsp E1 au fost proiectate în perechi de primer din exemplele invenției. Aceste site-uri cu restricție particulare au o secvență care, atunci când este ligată, sunt "in-cadru", cu privire la secvența de codare "donor" receptor 7- membrana în care sunt îmbinate (secvența de codificare a regiunii ligand-legătură este în interiorul polipeptidei 7-membranare, astfel, dacă se dorește ca construcția să fie translatată în avalul unui site de îmbinare a enzimei de restricție, rezultatele din afara cadrului ar trebui să fie evitate; acest lucru poate să nu fie necesar în cazul în care regiunea inserată ligand-legătură cuprinde în mod substanțial cea mai mare parte din regiunea VII transmembranară). Primerii pot fi proiectați să mențină secvența originală a "donor-ului" receptorului 7-membranar. Alternativ, primerii pot codifica reziduurile de aminoacizi care sunt substituții conservative (de exemplu, reziduu hidrofob pentru hidrofob, a se vedea discuția de mai sus) sau substituții benigne funcționale (de exemplu, nu împiedică inserția membranei plasmatică, cauzează clivajul prinpeptidază, cauzează plieri anormale ale receptorului și altele).

[0205] Perechile de primer pot fi proiectate să amplifice selectiv regiunile ligand-legătură ale proteinelor T2R. Aceste regiuni de legare pot varia pentru diferiți liganzi; astfel, ceea ce poate fi o regiune de legare minimă pentru un ligand, poate fi prea limitativă pentru un al doilea ligand potențial. Astfel, regiunile de legare de dimensiuni diferite care cuprind diferite structuri de domenii pot fi amplificate; de exemplu, domeniile transmembranare (TM) II prin VII, III prin VII, III prin VI sau II prin VI sau variații ale acestora (de exemplu, doar o subsecvență a unui domeniu particular, amestecând ordinea domeniilor și altele), a unui T2R 7-transmembranar.

[0206] Deoarece sunt cunoscute secvențe și structuri de domeniu ale multor proteine T2R 7-membranare, specialistul în domeniu poate selecta ușor secvențe care flanchează domenii și secvențe de domenii interne ca secvențe model pentru a proiecta perechile de primer de amplificare degenerați. De exemplu, o secvență de acid nucleic care codifică regiunile domeniului II prin VII poate fi generată prin amplificarea PCR utilizând o pereche de primeri. Pentru a amplifica un acid nucleic care cuprinde secvența domeniului transmembranar I (TM I), poate fi proiectat un primer degenerat de la un acid nucleic care codifică secvența de aminoacid din

familia T2R în consens cu secvența 1 descrisă mai sus. Un astfel de primer degenerat poate fi utilizat pentru a genera o regiune de legare care încorporează TM I prin TM III, TM I prin TM IV, TM I prin TM V, TM I prin TM VI sau TM I prin TM VII). Alți primeri degenerați pot fi proiectați pe baza celorlalte secvențe în consens cu familia T2R prevăzute aici. Un astfel de primer degenerat poate fi utilizat pentru a genera o regiune de legare care încorporează TM III prin TM IV, TM III prin TM V, TM III- prin TM VI sau TM III prin TM VII.

[0207] Paradigmele din proiectarea perechilor de primeri degenerați sunt binecunoscute în domeniu. De exemplu, un program pentru calculator strategic Primer Oligonucleotid Hibrid DEgenerat COnsens (CODEHOP) este accesibil pe <http://blocks.fhcrc.org/codehop.html> și este legat direct la site-ul de aliniere secvențială multiplă BlockMaker pentru predicția primerului hibrid care începe cu un set de secvențe de proteine asociate, cunoscute ca regiuni ligand-legătură ale receptorilor de gust (a se vedea, de exemplu, Rose, Nucleic Acids Res., 26:1628-35 (1998); Singh, Biotechniques, 24:318-19 (1998)).

[0208] Mijloacele de a sintetiza perechi de primeri oligonucleotidici sunt binecunoscute în domeniu. Pot fi folosite perechile de baze "naturale" sau perechile de baze sintetice. De exemplu, utilizarea nucleobazelor artificiale oferă o abordare versatilă de a manipula o secvență de primer și de a genera un amestec mai complex de produși amplificați. Diferitele familii de nucleobaze artificiale sunt capabile să-și asume mai multe orientări ale legăturilor de hidrogen, prin rotirile legăturii interne, pentru a oferi un mijloc pentru recunoașterea moleculară degenerată. Încorporarea acestor analogi într-o singură poziție de primer PCR permite generarea unei biblioteci complexe de produse de amplificare. A se vedea, de exemplu, Hoops, Nucleic Acids Res., 25:4866-71 (1997). Moleculele nepolare pot fi, de asemenea, folosite pentru a imita forma bazelor ADN-ului natural. Un mimic cu formă fără legături de hidrogen pentru adenină poate replica în mod eficient și selectiv față de un mimic sub formă nepolară pentru timină (a se vedea, de exemplu, Morales, Nat. Struct. Biol., 5:950-54 (1998)). De exemplu, două baze degenerate pot fi baza pirimidinică 6H, 8H-3 ,4-dihidropirimido [4,5-c] [1,2] oxazin-7-ona sau baza purinică N6-metoxi-2 ,6-diaminopurina (a se vedea, de exemplu,

Hill, PNAS, 95:4258-63 (1998)). Primerii degenerați din exemple ai invenției încorporează analogiul nucleobasic 5'-Dimetoxitritil-N-benzoil-2'-deoxi-citidină, 3'-[(2-cianoetil) - (N, N-diizopropil)]-fosforamidita (termenul "P" în secvențe, a se vedea mai sus). Acest analog de pirimidină formează legături de hidrogen cu purinele, inclusiv reziduurile A și G.

[0209] Variantele polimorfe, alelele și omologii interspecie care sunt în mod substanțial identice cu un receptor de gust dezvăluit aici pot fi izolate folosind sonde de acid nucleic descrise mai sus. Alternativ, bibliotecile de expresie pot fi folosite pentru a clona polipeptidele T2R și variantele polimorfe, alelele și omologii interspecie ai acestora, prin detectarea omologilor exprimați imunologic cu antiseruri sau anticorpi purificați obținuți față de o polipeptidă T2R, care, de asemenea, recunosc și se leagă selectiv de omologul T2R.

[0210] Acizii nucleici care codifică regiunile ligand-legătură ale receptorilor de gust pot fi generați prin amplificarea (de exemplu, PCR) secvențelor adecvate de acid nucleic folosind perechi de primeri(perfecte sau degenerate) adecvate. Acidul nucleic amplificat poate fi ADN genomic din orice celulă sau țesut sau ARNm sau ADNc derivate din receptor de gust - celule de expresie.

[0211] Într-un formă de realizare pot fi construite secvențele care codifică proteinele hibride cuprinzând acizi nucleici ce codifică T2R fuzionați în secvențe de translocăție. De asemenea, sunt furnizate T2R hibride care cuprind motivele de translocăție și regiunile compus-legătură care provoacă gustul ale altor familii de receptori chemosenzitivi, în special receptorii de gust. Aceste secvențe de acid nucleic pot fi legate operabil de elementele martor ale transcripției sau translației, de exemplu, secvențelor de inițiere, promotori și amelioratori ai transcripției și translației, terminatori, secvențe de poliadenilare pentru transcripție și translație și alte secvențe utile pentru transcrierea ADN în ARN. În construcția casetelor de expresie, vectorilor și transgenicelor recombinante, un fragment promotor poate fi folosit pentru expresia directă a acidului nucleic dorit în toate celulele sau țesuturile dorite.

[0212] Într-o altă formă de realizare, proteinele de fuziune pot include secvențe de translocăție C-terminale sau N-terminale. În plus, proteinele de fuziune pot cuprinde elemente suplimentare, de exemplu, pentru detecția, purificarea sau alte aplicații ale proteinelor. Domeniile care facilitează detecția și purificarea includ, de exemplu, peptide metal chelatoare, cum ar fi căile polihistidinice, modulele histidină- triptofan sau alte domenii care permit purificarea pe metale imobilizate; proteine de legare a maltozei; domeniile proteinei A care permit purificarea pe imunoglobulină imobilizată; sau domeniul utilizat în sistemul de purificare pe bază de extindere/afinitate FLAGS (Immunex Corp, Seattle Washington).

[0213] Includerea secvențelor linker separabile cum ar fi Factorul Xa (a se vedea, de exemplu, Ottavi, Biochimie, 80:289-93 (1998)), motivul de recunoaștere a subtilisin proteazei (a se vedea, de exemplu, Polyak, Protein Eng., 10: 615-19 (1997)); enterokinaza (Invitrogen, San Diego, California) și altele, între domeniul de translocăție (pentru exprimarea eficientă a membranei plasmatică) și restul polipeptidei nou translatate poate fi utilă pentru a facilita purificarea. De exemplu, o construcție poate include o polipeptidă care codifică o secvență de acid nucleic legată de șase reziduuri de histidină, urmată de tioredoxin, un loc de clivare a enterokinazei (a se vedea, de exemplu, Williams, Biochemistry, 34:1787-97 (1995)) și un domeniu de translocăție C-terminal. Reziduurile de histidină facilitează detectarea și purificarea, în timp ce locul de clivare a enterokinazei oferă un mijloc pentru purificarea proteinei/lor dorită(e) de restul proteinei de fuziune. Tehnologia referitoare la vectorii de codificare a proteinelor de fuziune și aplicarea proteinelor de fuziune sunt bine descrise în literatura științifică și de brevete (a se vedea, de exemplu, Kroll, DNA Cell. Biol., 12:441-53 (1993)).

[0214] Vectorii de expresie, fie ca vectori de expresie individuali, fie ca biblioteci de vectori de expresie, care cuprind regiunea ligand-legătură care codifică secvențe pot fi introduși într-un genom sau în citoplasma sau nucleul unei celule și exprimați printr-o varietate de tehnici convenționale, bine descrise în literatura științifică și de brevete. A se vedea, de exemplu, Roberts, Nature, 328:731 (1987); Berger mai sus, Schneider, Protein Exper. Purif., 6435:10 (1995); Sambrook; Tijssen; Ausubel. Informațiile despre produse de la producătorii de reactivi biologici și echipamente

experimentale, furnizează, de asemenea, informații cu privire metodele biologice cunoscute. Vectorii pot fi izolați din surse naturale, obținuți din surse cum ar fi ATCC sau biblioteci GenBank sau preparate prin metode de sinteză sau recombinante.

[0215] Acizii nucleici pot fi exprimați în casete de expresie, vectori sau virusuri care sunt exprimate stabil sau tranzitoriu în celule (de exemplu sisteme de expresie episomale). Markerii de selecție pot fi încorporați în casete de expresie și vectori pentru a conferi un fenotip selectabil pe secvențele și celulele transformate. De exemplu, markerii de selecție pot codifica pentru menținerea și replicarea epizomală astfel încât integrarea în genomul gazdă să nu fie este necesară. De exemplu, markerul poate codifica rezistența la antibiotice (de exemplu, cloramfenicol, canamicină, G418, bleomicină, higromicină) sau rezistența la erbicide (de exemplu, clorosulfuron sau Basta) pentru a permite selecția acestor celule transformate cu secvențe de ADN dorite (a se vedea, de exemplu, Blondelet -Rouault, *Gene*, 190:315-17 (1997); Aubrecht, J. *Pharmacol. Exp. Ther.*, 281:992-97 (1997)). Deoarece genele marker selectabile care conferă rezistență la substraturi cum ar fi neomicină sau higromicină pot fi utilizate numai în cultura de țesuturi, genele de chemorezistență sunt folosite, de asemenea, ca markeri selectabili in vitro și in vivo.

[0216] O secvență de acid nucleic himeric poate codifica o regiune ligand-legătură T2R în oricare polipeptidă 7-transmembranară. Deoarece polipeptidele receptorului 7-transmembranar au secvențe primare similare și structuri secundare și terțiare, domeniile structurale (de exemplu, domeniul extracelular, domeniile TM, domeniul citoplasmatic etc.) pot fi ușor identificate prin analiză secvențială. De exemplu, modelarea prin omologie, analiza Fourier și detecția periodicității helicale pot identifica și caracteriza cele șapte domenii cu o secvență de receptor 7-transmembranar. Algoritmii Transformatei Fourier Rapide (FFT) pot fi utilizați pentru a evalua perioadele dominante care caracterizează profilurile de hidrofobicitate și variabilitate ale secvențelor analizate. Creșterea detecției periodicității și a indicelui de periodicitate alfa helical pot fi făcute, de exemplu, de Donnelly, *Protein Sci.*, 2:55-70 (1993). Alți algoritmi de aliniere și de modelare sunt bine cunoscuți în domeniu (a se vedea, de exemplu, Peitsch, *Receptors Channels*, 4:161-64 (1996); Kyte & Doolittle, *J. Md. Biol.*, 157:105-32 (1982); și Cronet, *Protein Eng.*, 6:59-64 (1993).

[0217] De asemenea, prezenta invenție nu include numai moleculele de acid nucleic și polipeptidele care au secvențele specificate de acid nucleic și aminoacid, dar și fragmente ale acestora, în special fragmente, de exemplu, de 40, 60, 80, 100, 150, 200 sau 250 nucleotide sau mai multe, precum și fragmente polipeptidice, de exemplu, de 10, 20, 30, 50, 70, 100 sau 150 aminoacizi sau mai mulți. Opțional, fragmentele de acid nucleic pot codifica o polipeptidă antigenică ce este capabilă să se lege la un anticorp crescut față de un membru al familiei T2R. În plus, un fragment de proteină a invenției poate fi, opțional, un fragment antigenic care este capabil să se lege la un anticorp dezvoltat față de un membru al familiei T2R.

[0218] Sunt avute în vedere, de asemenea, proteinele himerice care conțin cel puțin 10, 20, 30, 50, 70, 100 sau 150 aminoacizi sau mai mulți, a uneia sau cel puțin a uneia dintre polipeptidele T2R descrise aici, cuplate la aminoacizi suplimentari reprezentând tot sau o parte dintr-un alt GPCR, de preferință un membru al superfamiliei 7-transmembranare. Aceste himere pot fi făcute din receptori instant și alt GPCR sau pot fi făcute prin combinarea a doi sau mai mulți dintre prezenții receptori. Într-un formă de realizare, o porțiune de himeră corespunde la sau este derivată din domeniul transmembranar al unei polipeptide T2R a invenției. Într-o altă formă de realizare, o porțiune de himeră corespunde la sau este derivată din una sau mai multe regiuni transmembranare ale unei polipeptide T2R descrise aici și porțiunea sau porțiunile rămase pot proveni de la alt GPCR. Receptorii himerici sunt binecunoscuți în domeniu, iar tehnicile de creare a acestora și selecția și limitele domeniilor sau fragmentelor de Proteină G - Receptori Cuplați pentru încorporarea în acestea sunt, de asemenea, binecunoscute. Astfel, aceste cunoștințe ale specialistului în domeniu pot fi ușor folosite pentru a crea astfel de receptori himerici. Utilizarea unor astfel de receptori himerici poate oferi, de exemplu, o caracteristică de selectivitate a gustului a unuia dintre receptori dezvăluiți aici în mod specific, cuplată cu caracteristicile de transducție a semnalului unui alt receptor, cum ar fi un receptor binecunoscut utilizat în sistemele de analiză din stadiul tehnicii.

[0219] De exemplu, o regiune cum ar fi o regiune ligand-legătură, un domeniu extracelular, un domeniu transmembranar, un domeniu transmembranar, un domeniu

citoplasmatic, un domeniu N-terminal, un domeniu C-terminal sau orice combinație a acestora, pot fi legate covalent la o proteină heterologă. De exemplu, o regiune transmembranară T2R poate fi legată la un domeniu transmembranar GPCR heterolog sau un domeniu extracelular GPCR heterolog poate fi legat la o regiune transmembranară T2R. Alte proteine heterologe la alegere pot include, de exemplu, proteina verde fluorescentă, polipeptidele beta-galactosidaza, receptorul glutamat și polipeptidele rodopsinei, de exemplu, fragmente N-terminale ale rodopsinei, de exemplu, rodopsina de bovină.

[0220] Tot în domeniul de aplicare al invenției este și utilizarea diferitelor celule gazdă pentru exprimarea T2R, fragmentelor sau variantelor invenției. Pentru a obține niveluri ridicate de exprimare a unui acid nucleic sau a unei gene clonate, cum ar fi ADNc care codifică T2R, fragmente sau variante ale invenției, specialistul subclonează de obicei secvența de acid nucleic de interes într-un vector de expresie care conține un promotor puternic pentru a direcționa transcrierea, un terminator transcripție/translație și, dacă e cazul, pentru un acid nucleic care codifică o proteină, un site de legare a ribozomilor pentru inițierea translației. Promotorii bacterieni adecvați sunt bine cunoscuți în domeniu și sunt descriși, de exemplu, în Sambrook și colab. De preferință, sistemele de expresie eucariote sunt folosite pentru a exprima receptorul hT2R în discuție.

[0221] Oricare dintre procedurile binecunoscute pentru introducerea secvențelor de nucleotide străine în celulele gazdă pot fi utilizate. Acestea includ utilizarea transfecției cu fosfat de calciu, fuziunea protoplaștilor, polibrenului, electrotransfecția, lipozomi, microinjectare, vectori plasmatici, vectori virali și oricare dintre celelalte metode binecunoscute pentru introducerea ADN genomic clonat, ADNc, ADN sintetic sau alte materiale genetice străine într-o celulă gazdă (a se vedea, de exemplu, Sambrook și colab.) Este necesar doar ca procedura de inginerie genetică particulară utilizată să fie capabilă să introducă cu succes cel puțin o moleculă de acid nucleic în celula gazdă capabilă să exprime T2R, fragmentul sau varianta de interes.

[0222] După ce vectorul de expresie este introdus în celule, celulele transfectate sunt cultivate în condiții care favorizează expresia receptorului, fragmentului sau a

variantei de interes, care este apoi recuperat din cultură folosind tehnici standard. Exemplele de astfel de tehnici sunt binecunoscute în domeniu. A se vedea, de exemplu, WO 00/06593, care este încorporată prin referință într-o manieră consecventă cu această dezvăluire.

Teste pentru detectarea compușilor care modulează activitatea unui hT2R conform invenției

[0223] Sunt descrise mai jos metodele și compozițiile pentru a determina dacă un compus de testat se leagă în mod specific la o polipeptidă T2R a invenției, atât in vitro cât și in vivo. Pot fi monitorizate multe aspecte ale fiziologiei celulare pentru a evalua efectul ligand-legătură la T2R himerici sau naturali. Aceste teste pot fi efectuate pe celule intacte care exprimă o polipeptidă T2R, pe celule permeabilizate sau pe fracțiuni de membrană produse prin metode standard.

[0224] Receptorii de gust se leagă la compușii care provoacă gustul și inițiază transducția stimulilor chimici în semnale electrice. La rândul său, o proteină G inhibată sau activată va altera proprietățile enzimelor, canalelor și a altor proteine efectoare țintă. Câteva exemple sunt activarea fosfodiesterazei cGMP de către transducin în sistemul vizual, adenilat ciclazei de către proteina G stimulatorie, fosfolipazei C de către GQ și a altor proteine G înrudite și modularea diverselor canale de către Gi și alte proteine G. Pot fi examinate, de asemenea, consecințele dintr-un stadiu ulterior, cum ar fi generarea diacil glicerolului și IP3 de către fosfolipaza C și, la rândul lor, pentru mobilizarea calciului de către IP3.

[0225] Proteinele hT2R sau polipeptidele respective ale testului vor fi selectate de obicei dintre o polipeptidă având o secvență conținută în lista de secvențe precedente revendicărilor de aici sau fragmente sau variante modificate conservativ ale acestora.

[0226] În mod alternativ, proteinele T2R sau polipeptidele testului pot fi derivate dintr-o celulă gazdă eucariotă și poate include o secvență de aminoacid având un anumit procent de identitate a secvenței de aminoacid cu aceste polipeptide hT2R sau

variante modificate conservativ ale acestora. În general, identitatea secvenței de aminoacid va fi de cel puțin 30%, de preferință 30-40%, mai specific 50-60, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98% sau 99%. În mod opțional, proteinele T2R sau polipeptidele testului pot cuprinde o regiune a unei polipeptide T2R, cum ar fi un domeniu extracelular, o regiune transmembranară, un domeniu citoplasmatic, un domeniu ligand-legătură și altele. În mod opțional, după cum este exemplificat aici, polipeptida T2R sau o parte a acesteia poate fi legată covalent la o proteină heterologă pentru a crea o proteină himerică utilizată în analizele descrise aici.

[0227] Modulatorii activității T2R pot fi testați utilizând proteinele T2R sau polipeptidele după cum este descris mai sus, fie recombinante, fie apărute în mod natural. Proteinele T2R sau polipeptidele pot fi izolate, exprimate într-o celulă, exprimate într-o membrană derivată dintr-o celulă, exprimate în țesut sau într-un animal, fie recombinant, fie natural. De exemplu, pot fi utilizate felii de limbă, celule disociate dintr-o limbă, celule transformate sau membrane. Modularea poate fi testată utilizând una dintre analizele in vitro sau in vivo descrise aici.

Detecția modulatorilor

[0228] Sunt descrise mai jos compozițiile și metodele pentru a stabili dacă un compus de testat se leagă în mod specific de un receptor T2R al invenției, atât in vitro, cât și in vivo. Multe aspecte ale fiziologiei celulare pot fi monitorizate pentru a evalua efectul ligandului care se leagă de o polipeptidă T2R a invenției. Aceste analize pot fi efectuate asupra celulelor intacte care exprimă un receptor chemosenzitiv, asupra celulelor permeabilizate sau asupra fracțiunilor de membrană produse prin metode standard sau in vitro, utilizând proteine sintetizate de la început.

[0229] In vivo, receptorii de gust se leagă la compușii modulatori de gust și inițiază transducția stimulilor chimici în semnale electrice. La rândul său, o proteină G inhibată sau activată va altera proprietățile enzimelor, canalelor și a altor proteine efectoare țintă. Câteva exemple sunt activarea fosfodiesterazei cGMP de către transducin în sistemul vizual, adenilat ciclazei de către proteina G stimuloare, fosfolipazei C de către GQ și a altor proteine G înrudite și modularea diverselor

canale de către Gi și alte proteine G. Pot fi examinate, de asemenea, consecințele dintr-un stadiu ulterior, cum ar fi generarea diacil glicerolului și IP3 de către fosfolipaza C și, la rândul lor, pentru mobilizarea calciului de către IP3.

[0230] În mod alternativ, proteinele T2R sau polipeptidele testului pot fi derivate dintr-o celulă gazdă eucariotă și pot include o secvență de aminoacid având identitatea secvenței de aminoacid cu polipeptidele hT2R dezvoltate aici, sau fragmentele sau variantele modificate conservativ ale acestora. În general, identitatea secvenței de aminoacid va fi de cel puțin 35 la 50% sau opțional 75%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98% sau 99%. În mod opțional, proteinele T2R sau polipeptidele testului pot cuprinde un domeniu al unei proteine T2R, cum ar fi un domeniu extracelular, o regiune transmembranară, o regiune transmembranară, un domeniu citoplasmatic, un domeniu ligand-legătură și altele. În plus, după cum este descris mai sus, proteina T2R sau un domeniu al acesteia poate fi legată covalent la o proteină heterologă pentru a crea o proteină himerică utilizată în analizele descrise aici.

[0231] Modulatorii activității receptorilor T2R sunt testați utilizând proteinele T2R sau polipeptidele după cum este descris mai sus, fie recombinante, fie apărute în mod natural. Proteinele T2R sau polipeptidele pot fi izolate, exprimate într-o celulă, exprimate într-o membrană derivată dintr-o celulă, exprimate în țesut sau într-un animal, fie recombinant, fie natural. De exemplu, pot fi utilizate felii de limbă, celule disociate dintr-o limbă, celule transformate sau membrane. Modularea poate fi testată utilizând una dintre analizele in vitro sau in vivo descrise aici.

Teste de legare In vitro

[0232] In vitro se poate examina de asemenea transmiterea gustului prin reacții în stare solubilă sau solidă, utilizând polipeptidele T2R din invenție. Într-o variantă particulară, domeniile de legare a ligandului T2R se pot utiliza în reacții in vitro în stare solubilă sau solidă pentru a determina legarea ligandului.

[0233] Este posibil ca domeniul de legare a ligandului să fie format de domeniul N-terminal împreună cu porțiuni suplimentare ale domeniului extracelular, cum ar fi buclele extracelulare ale domeniului transmembrană.

[0234] Determinările de legare in vitro au fost utilizate cu alți GPCR, cum ar fi receptorii metabotropici de glutamat (vezi, de exemplu, Han și Hampson, J. Biol. Chem. 274:10008-10013 (1999)). Aceste determinări ar putea implica dizlocuirea unui ligand marcat radioactiv sau fluorescent, măsurând schimbările de fluorescență intrinsecă sau schimbările de susceptibilitate proteolitică, etc.

[0235] Legarea ligandului la o polipeptidă a T2R conform invenției se poate testa în soluție, într-o membrană cu două straturi, atașată opțional la o fază solidă, într-un monostrat lipidic sau în vezicule. Legarea unui modulator poate fi testată utilizând, de exemplu, schimbări ale caracteristicilor spectroscopice (de exemplu, fluorescență, absorbantă, index de refracție), hidrodinamice (de exemplu, formă), cromatografice, sau a proprietăților de solubilitate.

[0236] Într-o variantă preferată a invenției, este utilizată o determinare de legare a $[^{35}\text{S}]\text{GTP}\gamma\text{S}$. Așa cum a fost descris mai sus, după activarea unui GPCR, subunitatea $G\alpha$ a complexului proteinei G este stimulată să schimbe legarea la GDP cu GTP. Stimularea mediată de ligand de schimbare a activității se poate măsura printr-o determinare biochimică măsurând legarea $[^{35}\text{S}]\text{GTP}\gamma\text{S}$ marcat radioactiv la proteina G în prezența unui presupus ligand. În mod obișnuit, membrane conținând receptor chemosenzitiv de interes sunt amestecate cu o proteină G. La determinare sunt adăugați inhibitori și/sau activatori potențiali și $[^{35}\text{S}]\text{GTP}\gamma\text{S}$ și este măsurată legarea $[^{35}\text{S}]\text{GTP}\gamma\text{S}$ la proteina G. Legarea poate fi măsurată prin contorizarea cu lichid de scintilație sau prin orice alt mijloc cunoscut în domeniu, incluzând determinări de scintilație de proximitate (SPA). În alte formate de determinări, se poate utiliza $\text{GTP}\gamma\text{S}$ marcat fluorescent.

Determinări de polarizare a fluorescenței

[0237] Într-o altă variantă, se pot utiliza determinări bazate pe polarizarea fluorescenței ("FP") pentru a detecta și monitoriza legarea ligandului. Polarizarea fluorescenței este o tehnică versatilă de laborator pentru măsurarea legării de echilibru, hibridizarea acidului nucleic și activitatea enzimatică. Determinările de polarizarea a fluorescenței sunt omogene prin aceea că nu necesită o etapă de separare cum ar fi centrifugare, filtrare, cromatografie, precipitare sau electroforeză. Aceste determinări sunt făcute în timp real, direct în soluție și nu necesită o fază imobilizată. Valorile de polarizare pot fi măsurate în mod repetat și după adăugarea de reactivi deoarece măsurarea polarizării este rapidă și nu distruge proba. În general, această tehnică se poate utiliza pentru a măsura valorile de polarizare ale fluoroforilor la niveluri joase de la picomolare până la micromolare. Această secțiune descrie cum poate fi utilizată polarizarea fluorescenței într-un mod simplu și cantitativ pentru a măsura legarea liganzilor la polipeptidele T2R din invenție.

[0238] Atunci când o moleculă marcată fluorescent este excitată cu lumină polarizată plan, ea emite lumină care are un grad de polarizare care este invers proporțional cu rotația sa moleculară. Moleculele mari marcate fluorescent rămân relativ staționare în timpul stării excitate (4 nanosecunde în cazul fluoresceinei) și polarizarea luminii rămâne relativ constantă între excitație și emisie. Moleculele mici marcate fluorescent se rotesc rapid în timpul stării excitate și polarizarea se schimbă semnificativ între excitație și emisie. Prin urmare, moleculele mici au valori mici de polarizare și moleculele mari au valori mari de polarizare. De exemplu, o oligonucleotidă monocatenară marcată cu fluoresceină are o valoare relativ mică de polarizare, dar atunci când este hibridizată la catenă complementară, are o valoare relativ mai mare de polarizare. Atunci când FP se utilizează pentru a detecta și monitoriza legarea compusului care provoacă gustul care poate activa sau inhiba receptorii chemosenzoriali din invenție, pot fi utilizați compuși care provoacă gustul marcați cu fluorescență sau compuși auto-fluorescenți care provoacă gustul.

[0239] Polarizarea fluorescenței (P) este definită ca:

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

[0240] Unde Int_{par} este intensitatea emisiei de lumină paralelă cu planul luminii excitate și Int_{perp} este intensitatea emisiei de lumină perpendiculară pe planul luminii excitate. P, fiind un raport al intensităților luminii, este un număr fără dimensiune. De exemplu, Sistemul Beacon™ și Beacon 2000™. Poate fi utilizat legat de aceste determinări. Astfel de sisteme exprimă în mod obișnuit polarizarea în unități de milipolarizare (1 Unitate de Polarizare=1000 mP Unități).

[0241] Relația dintre rotația moleculară și dimensiune este descrisă de ecuația Perrin și cititorul este trimis la Jolley, M. E. (1991) în Journal of Analytical Toxicology, pp. 236-240 încorporat prin referință, care dă o explicație minuțioasă a acestei ecuații. Pe scurt, ecuația Perrin afirmă că polarizarea este direct proporțională cu timpul rotațional de relaxare, timpul de care are nevoie o moleculă pentru a se roti cu un unghi de aproximativ 68,5°. Timpul de relaxare rotațională este legat de viscozitate (eta.), temperatură absolută (T), volum molecular (V) și constanta de gaz constant (R) prin următoare ecuație: $2(\text{Timpul de Relaxare Rotațională}) = 3 V RT$.

[0242] Timpul de relaxare rotațională este mic (~ nanosecunde) pentru molecule mici (de exemplu fluoresceină) și mare (~100 nanosecunde) pentru molecule mari (de exemplu imunoglobuline). Dacă viscozitatea și temperatura sunt menținute constante, timpul de relaxare rotațională și prin urmare, polarizarea, este legată direct de volumul molecular. Schimbările de volum molecular pot fi cauzate de interacții cu alte molecule, disociere, polimerizare, degradare, hibridizare sau schimbări de conformație ale moleculei marcate fluorescent. De exemplu, polarizarea fluorescenței a fost utilizată pentru a măsura scindarea enzimatică a polimerilor mari, marcați cu fluoresceină, de către proteaze, DNaze, și RNaze. Aceasta s-a utilizat de asemenea pentru a măsura legarea la echilibru pentru interacții proteină/proteină, legarea anticorp/antigen, și legarea proteină/ADN.

Determinări în stare solidă și solubilă cu randament mare

[0243] În altă variantă, invenția oferă determinări solubile utilizând o polipeptidă T2R; sau o celulă sau țesut exprimând o polipeptidă T2R. Într-o altă variantă, invenția oferă determinări in vitro bazate pe fază solidă într-un format cu randament mare, în care polipeptida T2R, sau celula sau țesutul exprimând polipeptida T2R este atașată la un substrat în fază solidă sau un compus de stimulare a gustului și este pusă în contact cu un receptor T2R, și este detectată legarea utilizând o moleculă de marcare adecvată sau un anticorp dezvoltat contra receptorului T2R.

[0244] În determinările cu randament mare din invenție, este posibil să se testeze până la câteva mii de modulatori sau liganzi diferiți într-o singură zi. În particular, fiecare godeu al unei plăci de microtitrare se poate utiliza pentru a conduce o determinare separată contra unui potențial modulator selectat, sau, dacă urmează a fi observate efectele concentrației sau a timpului de incubare, în fiecare 5-10 godeuri se poate testa un singur modulator. Astfel, o singură placă standard de microtitrare poate determina circa 100 (de exemplu, 96) modulatori. Dacă sunt utilizate plăci cu 1536 de godeuri, atunci o singură placă poate determina cu ușurință de la circa 1000 până la circa 1500 compuși diferiți. De asemenea este posibil să se determine compuși multipli în fiecare godeu al plăcii. Este posibil să se determine mai multe plăci pe zi; determinări care testează până la circa 6.000-20.000 de compuși diferiți sunt posibile utilizând sistemele integrate din invenție. Mai recent, au fost dezvoltate abordări de microfluide pentru manipularea de reactiv.

[0245] Molecula de interes poate fi legată la componenta în stare solidă, direct sau indirect, prin legătură covalentă sau necovalentă, de exemplu, cu o moleculă de marcare. Molecula de marcare (marcator) poate fi oricare dintr-o diversitate de componente. În general, o moleculă care se leagă la marcator (un liant de marcator) este fixată la un suport solid, iar molecula de interes marcată (de exemplu, molecula de interes de transmitere a gustului) este atașată la suportul solid prin interacțiunea moleculei de marcare și a liantului de marcator.

[0246] Se poate utiliza un număr de molecule de marcare și lianți de marcator, bazat pe interacțiunile moleculare cunoscute, descrise bine în literatură. De exemplu, acolo

unde o moleculă de marcare are un liant natural, de exemplu, biotină, proteină A, sau proteină G, poate fi utilizată împreună cu lianți de marcator adecvați (avidină, streptavidină, neutravidină, regiunea Fc a unei imunoglobuline, etc.). Anticorpilor pentru molecule cu lianți naturali cum ar fi biotină sunt de asemenea disponibili pe scară largă și sunt lianți de marcator adecvați (vezi, SIGMA Immunochemicals 1998 catalog SIGMA, St. Louis Mo.).

[0247] În mod similar, se poate utiliza orice compus haptenic sau antigenic în combinație cu un anticorp adecvat pentru a forma o pereche moleculă marcatoare/liant de marcator. Mii de anticorpi specifici sunt disponibili comercial și mulți anticorpi suplimentari sunt descriși în literatură. De exemplu, într-o configurație obișnuită, molecula marcatoare este un prim anticorp și liantul de marcator este un al doilea anticorp care recunoaște primul anticorp. În afară de interacții anticorp-antigen, ca perechi moleculă marcatoare-liant sunt de asemenea adecvate interacții receptor-ligand. De exemplu, agoniști și antagoniști de receptori din membrană celulară (de exemplu, interacții receptor celulă-ligand, cum ar fi transferină, trusă-c, liganzi de receptori virali, receptori de citokină, receptori de chemokină, receptori de interleukină, receptori și anticorpi de imunoglobulină, familia cadheriei, familia integrinei, familia selectinei, și alții asemenea; vezi, de exemplu, Pigott & Power, The Adhesion Molecule Facts Book I (1993)). În mod similar, toxine și venomi, epitopi virali, hormoni (de exemplu, opiacee, steroizi, etc.), receptori intracelulari (de exemplu, care mediază efectele a diverși liganzi mici, incluzând steroizi, hormon tiroidian, retinoizi și vitamină D; peptide), medicamente, lectine, zaharuri, acizi nucleici (cu configurații de polimer atât lineară cât și ciclică), oligozaharide, proteine, fosfolipide și anticorpi pot toți interacționa cu diverși receptori celulari.

[0248] Polimerii sintetici, cum ar fi poliuretani, poliesteri, policarbonați, poliuree, poliamide, polietilenimine, sulfuri de poliarilen, polisiloxani, poliimide, și poliacetați pot forma de asemenea o moleculă de marcare sau un liant de marcator adecvați. Multe alte perechi moleculă de marcare/liant de marcator sunt de asemenea utile pentru a determina sisteme descrise în cele de față, după cum va fi evident unui specialist în domeniu având în vedere această descriere.

[0249] Lianți uzuali cum ar fi peptide, polieteri, și alții asemenea pot servi de asemenea ca molecule de marcare, și includ secvențe de polipeptide, cum ar fi secvențe poligly cu între circa 5 și 200 aminoacizi. Astfel de legături flexibile sunt cunoscute persoanelor specializate în domeniu. De exemplu, lianți poli(etilenglicol) sunt disponibili de la Shearwater Polymers, Inc. Huntsville, Ala. Acești lianți au opțional legături amidice, legături sulfhidril sau legături heterofuncționale.

[0250] Lianții de marcator sunt fixați la substraturi solide utilizând oricare dintre diversele metode disponibile la ora actuală. Substraturile solide sunt derivatizate sau funcționalizate în mod obișnuit prin expunerea întregului substrat sau a unei porțiuni la un reactiv chimic care fixează o grupare chimică pe suprafața care este reactivă cu o porțiune a liantului de marcator. De exemplu, grupe care sunt potrivite pentru atașare la o porțiune de catenă mai lungă ar include grupări de amină, hidroxil, tiol, și carboxil. Aminoalchilsilani și hidroxialchilsilani se pot utiliza pentru a funcționaliza o diversitate de suprafețe, cum ar fi suprafețe de sticlă. Construirea unor astfel de game de biopolimeri în fază solidă este bine descrisă în literatură. Vezi, de exemplu, Merrifield, J. Am. Chem. Soc., 85:2149-2154 (1963) (descriind sinteza în fază solidă a, de exemplu, peptidelor); Geysen și col., J. Immun. Meth., 102:259-274 (1987) (descriind sinteza în fază solidă a componentelor pe ace); Frank & Doring, Tetrahedron, 44:60316040 (1988) (descriind sinteza a diverse secvențe de peptide pe discuri de celuloză); Fodor și col., Science, 251:767-777 (1991); Sheldon et al., Clinical Chemistry, 39(4):718-719 (1993); și Kozal și col., Nature Medicine, 2(7):753759 (1996) (toate descriind game de biopolimeri fixați la substraturi solide). Abordări nechimice pentru fixarea lianților de marcatori pe substraturi includ alte metode uzuale, cum ar fi căldură, reticulare cu radiație UV și altele asemenea.

Determinări pe bază celulară

[0251] Într-o variantă preferată, o proteină T2R este exprimată într-o celulă eucariotă ca receptori, fie în forme nemodificate, fie ca himerici, variante sau trunchiați cu sau preferabil fără o secvență heterologă însoțitoare care facilitează maturarea sa și țintirea pe cale secretorie. Astfel de polipeptide T2R pot fi exprimate în orice celulă eucariotă, cum ar fi celule HEK-293. Preferabil, celulele cuprind o proteină G

funcțională, de exemplu, G. α 15, sau o G. α 16 himerică, gustducin sau transducin sau o proteină G himerică cum ar fi G16gust44 care este capabilă să cupleze receptorul himeric la o cale de semnalare intracelulară sau la o proteină de semnalate cum ar fi fosfolipaza C. Activarea receptorilor T2R în astfel de celule poate fi detectată utilizând orice metodă standard, cum ar fi prin detectarea schimbărilor calciului intracelular prin detectarea FURA-2 dependent de fluorescență în celulă. O astfel de determinare este baza descoperirilor experimentale prezentate în această cerere.

[0252] Receptorii GPCR activați sunt adesea substraturi pentru kinaze care fosforilează capătul C-terminal al receptorului (și posibil de asemenea, alte situri). Astfel, activatorii vor promova transferul de ^{32}P de la ATP radiomarcant la receptor, care poate fi determinat cu un contor de scintilație. Fosforilarea la capătul C-terminal va promova legarea proteinelor de tipul arestinului și va interfera cu legarea proteinelor G. Pentru o trecere generală în vedere a transmiterii semnalului GPCR și a metodelor pentru determinarea transmiterii de semnal, vezi, de exemplu, *Methods in Enzymology*, volumele. 237 și 238 (1994) și volumul 96 (1983); Bourne și col., *Nature*, 10:349:117-27 (1991); Bourne și col., *Nature*, 348:125-32 (1990); Pitcher și col., *Annu. Rev. Biochem.*, 67:653-92 (1998).

[0253] Modularea T2R poate fi determinată comparând răspunsul polipeptidei T2R tratată cu un presupus modulator de T2R la răspunsul probei unui control netratat sau al unei probe conținând un control "pozitiv" cunoscut. Astfel de presupuși modulatori de T2R pot include molecule care fie inhibă, fie activează activitatea polipeptidei T2R. Într-o variantă, probe martor tratate cu un compus care activează T2R sunt desemnate la o valoare relativă a activității T2R de 100. Inhibarea unei polipeptide T2R este obținută atunci când valoarea activității T2R față de proba martor este de circa 90%, opțional 50%, opțional 25-0%. Activarea unei polipeptide T2R este obținută atunci când valoarea relativă a activității față de control este 110%, opțional 150%, 200-500%, sau 1000-2000%.

[0254] Schimbările din fluxul de ioni pot fi stabilite prin determinarea schimbărilor în polarizarea ionică (adică, potențial electric) a celulei sau membranei care exprimă o polipeptidă T2R. Un mijloc pentru a determina schimbările de polarizare celulare este

acela de a măsura schimbările de curent (prin aceasta măsurând schimbările de polarizare) cu tehnici de pensă de voltaj și pensă plasture (vezi, de exemplu, modul "celulă-atașată", modul "înăuntru-afară", și modul "întreaga celulă", de exemplu, Ackerman și col., New Engl. J Med., 336:1575-1595 (1997)). Curenții întregii celule sunt determinați în mod convenabil utilizând standardul. Alte determinări cunoscute includ: determinări cu flux de ioni radiomarcați și determinări de fluorescență utilizând coloranți sensibili la voltaj (vezi, de exemplu, Vestergarrd-Bogind și col., J. Membrane Biol., 88:67-75 (1988); Gonzales & Tsien, Chem. Biol., 4:269-277 (1997); Daniel și co., J. Pharmacol. Meth., 25:185-193 (1991); Holevinsky și col., J. Membrane Biology, 137:59-70 (1994)).

[0255] Efectele compușilor testați asupra funcționării polipeptidei se pot măsura examinând oricare dintre parametrii descriși mai sus. Orice schimbare fiziologică potrivită care afectează activitatea GPCR poate fi utilizată pentru a stabili influența unui compus testat asupra polipeptidei din această invenție. Când sunt determinate consecințele funcționale utilizând celule sau animale intacte, poate fi măsurată de asemenea o diversitate de efecte cum ar fi eliberarea transmițătorului, eliberarea hormonului, schimbările transcripționale pentru marcheri genetici, atât cunoscuți cât și necaracterizați (de exemplu, spoturi northern), schimbări în metabolismul celular, cum ar fi dezvoltarea celulară sau schimbări de pH și schimbări ale mesagerilor intracelulari secundari cum ar fi Ca^{2+} , IP3, cGMP, sau cAMP.

[0256] Determinările preferate pentru GPCR includ celule care sunt încărcate cu coloranți sensibili la ioni sau voltaj pentru a raporta activitatea receptorului. Determinări pentru stabilirea activității unor astfel de receptori pot utiliza de asemenea agoniști și antagoniști cunoscuți pentru alți receptori cuplați la proteina G ca martori pentru a stabili activitatea compușilor testați. În determinări pentru identificarea compușilor modulatori (de exemplu, agoniști, antagoniști), schimbări ale nivelului ionilor în voltajul citoplasmei sau membranei vor fi monitorizate utilizând un indicator fluorescent sensibil la ion sau la voltajul membranei, respectiv. Printre indicatorii sensibili la ioni și probe de voltaj care se pot folosi sunt cei descriși în Molecular Probes 1997 Catalog. Pentru receptorii cuplați la proteina G, la determinarea de selectare se pot utiliza proteine G eterogene cum ar fi $G\alpha_{15}$ și

G α 16 (Wilkie și col., Proc. Nat'l Acad. Sci., 88:10049-10053 (1991)). Alternativ, se pot utiliza alte proteine G cum ar fi gustducin, transducin și proteine G himerice cum ar fi G α 16gust44 sau Galpha16t25.

[0257] Activarea receptorului inițiază evenimente celulare ulterioare, de exemplu, creșteri ale mesagerilor secundari. Activarea unor receptori cuplați la proteina G stimulează formarea de inozitol trifosfat (IP3) prin hidroliza mediată de fosfolipaza C a fosfatidilinozitolului (Berridge & Irvine, Nature, 312:315-21 (1984)). La rândul său IP3 stimulează eliberarea rezervei de ioni de calciu intracelular. Astfel, o schimbare a nivelurilor de ioni de calciu citoplasmatic sau o schimbare a nivelurilor de mesager secundar cum ar fi IP3 se poate utiliza pentru a determina funcția receptorului cuplat la proteina G. Celulele care exprimă astfel de receptori cuplați la proteina G pot prezenta o creștere a nivelurilor de ioni de calciu citoplasmatic ca rezultat al contribuției, atât a eliberării de calciu din rezervele intracelulare, cât și a pătrunderii de calciu extracelular prin canalele de ioni din membrana plasmatică.

[0258] Într-o variantă preferată, activitatea polipeptidei T2R este măsurată prin exprimarea genei T2R într-o celulă heterologă cu o proteină G eterogenă care leagă receptorul la o cale de transmitere a semnalului fosfolipazei C (vezi Offermanns & Simon, J. Biol. Chem., 270:15175-15180 (1995)). Preferabil, linia de celule este HEK-293 (care nu exprimă în mod normal gene T2R) și proteina G este G α 15 (Offermanns & Simon, supra) sau o proteină G himerică cum ar fi G α 16gust44. Modularea de transmitere a gustului este determinată prin măsurarea schimbărilor nivelurilor de Ca²⁺ intracelular, care se schimbă ca răspuns la modularea căii de transmitere a semnalului T2R prin administrarea unei molecule care se asociază cu polipeptida T2R. Schimbări ale nivelurilor de Ca²⁺ sunt măsurate utilizând opțional coloranți fluorescenți indicatori de Ca²⁺ și imagistică fluorimetrică.

[0259] Într-o altă variantă, hidroliza fosfatidilinozitolului (PI) poate fi analizată conform brevet U.S. nr. 5.436.128, încorporat aici prin referință. Pe scurt, determinarea implică marcarea celulelor cu 3H-mioinozitol timp de 48 sau mai multe ore. Celulele marcate sunt tratate cu un compus de test timp de o oră. Celulele tratate sunt lizate

și sunt extrase în cloroform-metanol-apă, după care inozitol fosfații au fost separați prin cromatografie de schimb ionic și au fost determinați cantitativ cu contoare de scintilație. Stimularea depierii este determinată calculând raportul dintre cpm în prezență de agonist, față de cpm în prezență de tampon martor. În mod asemănător, inhibarea plierii este determinată calculând raportul dintre cpm în prezență de antagonist, față de cpm în prezență de tampon martor (care poate să conțină sau nu un agonist).

[0260] Alte determinări de receptor pot implica determinarea nivelului de nucleotide ciclice intracelulare, de exemplu, cAMP sau cGMP. În cazurile în care activarea receptorului conduce la o descreștere a nivelului de nucleotide ciclice, poate fi preferabil ca celulele să fie expuse la agenți care măresc nivelurile de nucleotide ciclice intracelulare, de exemplu, forskolin, înainte de adăugarea în determinare, la celule, a unui compus de activare a receptorului. Într-o variantă, schimbările de cAMP sau cGMP intracelular se pot măsura utilizând imunodeterminări. Metoda descrisă în Offermanns & Simon, J. Bio. Chem., 270:15175-15180 (1995), poate fi utilizată pentru a determina nivelul de cAMP. De asemenea, pentru a determina nivelul de cAMP se poate utiliza metoda descrisă în Felley-Bosco și col., Am. J. Resp. Cell și Mol. Biol., 11:159-164 (1994). Mai mult, o trusă de determinare pentru măsurarea cAMP și/sau cGMP este descrisă în brevetul U.S. nr. 4.115.538, incorporat aici prin referință.

[0261] Într-o altă variantă, pot fi măsurate nivelurile de transcriere pentru a stabili efectele unui compus testat asupra transmiterii semnalului. O celulă gazdă conținând polipeptida T2R de interes este pusă în contact cu un compus testat pentru un timp suficient pentru a efectua orice interacțiuni, și apoi este măsurat nivelul de exprimare a genei. Durata necesară pentru a efectua astfel de interacțiuni poate fi determinată empiric, de exemplu lăsând o perioadă de timp și măsurând nivelul de transcriere ca funcție de timp. Cantitatea de transcriere poate fi măsurată utilizând orice metodă cunoscută de cei specializați în domeniu ca fiind potrivită. De exemplu, expresia mRNA a proteinei de interes poate fi detectată utilizând spotări northern sau produșii săi polipeptidici se pot identifica utilizând imunodeterminări. Alternativ, se pot utiliza determinări bazate pe transcriere utilizând o genă raportor, așa cum este descris în

brevetul U.S. nr. 5.436.128, încorporat aici prin referință. Genele raportor pot fi, de exemplu, cloramfenicol acetiltransferază, luciferază, beta-galactozidază, beta-lactamază și alcalinfosfatază. Mai mult, proteina de interes poate fi utilizată ca raportor indirect prin atașare la un al doilea raportor cum ar fi proteină verde fluorescentă (vezi, de exemplu, Mistili & Spector, Nature Biotechnology, 15:961-964 (1997)).

[0262] Cantitatea de transcriere este apoi comparată cu cantitatea de transcriere în aceeași celulă în absență de compus testat, sau poate fi comparată cu cantitatea de transcriere într-o celulă substanțial identică care este lipsită de polipeptidele T2R de interes. O celulă substanțial identică poate fi derivată din aceeași celulă din care a fost preparată celula recombinantă, dar care nu a fost modificată prin introducerea de ADN heterolog DNA. Orice diferență în cantitatea de transcriere indică că, compusul testat a alterat într-o oarecare măsură activitatea polipeptidei T2R de interes.

Animale transgenice neumane care exprimă receptorii chemiosenzoriali

[00263] Animale neumane care exprimă una sau mai multe secvențe de receptor de gust conform invenției pot fi de asemenea utilizate pentru determinările receptorului. Asemenea exprimare poate fi utilizată pentru a determina dacă un compus de testat se leagă în mod specific la un complex de receptor transmembranar de gust de la un mamifer in vivo prin contactarea unui animal neuman transfectat în mod stabil sau temporar cu acizi nucleici codificând receptorii chemosenzoriali sau legând cu ligand porțiuni ale acestora cu un compus de testat și determinând dacă animalul reacționează la compusul de testat prin legare în mod specific la complexul polipeptidă receptor.

[00264] Animale transfectate sau infectate cu vectorii invenției sunt în special utilizate pentru teste pentru a identifica și caracteriza stimuli de gust care se pot lega de un receptor specific sau seturi de receptori. Asemenea animale infectate cu vectori care exprimă secvențe de receptor de gust pot fi utilizate in vivo pentru depistarea stimulilor de gust și efectului asupra acestora, de exemplu, fiziologia celulei (de exemplu, asupra neuronilor de gust), asupra SNC sau comportamentului.

[00265] Mijloace pentru a infecta/exprima acizii și vectorii nucleici, fie individual fie ca biblioteci, sunt bine cunoscute în domeniu. O varietate de parametri ai celulei, organelor individuale sau întregului animal se poate măsura printr-o varietate de mijloace. Secvențele T2R ale invenției pot fi de exemplu, exprimate în țesuturi de gust animale prin livrare cu un agent de infectare, de exemplu, vector de expresie al adenovirusului.

[00266] Genele receptoare de gust endogene pot rămâne funcționale și activitatea de tip sălbatic (nativă) poate fi încă prezentă. În alte situații, când este de dorit ca toată activitatea receptorului de gust să fie prin receptorul hibrid exogen introdus, utilizarea unei linii knockout este preferată. Metode pentru construcția de animale transgenice neumane, în particular șoareci transgenici și selecția și prepararea de constructe recombinante pentru a genera celule transformate sunt bine cunoscute în domeniu.

[00267] Construcția unei celule și a unui animal "knockout" se bazează pe premiza că nivelul de exprimare a unei gene particulare într-o celulă de mamifer poate fi scăzut sau complet anulat prin introducerea într-un genom a unei noi secvențe ADN care are rolul de a întrerupe o anumită porțiune de secvență ADN a genei ce trebuie suprimată. De asemenea, "inserția de cursă de gene" poate fi utilizată pentru a întrerupe o genă gazdă și se pot utiliza celule stem (ES) embrionice de șoarece pentru a produce animale transgenice knockout (vezi, de exemplu, Holzschu, Transgenic Res 6:97-106 (1997)). Inserția de exogen este în mod obișnuit prin recombinare omoloagă între secvențe de acid nucleic complementare. Secvența exogenă este o anumită porțiune a unei gene țintă ce trebuie modificată, cum ar fi secvențe exonice, intronice sau transcripțional reglatoare sau oricare secvență genomică care este capabilă să afecteze nivelul de exprimare a genei țintă; sau o combinație a acestora. Orientarea genei prin recombinare omoloagă în celule stem pluripotențiale embrionice permite să se modifice precis secvența genomică de interes. Poate fi utilizată oricare tehnică pentru a crea, a ecrana, propaga un animal knockout, de exemplu, vezi Bijvoet, Hum. Mol. Genet. 7:53-62 (1998); Moreadith, J. Mol. Med. 75:208-216 (1997); Tojo, Cytotechnology 19:161-165 (1995); Mudgett,

Metode Mol. Biol. 48:167-184 (1995); Longo, Transgenic Res. 6:321-328 (1997); U.S. Pat. Nos. 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] Acizii nucleici ai invenției pot fi utilizați de asemenea ca reactivi pentru a produce celule umane "knockout" și progeniturile acestora. În mod similar, acizii nucleici ai invenției pot de asemenea fi utilizați ca reactivi pentru a produce "knock-in-uri" la șoareci. Secvențe de gene T2R umane sau de șobolan pot înlocui ortologii T2R în genomul de șoarece. Astfel, este produs un șoarece ce exprimă T2R uman sau de șobolan. Aceste șoarece poate fi apoi utilizat pentru a analiza funcția T2R uman sau de șobolan și a identifica liganzii pentru asemenea T2R.

Modulatori

[00269] Compușii testați ca modulatori ai unui membru al familiei T2R pot fi oricare compus chimic mic sau entitate biologică, cum ar fi o proteină, zahăr, acid nucleic sau lipidă. Alternativ, modulatorii pot fi versiuni alterate genetic ale unui membru al familiei T2R. În mod specific, compușii test pot fi molecule chimice mici și peptide. Esențial poate fi utilizat oricare compus chimic ca un modulator potential sau ligand în testele invenției, deși sunt utilizați cel mai adesea compușii care pot fi dizolvați în soluții apoase sau organice (în special pe bază de DMSO). Testele pot fi proiectate pentru a selecta biblioteci chimice mari prin automatizarea etapelor de testare și a asigura compușii din oricare sursă convenabilă pentru testări, care sunt în mod specific manevrate în paralel (de exemplu, în formate de microtitrare pe plăci de microtitrare în determinări robotice). Se va aprecia că există mulți furnizori de compuși chimici, incluzând Sigma (St. Louis, Mo.), Aldrich (St. Louis, Mo.), Sigma-Aldrich (St. Louis, Mo.), Fluka Chemika-Biochemica Analytika (Buchs, Switzerland) și alții asemenea.

[00270] Într-o formă de realizare, metodele de selecție ridicată a materialelor implică asigurarea unei biblioteci chimice combinatorii sau de peptide conținând un număr mare de compuși potențiali terapeutici (compuși potențial modulatori sau liganzi). Asemenea "biblioteci chimice combinatorii" sau "biblioteci de liganzi" sunt apoi

selecționate în unul sau mai multe teste, așa cum s-a descris aici, pentru a identifica membri ai bibliotecii (specii chimice particulare sau subclase) care manifestă o activitate caracteristică dorită. Compușii astfel identificați pot servi drept "compuși de comandă" convenționali sau pot fi ei înșiși utilizați ca produse potențiale sau reale de consum.

[00271] O bibliotecă chimică combinatorie este o colecție de compuși chimici diverși generați fie prin sinteză chimică fie prin sinteză biologică, prin combinarea unui număr de "blocuri de construcție" chimice ca reactanți. De exemplu, o bibliotecă chimică combinatorie lineară cum ar fi o bibliotecă de polipeptide este formată prin combinarea unui set de blocuri de construcție chimice (aminoacizi) pe orice cale posibilă pentru o lungime dată a unui compus (adică, numărul de aminoacizi dintr-un compus polipeptidic). Printr-o asemenea amestecare combinatorie de blocuri de construcție chimice se pot sintetiza milioane de compuși chimici.

[00272] Prepararea și selectarea bibliotecilor chimice combinatorii este bine cunoscută de specialiștii în domeniu. Asemenea biblioteci chimice combinatorii includ, dar nu se limitează la, biblioteci de peptide (vezi, de exemplu, brevetul US nr. 5010175, Furka, Int. J. Pept. Prot. Res., 37:487-93 (1991) și Houghton și colab., Nature, 354:84-88 (1991)). Se pot utiliza de asemenea și alte căi chimice pentru a genera diverse biblioteci chimice. Asemenea căi chimice includ, dar nu se limitează la: peptoide (de exemplu, WO 91/19735), peptide codificate (de exemplu, WO 93/20242), bio-oligomeri random (de exemplu, WO 92/00091), benzodiazepine (de exemplu, brevetul US nr. 5288514), diversomeri precum hidantoine, benzodiazepine și dipeptide (Hobbs și colab., PNAS., 90:6909-13 (1993)), polipeptide cu vinil (Hagihara și colab., J. Amer. Chem. Soc., 114:6568 (1992)), peptidomimetici nonpeptidici cu un schelet de glucoză (Hirschmann și colab., J. Amer. Chem. Soc., 114:9217-18 (1992)), sinteze organice analoage de biblioteci de compuși mici (Chen și colab., J. Amer. Chem. Soc., 116:2661 (1994)), oligocarbamați (Cho și colab., Science, 261:1303 (1993)), peptidil fosfonați (Campbell și colab., J. Org. Chem., 59:658 (1994)), biblioteci de acizi nucleici (Ausubel, Berger, și Sambrook, toate supra), biblioteci de acizi nucleici peptidici (brevetul US nr. 5539083), biblioteci de anticorpi (Vaughn și colab., Nature Biotechnology, 14(3):309-14 (1996) și

PCT/US96/10287), biblioteci de carbohidrați (Liang și colab., Science, 274:1520-22 (1996) și brevetul US nr. 5593853), biblioteci de molecule organice mici (benzodiazepine, Baum, C&EN, Jan 18, pag. 33 (1993); tiazolidinone și metatiazanone, brevetul US nr. 5549974; pirolidine, brevetele US nr. 5525735 și 5519134; compuși morfolinici, brevetul US nr. 5506337; benzodiazepine, 5,288,514, și altele asemenea).

[00273] Dispozitivele pentru prepararea bibliotecilor combinatorii sunt disponibile comercial (vezi, de exemplu, 357 MPS, 390 MPS (Advanced Chem Tech, Louisville Ky.), Symphony (Rainin, Woburn, Mass.), 433A (Applied Biosystems, Foster City, Calif.), 9050 Plus (Millipore, Bedford, Mass.)). În plus, numeroase biblioteci combinatorii sunt de asemenea, ele însele, disponibile comercial (vezi, de exemplu, ComGenex, Princeton, N.J.; Tripos, Inc., St. Louis, Mo.; 3D Pharmaceuticals, Exton, Pa.; Martek Biosciences; Columbia, Md.; etc.).

[00274] Într-un aspect al invenției, modulatorii T2R pot fi utilizați în orice produs alimentar, produs de cofetărie, compoziție farmaceutică sau ingredient al acestora pentru a modula gustul produsului, compoziției sau ingredientului într-un mod dorit. De exemplu, modulatorii T2R care intensifică senzația de gust amar pot fi adăugați pentru a da un gust amar unui produs sau compoziție, în timp ce modulatorii T2R care blochează senzațiile de gust amar pot fi adăugați pentru a bloca gustul amar al unui produs sau compoziție. De asemenea, invenția furnizează mijloace de identificare a compușilor amari aflați în alimente, băuturi răcoritoare, cosmetice și medicamente și pentru producerea de alimente, băuturi răcoritoare și medicamente cu gust îmbunătățit sau fără gust sau având o cantitate redusă a acestuia.

Utilizarea Compușilor Identificați de către Invenție

[00275] Compușii identificați conform invenției pot fi adăugați la alimente, băuturi răcoritoare, cosmetice sau compoziții medicale pentru a modula, preferabil a bloca gustul amar declanșat prin activarea a cel puțin unuia dintre hT2R8 și/sau hT2R14 prin compușii amari prezenți în cafea și alimente înrudite, băuturi răcoritoare și medicamente sau compușii înrudiți structural sau alți compușii amari, de exemplu,

compușii aflați în alimente și băuturi răcoritoare sau medicamente sau cosmetice care provoacă o percepție a gustului amar.

[00276] În particular compusul C și analogii acestuia, pe baza gamei lor largi de proprietăți antagoniste pot fi utilizați ca aditivi în oricare aliment, băuturi răcoritoare, medicament sau material pentru consumul uman sau animal în care gustul amar este de dorit a fi ameliorat. Date fiind proprietățile compusului C, aceste materiale pot conține liganzi amari cunoscuți că interacționează cu liganzii amari specifici cum sunt hT2R3, 7, 10, 14, 16, 44, 51, 55, 61, 63, 64, 65, sau 71 și/sau cu hT2R5, 9, 13, 54, 67 și 75 sau o combinație a acestora sau care conțin compușii amari la care selectivitatea receptorului de gust amar al acestora este nedeterminată. În special aplicațiile preferate sunt compozițiile ce conțin compușii care activează receptorii multipli de gust amar.

[00277] În plus, compușii subiect ce includ compusul C pot fi utilizați în legarea competitivă și în teste funcționale, precum și în testele de gust pentru a identifica compușii amari la care compusul C blochează sau inhibă gustul amar.

[00278] Așa cum s-a observat mai înainte, de preferință, proprietățile de modulare a gustului, preferabil proprietățile de blocare a gustului amar al compușilor identificați în testele subiect bazate pe celule T2R vor fi confirmate în teste de gust la om sau animale, preferabil teste de gust la om.

Kituri

[00279] Genele T2R și omologii acestora sunt instrumente utile pentru identificarea celulelor receptoare de gust, pentru determinări de criminalistică și paternitate și pentru examinarea transducției de gust. Reactivii membri specifici ai familiei T2R care hibridizează în mod specific la acizii nucleici T2R, cum sunt probele și primerii T2R și reactivii specifici T2R care se leagă în mod specific la o proteină T2R, de exemplu, anticorpii T2R sunt utilizați pentru a examina exprimarea celulelor de gust și reglarea transducției de gust.

[00280] Determinările cu acid nucleic pentru prezența de ADN și ARN ca membru al familiei T2R într-o probă includ numeroase tehnici cunoscute specialiștilor în domeniu, cum sunt analiza southern, analiza northern, dot blots, protecția RNazei, analiza S1, tehnici de amplificare cum sunt PCR și hibridizare in situ. În hibridizarea in situ, de exemplu, acidul nucleic țintă este eliberat din mediile celulare în așa fel încât să fie adecvat pentru hibridizare în interiorul celulei conservând morfologia celulară pentru interpretare ulterioară și analiză. Următoarele articole furnizează o trecere în revistă a hibridizării in situ: Singer și colab., *Biotechniques*, 4:230250 (1986); Haase și colab., *Methods in Virology*, vol. VII, 189-226 (1984); și Names și colab., eds., *Acid nucleic Hybridization: A Practical Approach* (1987). În plus, o proteină T2R poate fi detectată cu diferitele tehnici imunologice descrise mai sus. Proba de testare este în mod obișnuit comparată atât cu un martor pozitiv (de exemplu, o probă care exprimă o proteină T2R recombinantă) cât și cu un martor negativ.

[00281] Prezenta invenție furnizează de asemenea truse pentru selectarea modulatorilor dintre membrii familiei T2R. Asemenea kituri pot fi preparate din materiale și reactivi ușor disponibile. De exemplu, asemenea kituri pot cuprinde unul sau mai multe materiale următoare: acizi nucleici sau proteine T2R, tuburi pentru reacție și instrucțiuni pentru testarea activității T2R. Opțional, kitul conține o polipeptidă T2R funcțională. O mare varietate de kituri și componente pot fi preparate conform prezentei invenții, în funcție de intenția utilizatorului de kit și nevoilor particulare ale utilizatorului.

[00282] Având acum descrierea generală a invenției, va fi, de asemenea, ușor de înțeles prin referire la următoarele exemple, care sunt furnizate pentru ilustrare și nu intenționează o limitare. Se înțelege că pot fi făcute diferite modificări și schimbări la formele de realizare ale exemplelor dezvăluite aici fără a se îndepărta de spiritul și scopul invenției.

EXEMPLE

Exemplul 1

hT2R8 și hT2R14 sunt activați de fracția amară de cafea

[00283] O fracție amară parțial purificată din cafea a fost utilizată pentru a testa T2R 25 uman în celule HEK transfectate tranzitiv așa cum a fost descris în cererile de brevet anterioare. Pe scurt (așa cum s-a discutat mai detaliat în publicația de brevet U.S nr. 2003/0170608, încorporată aici prin referință), celule embrionare de rinichi umane, care exprimă în mod stabil antigen de celule-T mari și proteina G15 (HEK-G15) au fost transfectate tranzitiv cu o plasmidă hT2R de expresie (de exemplu, prin utilizarea Ca^{2+} fosfat sau prin utilizarea sistemelor pe bază de lipide). În plus, au fost transfectate tranzitiv și alte linii celulare HEK-G15 cu alți T2R umani transfectați. Apoi, s-a utilizat o determinare pe bază de fluorescență pentru a detecta schimbările de concentrație a calciului în celulele transfectate tranzitiv. Interacțiunea compușilor testați cu celulele transfectate provoacă o cascadă de semnalare care conduce la activarea PLC și la o creștere ulterioară a concentrației intracelulare a calciului conducând la o mărire a fluorescenței care a fost detectată utilizând un colorant fluorescent sensibil la calciu. Aceste schimbări au fost monitorizate utilizând de exemplu, microscopie de fluorescență și software proiectat adecvat (cum ar fi Imaging Workstation, Axon).

[00284] Fracția de cafea are un nivel mare de fluorescență, care interferează cu determinarea. Pentru a evita interferența, a fost testat un număr de coloranți albaștri pentru capacitatea de a bloca fluorescența din fracția de cafea. Așa cum s-a arătat în Fig. 1, fracția de cafea a activat hT2R8 și hT2R14 în determinări imagistice ale calciului, utilizând celulele transfectate tranzitiv. Colorantul albastru utilizat în experimentul din Fig. 1 este FD&C 1 la 1,9 mM. Mulți alți hT2R apar de asemenea ca fiind activați de această fracție de cafea. Cu diferiți coloranți albaștri sunt activate diferite combinații de hT2R (Tabelul 1). Totuși, hT2R8 și hT2R14 sunt acceptați în mod sigur ca răspunzând la fracția de cafea și activitățile acestor doi receptori sunt dependente de doza de fracție de cafea (Fig. 2) Colorantul albastru utilizat în experimentul din Fig. 2 a fost triptan blue.

Tabelul 1 hT2R activați de fracția de cafea cu diferiți coloranți albaștri

Colorant albastru	Receptori hT2R Identificați	
	Activat	Slab activat
FD&C 1	8, 14	---
Tripan	1, 8, 14	10, 75
Coomassie	14	---

[00285] Utilizând această determinare, s-a găsit că adăugarea fracției amare din cafea la celule care exprimă hT2R8 și hT2R14 a activat proteinele intracelulare G. Prin contrast, utilizând aceeași determinare, fracția amară din cafea nu a activat în mod specific celulele HEK-G15 care a fost transfectate tranzitiv cu alți hT2R. Acest experiment susține concluzia că receptorii de gust hT2R8 și hT2R14 răspund în mod specific la compușii amari prezenți în cafea.

Exemplul 2

Identificarea antagoniștilor de hT2R8 și hT2R14

[00286] Pentru a identifica antagoniști, au fost generate linii celulare exprimând în mod stabil hT2R8 și respectiv hT2R14, împreună cu proteina himerică eterogenă G16g44 așa cum a fost descris în cereri anterioare de brevet. A fost stabilită o determinare de mare precizie utilizând linii celulare stabile și FLIPR (Fluorescent Imaging Plate Reader). Pentru a activa receptorii până la 70-80% din activitatea lor maximă s-a utilizat un agonist al hT2R8 sau hT2R14. Pentru hT2R8, agonistul utilizat a fost andrografolida (200 μ M); pentru hT2R14, a fost acid aristolochic (3 μ M). Pentru a identifica antagoniștii, împreună cu agonistul s-au adăugat compuși cu diverse structuri chimice. Compușii care provoacă o reducere semnificativă din punct de vedere statistic a activității receptorului sunt reuniți, și sunt reconfirmați prin curbe de inhibare dependente de doză. Compusul A și Compusul B au fost identificați ca antagoniști ai hT2R8 (Fig. 3). Compusul C a fost identificat ca un antagonist al hT2R14 (Fig. 4).

Exemplul 2a**Combinații de antagoniști ai hT2R8 și hT2R14 reduc gustul amar al cafelei**

[00287] S-au realizat teste de gust cu combinații de antagoniști hT2R8 și hT2R14 în fracția de cafea și două tipuri de cafea instant (prăjită mediu și prăjită mediu-închisă la culoare), utilizând o metodă de alegere forțată a 2-alternative cu o echipă de 4-5 participanți. Participanților la determinarea gustului li s-au dat probe de cafea cu antagoniști, împreună cu aceleași probe fără antagoniști, participanții au fost rugați să identifice probele mai amare din pereche. Așa cum s-a arătat în Tabelul 2, participanții au identificat corespunzător probele de fracții de cafea fără antagoniști ca fiind mai amare decât cele cu antagoniști, indicând că antagoniștii au redus gustul amar al fracțiilor de cafea. În mod similar, așa cum s-a arătat în Tabelul 3, antagoniștii au redus gustul amar al ambelor tipuri de cafea instant.

[00288] Așa cum a fost demonstrat de testele de gust din acest exemplu, percepția de amăreală din compoziții (de exemplu, alimente, băuturi și/sau medicamente) care prezintă gust amar poate fi redusă sau eliminată prin incorporarea de antagoniști ai hT2R8 și/sau hT2R14 în astfel de compoziții.

[00289] Pentru a determina contribuția unui antagonist individual, au fost realizate teste de gust cu cafea instant mediu prăjită cu Compus C. Așa cum s-a arătat în Tabelul 4, antagonistul de hT2R14 (Compus C) este suficient pentru ca el însuși să reducă gustul amar la cafeaua din acest exemplu.

Tabelul 2 Rezultatele testelor de gust cu fracție de cafea și 2 combinații diferite de antagoniști

Test	Antagonist		Concentrație (μ M)	Selectat ca mai amar		Valoare P
	hT2R8	hT2R14		Fără antagoniști	Cu antagoniști	
1	Comp A	Comp C	30	32	0	<0,001
2	Comp B	Comp C	30	15	1	0,001
3	Comp A	Comp C	10	16	0	<0,001

Tabelul 3 Rezultate test gust cu 2 tipuri de cafea instant

Cafea Instant	Antagoniști		Concentrație (μ M)	Selectat ca mai amar		Valoare P
	hT2R8	hT2R14		Fără antagoniști	Plus antagoniști	
Mediu	Comp A	Comp C	30	16	0	<0,001
Mediu- închis	Comp A	Comp C	30	13	3	0,021

Tabelul 4 3 Rezultate test gust cu cafea projită mediu și antagonist individual

Test gust	Antagonist	Concentrație (μ M)	Selectat ca mai amar		valoare P
			Fără Antagonist	Cu Antagonist	
1	Compus C	50	18	2	<0,001
2	Compus C	25	19	1	<0,001

Exemplul 3

Compusul C este un antagonist cu spectru larg al receptorului de gust amar

[00290] Exemplul 2 de mai sus arată că, compusul C este un antagonist al T2R uman identificat prin teste complete utilizând hT2R14. Experimente suplimentare

arată că, Compusul C este un antagonist potrivit larg pentru 13 T2R umani și într-o măsură mai mică antagonizează șase alți T2R umani. Mai mult, acest compus blochează în testele de gust intensitatea gustului amar provocat de un număr de diverse substanțe amare.

[00291] În mod specific, pentru a evalua selectivitatea inhibitorie a Compusului C, acest compus a fost testat pentru 22 de T2R umani care au fost obținuți de Senomyx. Acești receptori și liganzii de amar care activează acești T2R umani sunt raportați în cereri anterioare de brevet care sunt incorporate prin referință aici. Acești 22 de T2R umani sunt hT2R1, 3, 4, 5, 7, 8, 9, 10, 13, 14, 16, 44, 51, 54, 55, 61, 63, 64, 65, 67, 71 și 75. Secvențele de aminoacizi și acizi nucleici ale tuturor acestor T2R se pot găsi în aceste cereri anterioare de brevet. Acești T2R umani au fost fiecare transfectați tranzitiv în celule HEK293 care exprimă stabil proteina eterogenă G16g44 și au fost efectuate determinări funcționale utilizând acești receptori așa cum s-a descris în aceleași cereri de brevet. În aceste experimente fiecare receptor a fost activat de unul dintre liganzii săi selectați dintre moleculele amare dovedite anterior ca activând T2R-ul particular. Liganzii au fost utilizați la niveluri de concentrație EC80. Lista de liganzi amari utilizați și concentrațiile de liganzi testate sunt conținute în Tabelul 5 al acestui exemplu.

[00292] Mai mult, pentru a confirma activitatea in vitro a acestui compus în analiza de receptor, inventatorii au realizat teste de comparare de gust în pereche pentru a determina efectul compusului in vivo. Participanților la testul de gust li s-a cerut să guste substanțele amare cu și fără Compus C și să identifice care probe au gust mai amar. Au fost testate perechi multiple de către fiecare participant, pentru a crește mărimea probei, iar rezultatele au fost analizate utilizând metode statistice adecvate. Ordinea probelor cu sau fără Compus C a fost întâmplătoare și echilibrată ca număr.

[00293] Pentru a stabili proprietățile antagonice generale ale acestui compus, acesta a fost testat pentru capacitatea sa de a bloca gustul amar provocat de o diversitate de liganzi amari ca și gustul amar provocat de liganzi amari cunoscuți ca activând receptori multipli de gust amar și liganzi amari care încă nu s-a dovedit a fi activatori ai unui hT2R specific. Au fost testate mai multe molecule amare cunoscute că activează receptorii de amar pentru care activarea este inhibată de Compusul C. În

mod specific, salicinul este o moleculă amară care activează hT2R16 și testele de gust au arătat că, Compusul C la 40 μ M poate reduce gustul său amar. Feniltioureea este o moleculă amară care activează hT2R51, și Compusul C reduce gustul său amar la 25 μ M.

[00294] Mai multe molecule amare care pot activa T2R multipli au fost testate în mod similar cu Compusul C. Activarea receptorilor de amar pentru unele dintre aceste molecule a fost parțial inhibată de Compusul C. Omeprazolul este o moleculă amară care activează hT2R10, 14 și 75. Cu toate că gustul său amar poate implica multipli receptori de amar, gustul său amar a fost de asemenea redus în mod apreciabil de Compusul C. Rebaudiosid A este un îndulcitor natural cu puternic gust amar, care activează cel puțin T2R 7 umani. Gustul său amar este de asemenea redus de Compusul C.

[00295] În plus, Compusul C a inhibat gustul amar pentru unii compuși în care receptorii cu care ei interacționează sunt necunoscuți, cum ar fi dextrometorfan și difenhidramin. Efectul Compusului C asupra acestor compuși a fost testat și s-a descoperit că gustul lor amar a fost de asemenea redus.

[00296] Referitor la cele anterioare, Figura 5 conține rezultate experimentale în care Compusul C a fost testat cu diferiți compuși agoniști. Activitatea de inhibare este reprezentată prin reducerea activității receptorului în prezența Compusului C. Figura 5 relevă că 13 hT2R diferiți au fost inhibați semnificativ (mai mult de 30%) de către Compusul C. Acești 13 hT2R sunt hT2R3, 7, 10, 14, 16, 44, 51, 55, 61, 63, 64, 65, și 71. Șase alți receptori, incluzând hT2R5, 9, 13, 54, 67 și 75 au fost de asemenea inhibați, deși într-o măsură mai mică.

Tabelul 5 Lista liganzilor și concentrațiilor utilizate pentru fiecare T2R testat.

hT2Rs	Agonist	Concentrație
1	Acid picric	0,05mM
3	Clorochină pH 6,5	50 μ M
4	Clorochină pH 6,5	5mM
5	Picolină	10mM
7	Clorochină pH 6,5	10mM
8	Andrografolidă	0.5mM
9	Ofloxacin	1mM

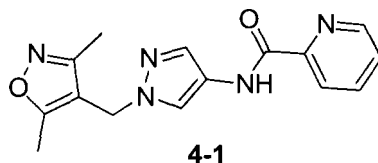
10	Stricnină	50μM
13	Oxifenoniu	1mM
14	Acid aristolochic	2μM
16	Salicin	1mM
44	Denatoniu	0.5μM
51	Prop	2.5μM
54	Ranitidină	5mM
55	Cinconină	150μM
61	Acid aristolochic	25nM
63	Cafeină	1mM
63	Andrografolidă	100μM
64	Acid aristolochic	1μM
65	Oleuropein	1mM
67	Andrografolidă	5μM
71	Acid picric	10μM
75	Stricnină	1μM

Exemplul 4

Antagoniști hT2R8 : Obținerea compușilor din invenție

Compușii exemplificați conform invenției sunt sintetizați după cum urmează.

Exemplul 4-1: N-(1-((3,5-dimetilizoxazol-4-il)metil)-1H-pirazol-4-il) picolinamidă.



[00297] 1-((3,5-dimetilizoxazol-4-il)metil)-1H-pirazol-4-amina clorhidrat (exemplul 4-1a) (400 mg, 2,1 mmoli), acid picolinic (256 mg, 2,1 mmoli), și BtOH (388 mg, 2,50 mmoli) s-au amestecat în DCM (7 mL). Reacția a fost tratată cu trietilamină (670 mL, 4,8 mmoli) și s-a agitat timp de 15 minute la temperatura camerei în atmosferă de azot. S-a adăugat EDC (598 mg, 3,1 mmoli) și reacția a fost agitată timp de încă 4 ore. Reacția a fost apoi diluată cu diclormetan (5 mL) și s-a spălat cu soluție apoasă saturată de NaHCO₃ (5 mL, 2x) și apoi cu soluție apoasă saturată NaCl (5 mL). Stratul organic a fost colectat, s-a uscat, și s-a filtrat. Solvenții au fost îndepărtați sub vid. Produsul a fost resuspendat în EtOH (5 mL) și s-a purificat prin HPLC cu fază inversă (gradient ACN 5%-95% în H₂O: 25 minute). Frațiile pure au fost combinate și concentrate pentru a da N-(1-((3,5-dimetilizoxazol-4-il)metil)-1H-pirazol-4-

il)picolinamidă (372 mg, 60%) sub forma unui solid alb. ^1H RMN (CDCl_3 , 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; $[\text{M}+\text{H}]$ calculat pentru $\text{C}_{15}\text{H}_{15}\text{N}_5\text{O}_2$; așteptat 297,1; găsit 298,3. Punct de topire: 135-137°C.

[00298] Compusul a avut un IC_{50} pentru receptorul de amar hT2R8 de 0,57 μM

Exemplul 4-1a: Clorhidrat de 1-((3,5-dimetilizoxazol-4-il)metil)-1H-pirazol-4-amină

[00299] 1-((3,5-Dimetilizoxazol-4-il)metil)-1H-pirazol-4-ilcarbamat de terț-butil (Exemplul 4-1b) (592 mg, 2 mmoli) a fost agitat într-o soluție de HCl 4N în dioxan (20 mL) la temperatura ambiantă timp de 2 ore. Solventul a fost îndepărtat la presiune redusă și reziduul a fost reluat într-un amestec 1/1 de acetat de etil/hexani (30 mL) și s-a concentrat (de două ori). Solidul a fost triturat cu hexani și s-a colectat prin filtrare dând clorhidrat de 1-((3,5-dimetilizoxazol-4-il)metil)-1H-pirazol-4-amină (500 mg, 99%) sub forma unui solid alb. ^1H RMN ($\text{DMSO}-d_6$, 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).

Exemplul 4-1b: 1-((3,5-dimetilizoxazol-4-il)metil)-1H-pirazol-4-il carbamat de terț-butil

[00300] 3,5-dimetil-4-((4-nitro-1H-pirazol-1-il)metil)izoxazol (Exemplul 4-1c) (14,6 g, 66 mmoli), anhidridă Boc și 10% Pd/C (3,8g) s-au agitat în MeOH (400 mL) sub 1 atmosferă de H_2 timp de 16 ore la temperatura ambiantă. Amestecul a fost filtrat și soluția a fost îndepărtată la presiune redusă. Reziduul a fost purificat prin cromatografie pe silicagel (20% acetat de etil în hexani) pentru a da 1-((3,5-dimetilizoxazol-4-il)metil)-1H-pirazol-4-ilcarbamat de terț-butil (12,7 g, 66%) sub forma unui solid roz deschis. ^1H RMN (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^+).

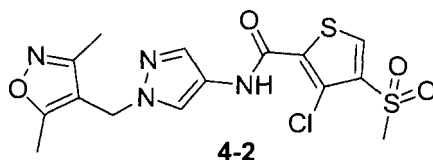
Exemplul 4-1c: 3,5-dimetil-4-((4-nitro-1H-pirazol-1-il)metil)izoxazol

[00301] La 4-nitro-1H-pirazol (Exemplul 4-1d) (3,8 g, 34 mmoli) în DMF (80 mL) răcit la 0°C, cu o baie gheață/apă, s-a adăugat *t*-BuOK (4,2 g, 38 mmoli). După adăugarea bazei, baia de gheață a fost îndepărtată și amestecul a fost agitat timp de 30 minute urmat de adăugarea de 4-(clormetil)-3,5-dimetilizoxazol (5 g, 34 mmoli). Reacția a fost refluxată timp de 16 ore apoi a fost răcită la temperatura ambiantă. La amestecul de reacție s-a adăugat H₂O și precipitatul format a fost colectat prin filtrare. Precipitatul a fost spălat suplimentar cu H₂O, apoi a fost uscat la vid înalt pentru a da 3,5-dimetil-4-((4-nitro-1H-pirazol-1-il)metil)izoxazol (5,8 g, 78%) sub forma unui solid galben deschis. ¹H RMN (CDCl₃, 400 MHz): δ 2,23 (s, 3H), 2,46 (s, 3H), 5,08 (s, 2H), 8,02 (s, 1H), 8,08 (s, 1H).

Exemplul 4-1d: 4-nitro-1H-pirazol

[00302] La acid sulfuric concentrat (100 mL) s-a adăugat pirazol (10 g, 147 mmoli), în porțiuni, în timp ce temperatura internă de reacție a fost menținută sub 50°C cu o baie gheață apă. Apoi a fost adăugat în picătură acid azotic concentrat (10 mL), menținând temperatura internă de reacție sub 50°C cu o baie de gheață apă. Baia de gheață apă a fost îndepărtată și reacția a fost încălzită la 60°C și s-a agitat timp de 4 ore. Reacția a fost răcită cu o baie de gheață apă și s-a alcalinizat, la pH ~ 8, cu soluție apoasă de NaOH 18 N (150 mL). Produsul care a precipitat sub forma unui solid alb, a fost colectat prin filtrare, s-a spălat cu H₂O și s-a uscat la vid înalt pentru a da 4-nitro-1H-pirazol (7g, 42%) sub forma unui solid alb. ¹³C RMN (100 MHz, CDCl₃): δ 126,4, 137,0.

Exemplul 4-2: 3-clor-N-(1-((3,5-dimetilizoxazol-4-il)metil)-1H-pirazol-4-il)-4-(metilsulfonil)tiofen-2-carboxamidă

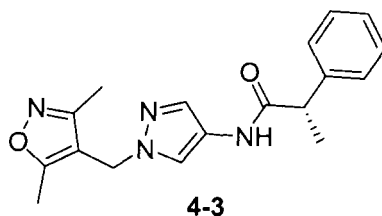


[00303] La un amestec, aflat sub agitare, de clorhidrat de ((3,5-dimetilizoxazol-4-il)metil)-1H-pirazol-4-amină (Exemplul 4-1a) (500 mg, 2 mmoli) în DCM (20 mL), răcit la 0 °C printr-o baie de gheață apă, s-a adăugat trietilamină (600 mg, 6 mmol).

Amestecul a fost agitat până când toate solidele au intrat în soluție (~10 minute). La amina liberă s-a adăugat clorură de 3-clor-4-(metilsulfonil)tiofen-2-carbonil (543 mg, 2,1 mmoli) în 2 mL CH₃CN, printr-o seringă, la 0°C. Baia de gheață a fost îndepărtată și amestecul a fost agitat timp de 2 ore. Reacția a fost diluată cu diclormetan (100 mL) și faza organică a fost spălată cu H₂O (200 mL). Stratul organic s-a uscat pe sulfat de sodiu, s-a filtrat și s-a concentrat la presiune redusă. Solidul a fost triturat cu acetat de etil/hexani (1/5) pentru a da 3-clor-N-(1-((3,5-dimetilizoxazol-4-il)metil)-1H-pirazol-4-il)-4-(metilsulfonil)tiofen-2-carboxamidă (375 mg, 45%) sub forma unui solid alb. ¹H RMN (CDCl₃, 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 ; [M+H] 415,5. Punct de topire: 202-204°C.

[00304] Compusul avut un IC₅₀ pentru receptorul de amar hT2R8 de 2,09 μM

[0001] **Exemplul 4-3: (S)-N-(1-((3,5-dimetilizoxazol-4-il)metil)-1H-pirazol-4-il)-2-fenilpropanamidă.**

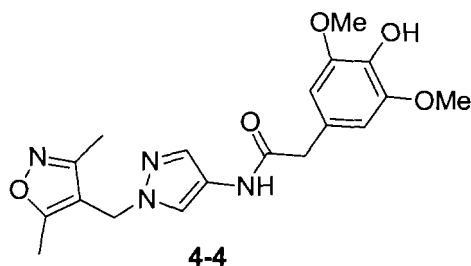


[00305] Clorhidrat de 1-((3,5-dimetilizoxazol-4-il)metil)-1H-pirazol-4-amină (Exemplul 4-1a) (200mg, 1 mmol), acid (S)-2-fenilpropionic (156 mg, 1 mmol), și PyBop (650 mg, 1,3 mmol) s-au adăugat la DMF (4 mL) urmat de trietilamină (0,3 mL, 2,1 mmoli). Reacția s-a agitat timp de 4 ore la temperatura camerei sub atmosferă de azot, apoi s-a diluat cu acetat de etil (20 mL), s-a spălat cu soluție apoasă saturată de NaHCO₃ (2 x 15 mL) urmat de soluție apoasă saturată de NaCl (15 mL). Faza organică s-a uscat, s-a filtrat și s-a concentrat pe un evaporator rotativ. Produsul a fost resuspendat în metanol (3 mL) și s-a purificat prin HPLC cu fază inversă (5% - 95% ACN în H₂O: gradient de 25 minute). Frațiile conținând produsul pur au fost concentrate pentru a da (S)-N-(1-((3,5-dimetilizoxazol-4-il)metil)-1H-pirazol-4-il)-2-fenilpropanamidă (200 mg, 60%) sub forma unui solid alb. ¹H RMN (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). Punct de topire 108°C – 110°C.

[00306] Compusul avut un IC₅₀ pentru receptorul de amar hT2R8 de 0,41 µM

Exemplul 4-4 : N-(1-((3,5-dimetilizoxazol-4-il)metil)-1H-pirazol-4-il)-2-(4-hidroxi-3,5-dimetoxifenil)acetamidă.

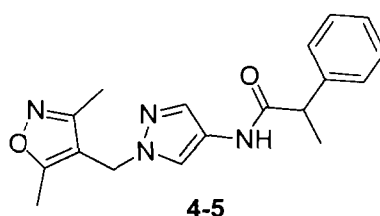


[00307] Clorhidrat de 1-((3,5-dimetilizoxazol-4-il)metil)-1H-pirazol-4-amină (Exemplul 4-1a) (376 mg, 1,7 mmol), acid 2-(4-hidroxi-3,5-dimetoxifenil)acetic (350 mg, 1,7 mmol), PyBop (1 g, 2 mmoli) și trietilamină (605 mg, 6 mmoli) s-au agitat împreună în DMF (10 mL) la temperatura camerei timp de 2 ore. Amestecul de reacție a fost diluat cu HCl apos 1N (100 mL) și s-a extras cu DCM (3x, 75 mL). Extractele organice combinate s-au uscat pe sulfat de sodiu, s-au filtrat și s-au concentrat pe un evaporator rotativ. Reziduul a fost purificat prin cromatografie pe silicagel (30% acetat de etil în hexani) pentru a da N-(1-((3,5-dimetilizoxazol-4-il)metil)-1H-pirazol-4-il)-2-(4-hidroxi-3,5-dimetoxifenil)acetamidă (189 mg, 29%) sub forma unui solid alb. ¹H RMN (CDCl₃, 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; [M+H] calculat pentru C₁₉H₂₂N₄O₅; așteptat 387,16; găsit 387,6. Punct de topire: 187-188°C.

[00308] Compusul avut un IC₅₀ pentru receptorul de amar hT2R8 de 0,46 µM

Exemplul 4-5 : N-(1-((3,5-dimetilizoxazol-4-il)metil)-1H-pirazol-4-il)-2-fenilpropanamidă.

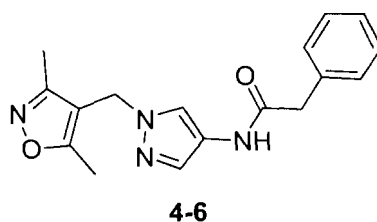
116



[00309] Clorhidrat de 1-((3,5-dimetilizoxazol-4-il)metil)-1H-pirazol-4-amină (Exemplul 4-1a) (300 mg, 1,3 mmol), acid 2-fenilpropanoic (225 mg, 1,5 mmol), trietilamină (300 mg, 3 mmoli), DMAP (61 mg, 0,5 mmol), și EDC (386 mg, 2 mmoli) s-au agitat împreună în DCM (10 mL) la temperatura camerei timp de 4 ore. Amestecul de reacție a fost diluat cu HCl apos 1N (100 mL) și s-a extras cu DCM (3x, 75 mL). Extractele organice combinate au fost uscate pe sulfat de sodiu, s-au filtrat și s-au concentrat pe un evaporator rotativ. Reziduul a fost purificat prin cromatografie pe silicagel (30% acetat de etil în hexani) pentru a da N-(1-((3,5-dimetilizoxazol-4-il)metil)-1H-pirazol-4-il)-2-fenilpropanamidă (272 mg, 81%) sub forma unui solid alb. ^1H RMN (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; $[\text{M}+\text{H}]$ calculat pentru $\text{C}_{18}\text{H}_{20}\text{N}_4\text{O}_2$; așteptat 325,16; găsit 325,5. Punct de topire: $129-130^\circ\text{C}$.

[00310] Compusul avut un IC_{50} pentru receptorul de amar hT2R8 de $0,32 \mu\text{M}$

Exemplul 4-6: N-(1-((3,5-dimetilizoxazol-4-il)metil)-1H-pirazol-4-il)-2-fenilacetamidă.

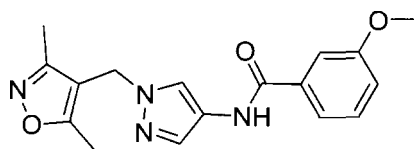


[00311] 1-((3,5-dimetilizoxazol-4-il)metil)-1H-pirazol-4-amină sare clorhidrat (Exemplul 4-1a) (230 mg, 1 mmol) și trietilamină (300 mg, 3 mmoli) s-au agitat în DCM (10 mL) răcit la 0°C cu o baie gheață/apă. La amestecul de reacție, s-a adăugat, în picătură, clorură de 2-fenilacetil (184 mg, 1,3 mmol). Când adăugarea a fost completă, baia de gheață a fost îndepărtată și reacția a fost agitată timp de 1

oră. Amestecul a fost diluat cu DCM (50 mL), s-a spălat cu HCl apos 1N (100 mL), urmat de NaOH apos 1N (100 mL) și apoi H₂O (100 mL). Extractele organice combinate au fost uscate pe sulfat de sodiu, s-au filtrat și solventul a fost îndepărtat pe un evaporator rotativ. Reziduul rezultat a fost purificat prin cromatografie pe silicagel (50% acetat de etil în hexani) pentru a da 210 mg de produs solid care a fost triturat în acetat de etil/hexani (1/9) pentru a da N-(1-((3,5-dimetilizoxazol-4-il)metil)-1H-pirazol-4-il)-2-fenilacetamidă (188 mg, 68%) sub forma unui solid alb. ¹H RMN (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] calculat pentru C₁₇H₁₈N₄O₂; așteptat 311,14; găsit 311,40. Punct de topire: 106-108°C.

[00312] Compusul avut un IC₅₀ pentru receptorul de amar hT2R8 de 0,53 μM

Exemplul 4-7: N-(1-((3,5-dimetilizoxazol-4-il)metil)-1H-pirazol-4-il)-3-metoxibenzamidă



4-7

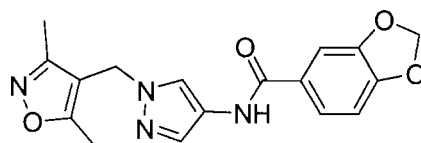
[00313] Clorhidrat de 1-((3,5-dimetilizoxazol-4-il)metil)-1H-pirazol-4-amină (Exemplul 4-1a) (300 mg, 1,3 mmol), acid 3-metoxibenzoic (172 mg, 1,3 mmol), EDC (386 mg, 2 mmoli) și trietilamină (303 mg, 3 mmoli) s-au agitat în DCM (5 mL) la temperatura ambiantă timp de 6 ore. Reacția a fost diluată cu DCM (50 mL) și faza organică a fost spălată cu HCL apos 0,1 N (150 mL) urmat de NaOH apos 1N (150 mL). Stratul organic a fost uscat pe sulfat de sodiu, s-a filtrat și s-a concentrat pe un evaporator rotativ. Produsul a fost purificat prin cromatografie pe silicagel (40% acetat de etil în hexani) pentru a da 225 mg de solid aproape alb. Solidul a fost triturat cu acetat de etil/hexani (1/9) și solidul alb a fost colectat prin filtrare. Produsul pur a fost dizolvat în etanol absolut și s-a concentrat pe un evaporator rotativ (4x, 25 mL) pentru a da N-(1-((3,5-dimetilizoxazol-4-il)metil)-1H-pirazol-4-il)-3-metoxibenzamidă (185 mg, 43%) sub forma unui solid alb. ¹H RMN (CDCl₃, 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; [M+H] calculat pentru C₁₇H₁₈N₄O₃; așteptat 327,14; găsit 327,30. Punct de topire: 127-129°C.

[00314] Compusul avut un IC₅₀ pentru receptorul de amar hT2R8 de 0,39 μM

Exemplul 4-8: N-(1-((3,5-dimetilizoxazol-4-il)metil)-1H-pirazol-4-il)benzo[d]

[1,3]dioxol-5-carboxamidă



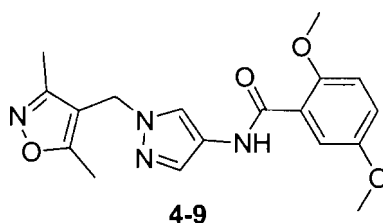
4-8

[00315] Clorhidrat de 1-((3,5-dimetilizoxazol-4-il)metil)-1H-pirazol-4-amină (exemplul 1a) (8 mg, 35 μmoli) și acid benzo[d][1,3]dioxol-5-carboxilic (7 mg, 42 μmoli) s-au dizolvat fiecare în 200 uL dimetilformamidă. Într-o placă Greiner cu 96 de godeuri de 1,2 ml s-a încărcat rășină Si-Carbodiimidă (70 mg, 70 μmoli), urmată de adăugarea de amină și acid. Hidroxibenzotriazol (6 mg, 42 μmoli) a fost dizolvat în 100 uL de dimetilformamidă și s-a adăugat în godeul de reacție. Reacția a fost agitată puternic peste noapte la temperatura camerei. Pentru a îndepărta excesul de acid carboxilic și hidroxibenzotriazol, în amestecul de reacție s-a adăugat rășină PS-Trisamină (35 mg, 70 μmoli) și a fost lăsat să se agite peste noapte la temperatura camerei. În godeul de reacție s-au adăugat 200 uL de acetonitril și s-a agitat timp de 1 minut. Soluția limpede de deasupra a fost transferată într-o nouă placă. Procedul de extracție a fost repetat de încă două ori. Soluția a fost evaporată la vid și s-a obținut produsul dorit. Randament 6%. MS M+H calculat 341,1, găsit 341,2.

[00316] Compusul avut un IC₅₀ pentru receptorul hT2R8 de amar de 0,2 μM

Exemplul 4-9: N-(1-((3,5-dimetilizoxazol-4-il)metil)-1H-pirazol-4-il)-2,5-dimetoxibenzamidă

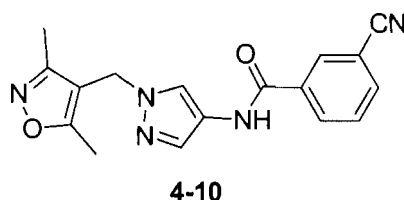
119



[00317] Preparată ca în Exemplul 4-8 din acid 2,5-dimetoxibenzoic și clorhidrat de 1-((3,5-dimetilizoxazol-4-il)metil)-1H-pirazol-4-amină (Exemplul 4-1a). Randament 13%. MS M+H calculat 357,5, găsit 357,3.

[00318] Compusul avut un IC₅₀ pentru receptorul hT2R8 de amar de 0,17 μM

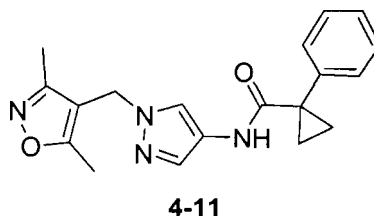
Exemplul 4-10: 3-ciano-N-(1-((3,5-dimetilizoxazol-4-il)metil)-1H-pirazol-4-il)benzamidă



[00319] Preparată ca în Exemplul 4-8 din acid 3-cianobenzoic și clorhidrat de 1-((3,5-dimetilizoxazol-4-il)metil)-1H-pirazol-4-amină (Exemplul 4-1a). Randament 15%. MS M+H calculat 322,6, găsit 322,3.

[00320] Compusul avut un IC₅₀ pentru receptorul de amar hT2R8 de 0,2 μM

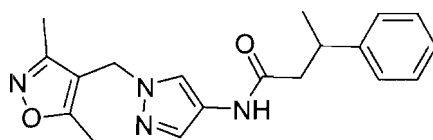
Exemplul 4-11: N-(1-((3,5-dimetilizoxazol-4-il)metil)-1H-pirazol-4-il)-1-fenilciclopropancarboxamidă



[00321] Preparată ca în Exemplul 4-8 din acid 1-fenilciclopropancarboxilic și clorhidrat de 1-((3,5-dimetilizoxazol-4-il)metil)-1H-pirazol-4-amină (Exemplul 4-1a). Randament 6%. MS M+H calculat 337,6, găsit 337,5.

[00322] Compusul avut un IC_{50} pentru receptorul de amar hT2R8 de 0,25 μ M

Exemplul 4-12: N-(1-((3,5-dimetilizoxazol-4-il)metil)-1H-pirazol-4-il)-3-fenilbutanamidă

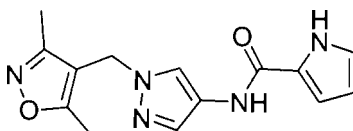


4-12

[00323] Preparată ca în Exemplul 4-8 din acid fenilbutanoic și clorhidrat de 1-((3,5-dimetilizoxazol-4-il)metil)-1H-pirazol-4-amină (Exemplul 4-1a). Randament 6%. MS

[00324] Compusul avut un IC_{50} pentru receptorul de amar hT2R8 de 0,28 μ M

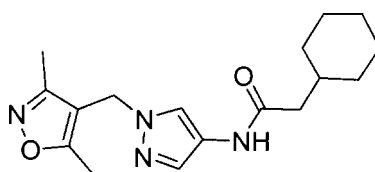
Exemplul 4-13: N-(1-((3,5-dimetilizoxazol-4-il)metil)-1H-pirazol-4-il)-1H-pyrrole-2-carboxamidă



4-13

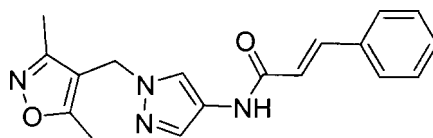
[00325] Preparată ca în Exemplul 4-8 din acid 1H-pirrol-2-carboxilic și clorhidrat de 1-((3,5-dimetilizoxazol-4-il)metil)-1H-pirazol-4-amină (Exemplul 4-1a). Randament 18%. MS $M+H$ calculat 286,6, găsit 286,3.

[00326] Compusul avut un IC_{50} pentru receptorul de amar hT2R8 de 0,57 μ M

Exemplul 4-14: 2-ciclohexyl-N-(1-((3,5-dimetilizoxazol-4-il)metil)-1H-pirazol-4-il)acetamidă**4-14**

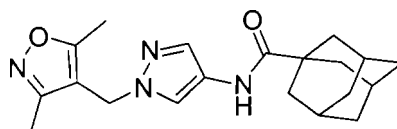
[00327] Preparată ca în Exemplul 4-8 din acid 2-ciclohexilacetic și clorhidrat de 1-((3,5-dimetilizoxazol-4-il)metil)-1H-pirazol-4-amină (Exemplul 4-1a). Randament 17%. MS M+H calculat 317,6, găsit 317,4.

[00328] Compusul avut un IC₅₀ pentru receptorul de amar hT2R8 de 0,73 μM

Exemplul 4-15: N-(1-((3,5-dimetilizoxazol-4-il)metil)-1H-pirazol-4-il)cinamamidă**4-15**

[00329] Preparată ca în Exemplul 4-8 din acid cinamic acid și clorhidrat de 1-((3,5-dimetilizoxazol-4-il)metil)-1H-pirazol-4-amină (Exemplul 4-1a). Randament 4%. MS M+H calculat 322,6, găsit 322,4.

[00330] Compusul avut un IC₅₀ pentru receptorul de amar hT2R8 de 0,7 μM

Exemplul 4-16: N-(1-((3,5-dimetilizoxazol-4-il)metil)-1H-pirazol-4-il) adamantan**4-16**

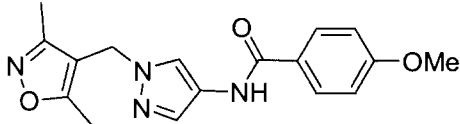
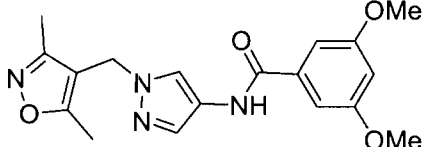
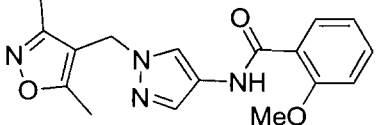
[00331] Clorhidrat de 1-((3,5-dimetilizoxazol-4-il)metil)-1H-pirazol-4-amină (300 mg, 1,56 mmol), acid adamantan-1-carboxilic (281 mg, 1,56 mmol), PyBop (972 mg, 1,87 mmol), și trietilamină (438 mL, 3,12 mmoli) s-au amestecat în DMF (5 mL). Reacția s-a agitat la temperatura camerei timp de 4 ore sub atmosferă de azot. Reacția a

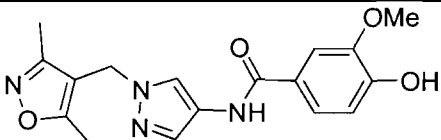
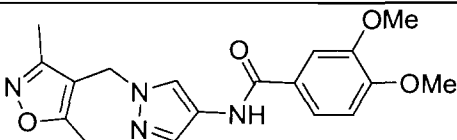
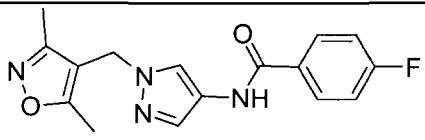
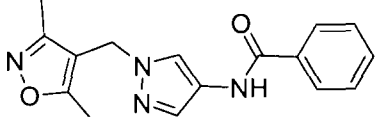
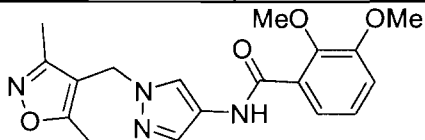
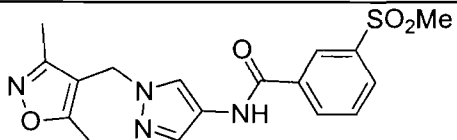
fost diluată cu acetat de etil (4 mL) și s-a spălat cu soluție saturată de NaHCO_3 (2x, 3 mL) și apoi cu soluție saturată de NaCl (3 mL). Stratul organic a fost extras, s-a uscat, și s-a filtrat. Solvenții au fost îndepărtați sub vid. Produsul a fost redizolvat în metanol (4 mL) și s-a purificat prin HPLC. Produsul pur a fost redizolvat în etanol și s-a concentrat sub vid (3 x 3 mL) pentru a da N-(1-((3,5-dimetilizoxazol-4-il)metil)-1H-pirazol-4-il)adamantan sub forma unui solid alb cu 60% randament. ^1H RMN (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). Punct de topire 167-169°C.

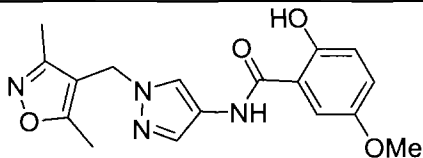
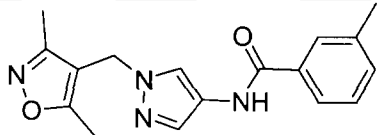
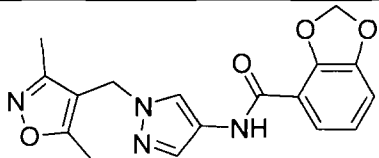
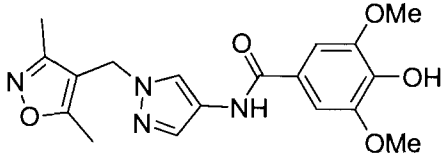
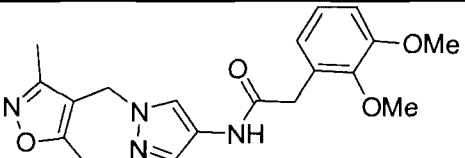
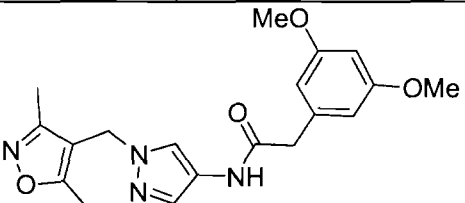
[00332] Compusul avut un IC_{50} pentru receptorul de amar hT2R8 de 0,88 μM

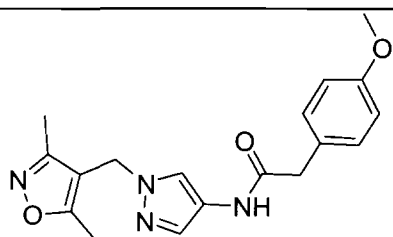
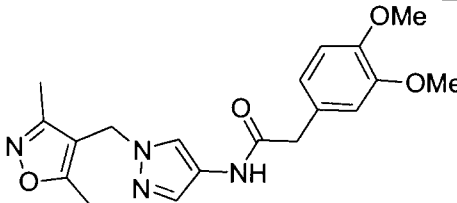
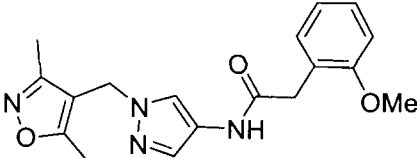
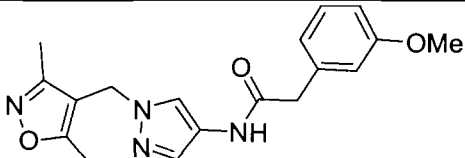
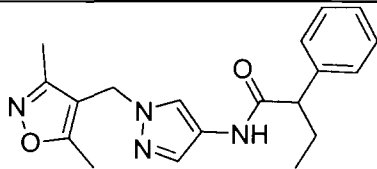
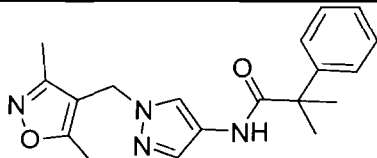
[00333] Alți compuși au fost sintetizați urmând procedee similare celor descrise în exemplele 4-1 până la 4-16 și au fost testați experimental și s-a găsit că au un nivel relativ mare de eficacitate ca inhibitori ai receptorului hT2R8 de amar. Rezultatele acelor testări sunt arătate în Tabelul A.

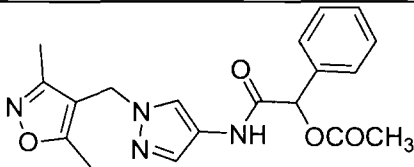
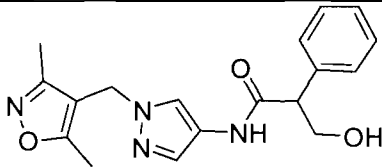
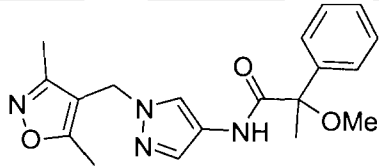
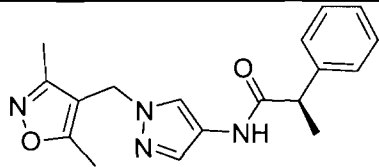
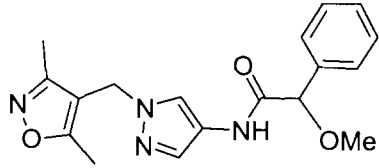
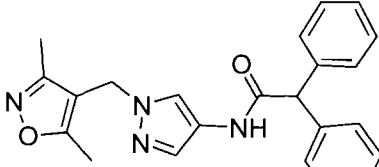
Tabelul A

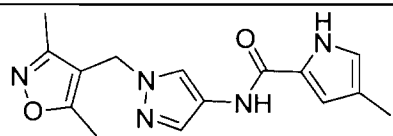
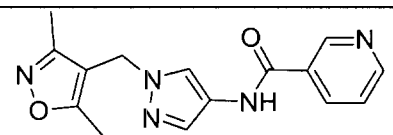
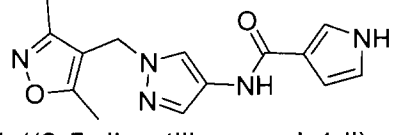
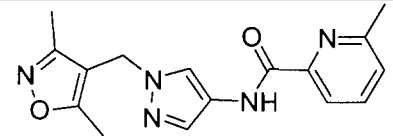
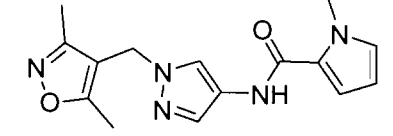
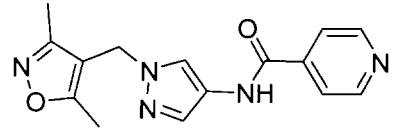
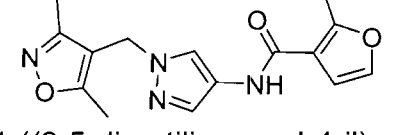
Compus Nr.	Compus	hT2R8 IC_{50} (μM)
4-17	 N-(1-((3,5-dimetilizoxazol-4-il)metil)-1H-pirazol-4-il)-4-metoxibenzamidă	0,26
4-18	 N-(1-((3,5-dimetilizoxazol-4-il)metil)-1H-pirazol-4-il)-3,5-dimetoxibenzamidă	0,28
4-19	 N-(1-((3,5-dimetilizoxazol-4-il)metil)-1H-pirazol-4-il)-2-metoxibenzamidă	0,39

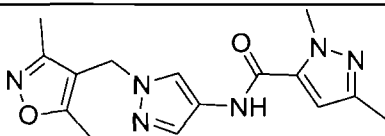
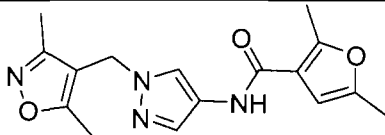
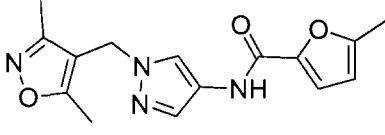
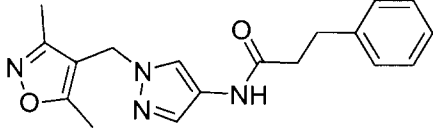
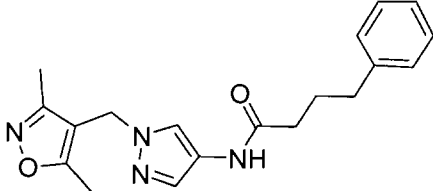
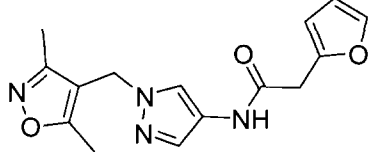
Compus Nr.	Compus	hT2R8 IC ₅₀ (μM)
4-20	 N-(1-((3,5-dimetilizoxazol-4-il)metil)-1H-pirazol-4-il)-4-hidroxi-3-metoxibenzamidă	0,48
4-21	 N-(1-((3,5-dimetilizoxazol-4-il)metil)-1H-pirazol-4-il)-3,4-dimetoxibenzamidă	0,56
4-23	 N-(1-((3,5-dimetilizoxazol-4-il)metil)-1H-pirazol-4-il)-4-fluorbenzamidă	1,56
4-24	 N-(1-((3,5-dimetilizoxazol-4-il)metil)-1H-pirazol-4-il)benzamidă	2,62
4-25	 N-(1-((3,5-dimetilizoxazol-4-il)metil)-1H-pirazol-4-il)-2,3-dimetoxibenzamidă	0,61
4-26	 N-(1-((3,5-dimetilizoxazol-4-il)metil)-1H-pirazol-4-il)-3-(metilsulfonil)benzamidă	0,72

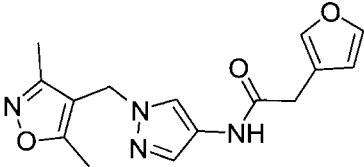
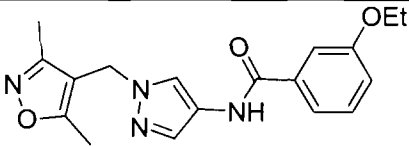
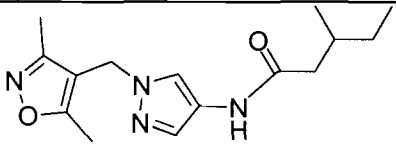
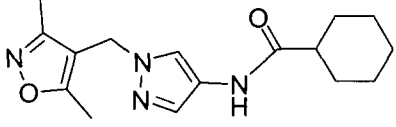
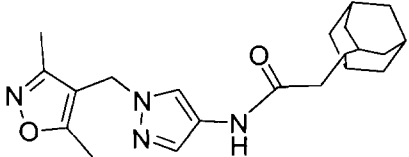
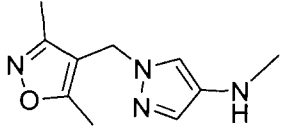
Compus Nr.	Compus	hT2R8 IC ₅₀ (μM)
4-27	 N-(1-((3,5-dimetilizoxazol-4-il)metil)-1H-pirazol-4-il)-2-hidroxi-5-metoxibenzamidă	0,98
4-28	 N-(1-((3,5-dimetilizoxazol-4-il)metil)-1H-pirazol-4-il)-3-metilbenzamidă	0,57
4-29	 N-(1-((3,5-dimetilizoxazol-4-il)metil)-1H-pirazol-4-il)-2-metoxibenzamidă	0,30
4-30	 N-(1-((3,5-dimetilizoxazol-4-il)metil)-1H-pirazol-4-il)-2-metoxibenzamidă	0,39
4-31	 2-(2,3-dimetoxifenil)-N-(1-((3,5-dimetilizoxazol-4-il)metil)-1H-pirazol-4-il)acetamidă	0,80
4-32	 2-(3,5-dimetoxifenil)-N-(1-((3,5-dimetilizoxazol-4-il)metil)-1H-pirazol-4-il)acetamidă	0,96

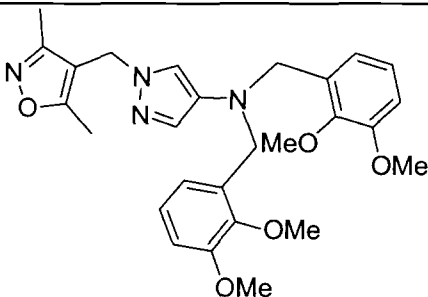
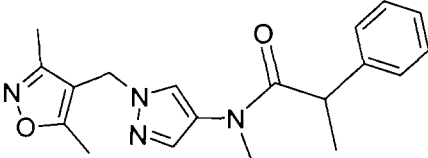
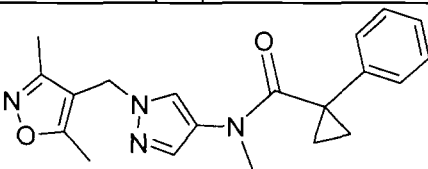
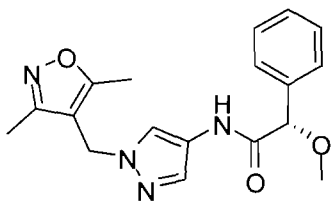
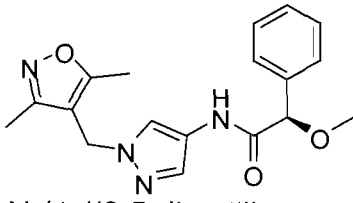
Compus Nr.	Compus	hT2R8 IC ₅₀ (μM)
4-33	 N-(1-((3,5-dimetilizoxazol-4-il)metil)-1H-pirazol-4-il)-2-(4-metoxifenil)acetamidă	0,99
4-34	 N-(1-((3,5-dimetilizoxazol-4-il)metil)-1H-pirazol-4-il)-2-metoxibenzamidă	1,11
4-35	 N-(1-((3,5-dimetilizoxazol-4-il)metil)-1H-pirazol-4-il)-2-(2-metoxifenil)acetamidă	1,16
4-36	 N-(1-((3,5-dimetilizoxazol-4-il)metil)-1H-pirazol-4-il)-2-metoxibenzamidă	1,85
4-37	 N-(1-((3,5-dimetilizoxazol-4-il)metil)-1H-pirazol-4-il)-2-fenilbutanamidă	0,50
4-38	 N-(1-((3,5-dimetilizoxazol-4-il)metil)-1H-pirazol-4-il)-2-metoxibenzamidă	0,53

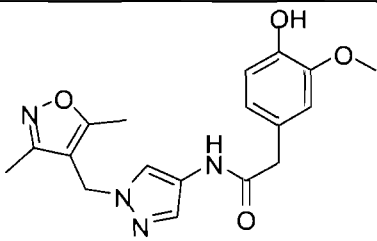
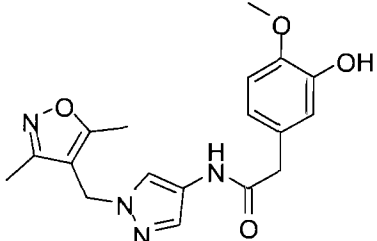
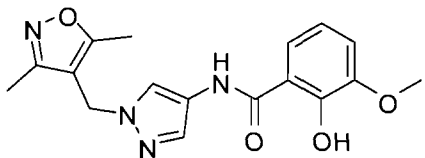
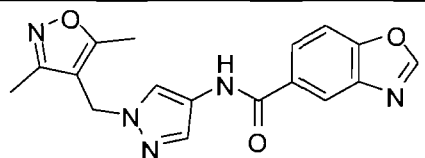
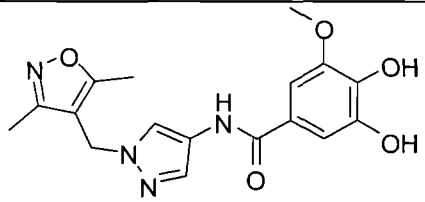
Compus Nr.	Compus	hT2R8 IC ₅₀ (μM)
4-39	 2-(1-((3,5-dimetilizoxazol-4-il)metil)-1H-pirazol-4-ilamino)-2-oxo-1-fenilacetat de etil	0,83
4-40	 N-(1-((3,5-dimetilizoxazol-4-il)metil)-1H-pirazol-4-il)-3-hidroxi-2-fenilpropanamidă	0,96
4-41	 N-(1-((3,5-dimetilizoxazol-4-il)metil)-1H-pirazol-4-il)-2-metoxibenzamidă	2,10
4-42	 (R)-N-(1-((3,5-dimetilizoxazol-4-il)metil)-1H-pirazol-4-il)-2-fenilpropanamidă	3,72
4-43	 N-(1-((3,5-dimetilizoxazol-4-il)metil)-1H-pirazol-4-il)-2-metoxi-2-fenilacetamidă	3,43
4-44	 N-(1-((3,5-dimetilizoxazol-4-il)metil)-1H-pirazol-4-il)-2,2-difenilacetamidă	5,19

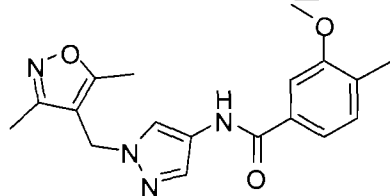
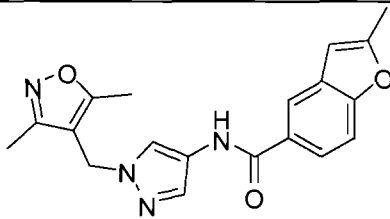
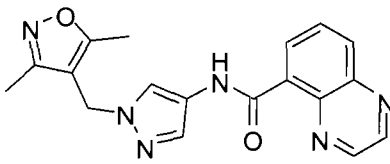
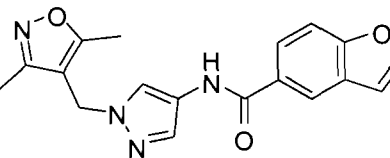
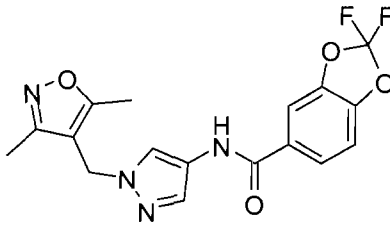
Compus Nr.	Compus	hT2R8 IC ₅₀ (μM)
4-45	 N-(1-((3,5-dimetilizoxazol-4-il)metil)-1H-pirazol-4-il)-4-metil-1H-pyrrole-2-carboxamidă	0,72
4-46	 N-(1-((3,5-dimetilizoxazol-4-il)metil)-1H-pirazol-4-il)nicotinamidă	1,05
4-47	 N-(1-((3,5-dimetilizoxazol-4-il)metil)-1H-pirazol-4-il)-2-metoxibenzamidă	1,35
4-48	 N-(1-((3,5-dimetilizoxazol-4-il)metil)-1H-pirazol-4-il)-6-metilpicolinamidă	1,95
4-49	 N-(1-((3,5-dimetilizoxazol-4-il)metil)-1H-pirazol-4-il)-1-metil-1H-pyrrole-2-carboxamidă	3,40
4-50	 N-(1-((3,5-dimetilizoxazol-4-il)metil)-1H-pirazol-4-il)isonicotinamidă	4,59
4-51	 N-(1-((3,5-dimetilizoxazol-4-il)metil)-1H-pirazol-4-il)-2-metilfuran-3-carboxamidă	7,87

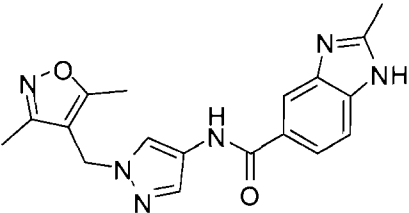
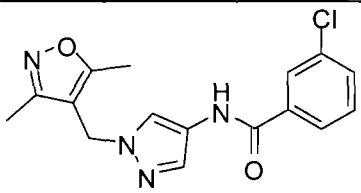
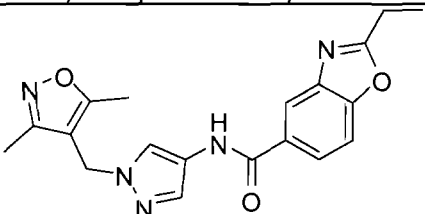
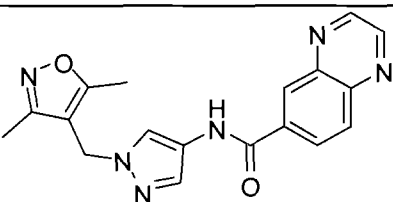
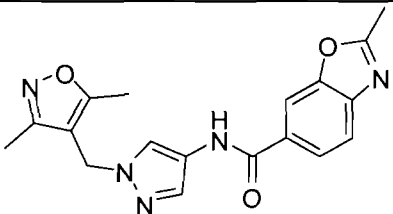
Compus Nr.	Compus	hT2R8 IC ₅₀ (μM)
4-52	 N-(1-((3,5-dimetilizoxazol-4-il)metil)-1H-pirazol-4-il)-1,3-dimetil-1H-pirazol-5-carboxamidă	18,05
4-53	 N-(1-((3,5-dimetilizoxazol-4-il)metil)-1H-pirazol-4-il)-2,5-dimetilfuran-3-carboxamidă	3,03
4-54	 N-(1-((3,5-dimetilizoxazol-4-il)metil)-1H-pirazol-4-il)-5-metilfuran-2-carboxamidă	3,19
4-55	 N-(1-((3,5-dimetilizoxazol-4-il)metil)-1H-pirazol-4-il)-3-fenilpropanamidă	0,49
4-56	 N-(1-((3,5-dimetilizoxazol-4-il)metil)-1H-pirazol-4-il)-4-fenilbutanamidă	0,83
4-57	 N-(1-((3,5-dimetilizoxazol-4-il)metil)-1H-pirazol-4-il)-2-metoxibenzamidă	4,16

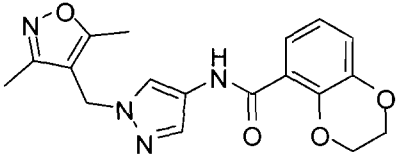
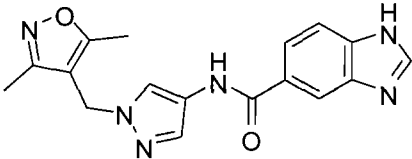
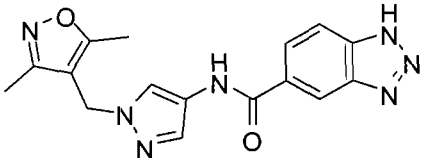
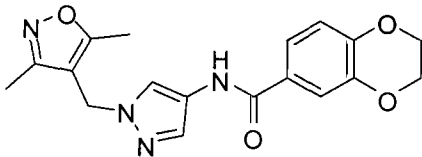
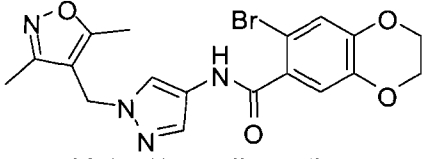
Compus Nr.	Compus	hT2R8 IC ₅₀ (μM)
4-58	 N-(1-((3,5-dimetilizoxazol-4-il)metil)-1H-pirazol-4-il)-2-(furan-3-il)acetamidă	8,66
4-59	 N-(1-((3,5-dimetilizoxazol-4-il)metil)-1H-pirazol-4-il)-3-etoxibenzamidă	0,22
4-60	 N-(1-((3,5-dimetilizoxazol-4-il)metil)-1H-pirazol-4-il)-3-metilpentanamidă	1,94
4-61	 N-(1-((3,5-dimetilizoxazol-4-il)metil)-1H-pirazol-4-il)ciclohexancarboxamidă	2,20
4-62	 N-(1-((3,5-dimetilizoxazol-4-il)metil)-1H-pirazol-4-il)-2-(adamant-1-il)acetamidă	3,77
4-63	 1-((3,5-dimetilizoxazol-4-il)metil)-N-metil-1H-pirazol-4-amină	8,76

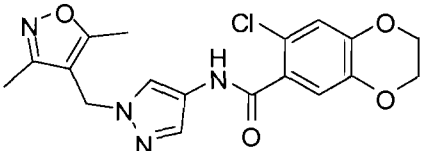
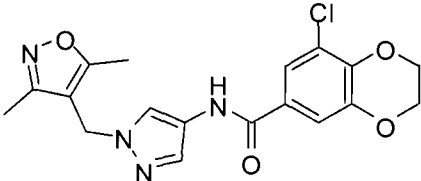
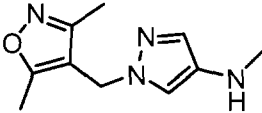
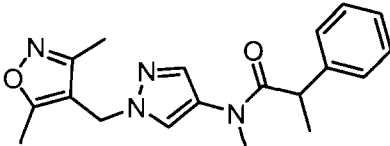
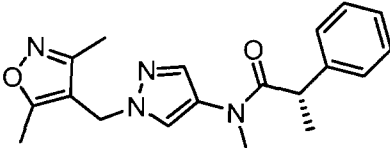
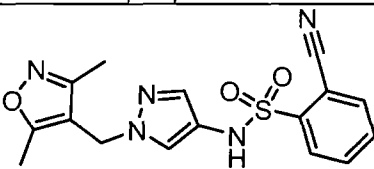
Compus Nr.	Compus	hT2R8 IC ₅₀ (μM)
4-64	 N,N-bis(2,3-dimetoxibenzil)-1-((3,5-dimetilizoxazol-4-il)metil)-1H-pirazol-4-amină	12,60
4-65	 N-(1-((3,5-dimetilizoxazol-4-il)metil)-1H-pirazol-4-il)-N-metil-2-fenilpropanamidă	2,81
4-66	 N-(1-((3,5-dimetilizoxazol-4-il)metil)-1H-pirazol-4-il)-N-metil-1-fenilciclopropancarboxamidă	8,23
4-67	 (S)-N-(1-((3,5-dimetilizoxazol-4-il)metil)-1H-pirazol-4-il)-2-metoxi-2-fenilacetamidă	8,6
4-68	 (R)-N-(1-((3,5-dimetilizoxazol-4-il)metil)-1H-pirazol-4-il)-2-metoxi-2-fenilacetamidă	5,0

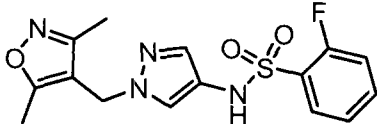
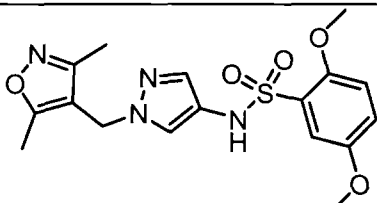
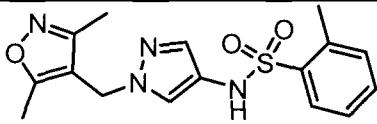
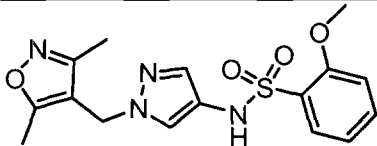
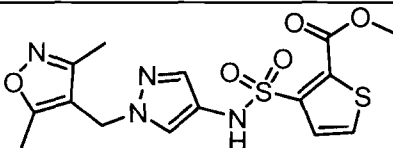
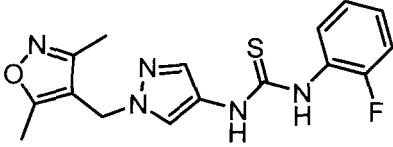
Compus Nr.	Compus	hT2R8 IC ₅₀ (μM)
4-69	 N-(1-((3,5-dimetilizoxazol-4-il)metil)-1H-pirazol-4-il)-2-(4-hidroxi-3-metoxifenil)acetamidă	4,7
4-70	 N-(1-((3,5-dimetilizoxazol-4-il)metil)-1H-pirazol-4-il)-2-(3-hidroxi-4-metoxifenil)acetamidă	3,1
4-71	 N-(1-((3,5-dimetilizoxazol-4-il)metil)-1H-pirazol-4-il)-2-hidroxi-3-metoxibenzamidă	2,9
4-72	 N-(1-((3,5-dimetilizoxazol-4-il)metil)-1H-pirazol-4-il)benzo[d]oxazole-5-carboxamidă	2,6
4-73	 N-(1-((3,5-dimetilizoxazol-4-il)metil)-1H-pirazol-4-il)-3,4-dihidroxi-5-metoxibenzamidă	2,2

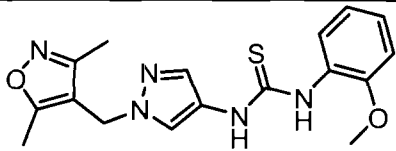
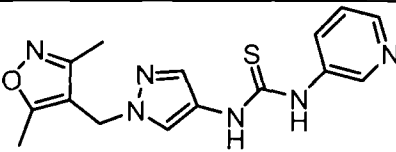
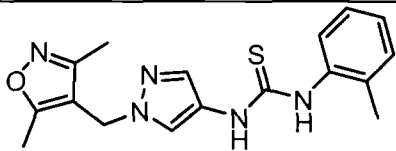
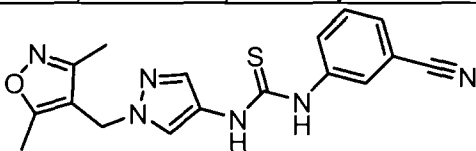
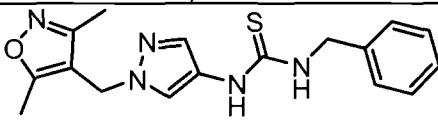
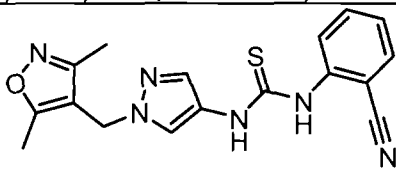
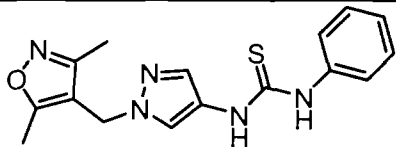
Compus Nr.	Compus	hT2R8 IC ₅₀ (μM)
4-74	 N-(1-((3,5-dimetilizoxazol-4-il)metil)-1H-pirazol-4-il)-3-metoxi-4-metilbenzamidă	2,2
4-75	 N-(1-((3,5-dimetilizoxazol-4-il)metil)-1H-pirazol-4-il)-2-metilbenzofuran-5-carboxamidă	2,1
4-76	 N-(1-((3,5-dimetilizoxazol-4-il)metil)-1H-pirazol-4-il)chinoxalin-5-carboxamidă	1,7
4-77	 N-(1-((3,5-dimetilizoxazol-4-il)metil)-1H-pirazol-4-il)benzofuran-5-carboxamidă	1,4
4-78	 N-(1-((3,5-dimetilizoxazol-4-il)metil)-1H-pirazol-4-il)-2,2-difluorbenzo[d][1,3]dioxol-5-carboxamidă	1,3

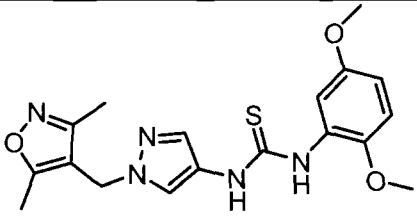
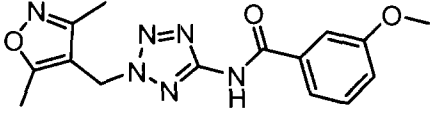
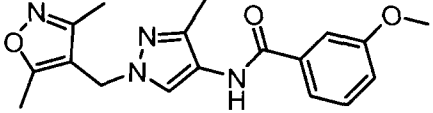
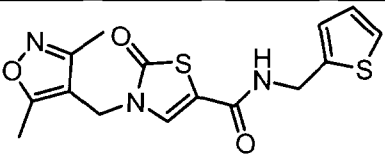
Compus Nr.	Compus	hT2R8 IC ₅₀ (μM)
4-79	 N-(1-((3,5-dimetilizoxazol-4-il)metil)-1H-pirazol-4-il)-2-metil-1H-benzo[d]imidazol-5-carboxamidă	1,0
4-80	 3-clor-N-(1-((3,5-dimetilizoxazol-4-il)metil)-1H-pirazol-4-il)benzamidă	0,9
4-81	 N-(1-((3,5-dimetilizoxazol-4-il)metil)-1H-pirazol-4-il)-2-etilbenzo[d]oxazol-5-carboxamidă	0,8
4-82	 N-(1-((3,5-dimetilizoxazol-4-il)metil)-1H-pirazol-4-il)chinoxalin-6-carboxamidă	0,8
4-83	 N-(1-((3,5-dimetilizoxazol-4-il)metil)-1H-pirazol-4-il)-2-metilbenzo[d]oxazol-6-carboxamidă	0,7

Compus Nr.	Compus	hT2R8 IC ₅₀ (μM)
4-85	 N-(1-((3,5-dimetilizoxazol-4-il)metil)-1H-pirazol-4-il)-1H-benzo[d]imidazol-5-carboxamidă	0,6
4-86	 2-(1H-benzo[d]imidazol-6-yl)-N-(1-((3,5-dimetilizoxazol-4-il)metil)-1H-pirazol-4-il)acetamidă	0,6
4-87	 N-(1-((3,5-dimetilizoxazol-4-il)metil)-1H-pirazol-4-il)-1H-benzo[d][1,2,3]triazol-5-carboxamidă	0,6
4-88	 N-(1-((3,5-dimetilizoxazol-4-il)metil)-1H-pirazol-4-il)-2,3-dihidrobenzo[b][1,4]dioxin-6-carboxamidă	0,4
4-89	 7-brom-N-(1-((3,5-dimetilizoxazol-4-il)metil)-1H-pirazol-4-il)-2,3-dihidrobenzo[b][1,4]dioxin-6-carboxamidă	0,3

Compus Nr.	Compus	hT2R8 IC ₅₀ (μM)
4-90	 7-clor-N-(1-((3,5-dimetilizoxazol-4-il)metil)-1H-pirazol-4-il)-2,3-dihidrobenzo[b][1,4]dioxin-6-carboxamidă	0,1
4-91	 8-clor-N-(1-((3,5-dimetilizoxazol-4-il)metil)-1H-pirazol-4-il)-2,3-dihidrobenzo[b][1,4]dioxin-6-carboxamidă	0,1
4-96	 1-((3,5-dimetilizoxazol-4-il)metil)-N-metil-1H-pirazol-4-amină	8,764
4-97	 N-(1-((3,5-dimetilizoxazol-4-il)metil)-1H-pirazol-4-il)-N-metil-2-fenilpropanamidă	2,126
4-98	 (S)-N-(1-((3,5-dimetilizoxazol-4-il)metil)-1H-pirazol-4-il)-N-metil-2-fenilpropanamidă	2,811
4-99	 2-ciano-N-(1-((3,5-dimetilizoxazol-4-il)metil)-1H-pirazol-4-il)benzensulfonamidă	1,358

Compus Nr.	Compus	hT2R8 IC ₅₀ (μM)
4-100	 N-(1-((3,5-dimetilizoxazol-4-il)metil)-1H-pirazol-4-il)-2-fluorbenzensulfonamidă	8,510
4-101	 N-(1-((3,5-dimetilizoxazol-4-il)metil)-1H-pirazol-4-il)-2,5-dimetoxibenzensulfonamidă	1,631
4-102	 N-(1-((3,5-dimetilizoxazol-4-il)metil)-1H-pirazol-4-il)-2-metilbenzensulfonamidă	2,153
4-103	 N-(1-((3,5-dimetilizoxazol-4-il)metil)-1H-pirazol-4-il)-2-metoxibenzensulfonamidă	3,801
4-104	 metil 3-(N-(1-((3,5-dimetilizoxazol-4-il)metil)-1H-pirazol-4-il)sulfamoi)tiufen-2-carboxilat	1,252
4-105	 1-(1-((3,5-dimetilizoxazol-4-il)metil)-1H-pirazol-4-il)-3-(2-fluorfenil)tiouree	1,629

Compus Nr.	Compus	hT2R8 IC ₅₀ (μM)
4-106	 1-(1-((3,5-dimetilizoxazol-4-il)metil)-1H-pirazol-4-il)-3-(2-metoxifenil)tiouree	2,607
4-107	 1-(1-((3,5-dimetilizoxazol-4-il)metil)-1H-pirazol-4-il)-3-(piridin-3-il)tiouree	2,999
4-108	 1-(1-((3,5-dimetilizoxazol-4-il)metil)-1H-pirazol-4-il)-3-o-tolyłtiouree	3,013
4-109	 1-(3-cianofenil)-3-(1-((3,5-dimetilizoxazol-4-il)metil)-1H-pirazol-4-il)tiouree	0,783
4-110	 1-benzil-3-(1-((3,5-dimetilizoxazol-4-il)metil)-1H-pirazol-4-il)tiouree	1,097
4-111	 1-(2-cianofenil)-3-(1-((3,5-dimetilizoxazol-4-il)metil)-1H-pirazol-4-il)tiouree	2,347
4-112	 1-(1-((3,5-dimetilizoxazol-4-il)metil)-1H-pirazol-4-il)-3-feniltiouree	2,492

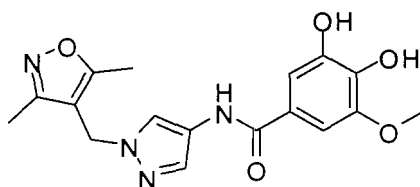
Compus Nr.	Compus	hT2R8 IC ₅₀ (μM)
4-113	 1-(2,5-dimetoxifenil)-3-(1-((3,5-dimetilizoxazol-4-il)metil)-1H-pirazol-4-il)tiouree	5,240
4-114	 N-(2-((3,5-dimetilizoxazol-4-il)metil)-2H-tetrazol-5-il)-3-metoxibenzamidă	1,866
4-115	 N-(1-((3,5-dimetilizoxazol-4-il)metil)-3-metil-1H-pirazol-4-il)-3-metoxibenzamidă	9,248
4-116	 3-((3,5-dimetilizoxazol-4-il)metil)-2-oxo-N-(tiofen-2-ilmetil)-2,3-dihidrotiazol-5-carboxamidă	2,279

Exemplele 4-67 până la 4-91:

[00334] Preparare ca în exemplele 4-73 din clorhidrat de 1-((3,5-dimetilizoxazol-4-il)metil)-1H-pirazol-4-amină (exemplul 4-1a) și acizii lor funcționalizați corespunzător. Caracterizarea a fost făcută prin LCMS unde s-au găsit masele dorite.

Exemplul 4-73: N-(1-((3,5-dimetilizoxazol-4-il)metil)-1H-pirazol-4-il)-3,4-dihidroxi-5-metoxibenzamidă

139

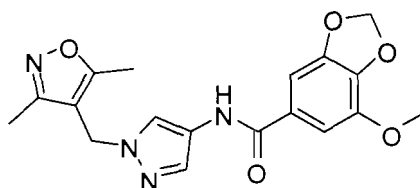


4-73

[00335] Clorhidrat de 1-((3,5-dimetilizoxazol-4-il)metil)-1H-pirazol-4-amină (exemplul 4-1a) (228 mg, 1 mmol), acid 3,4-dihidroxi-5-metoxibenzoic (184 mg, 1 mmol), BtOH (135mg, 1 mmol) și EDC (191mg, 1 mmol) s-au dizolvat în 2 mL DMF într-o fiolă pentru microunde, urmat de adăugarea de trietilamină (101mg, 1 mmol). Reacția a fost plasată într-un reactor cu microunde la 165°C timp de 5 minute. Produsul a fost purificat direct utilizând HPLC Varian (gradient de ACN 10%-95% în H₂O: 25 minute). Frațiile pure au fost combinate și s-au concentrat pentru a da N-(1-((3,5-dimetilizoxazol-4-il)metil)-1H-pirazol-4-il)-3,4-dihidroxi-5-metoxibenzamidă. (280 mg, 70%). LC/MS; [M+H] calculat pentru C₁₇H₁₈N₄O₅; așteptat 359,1; găsit 359,1.

[00336] Compusul avut un IC₅₀ pentru receptorul hT2R8 de amar de 2,2 μM

Exemplul 4-92: N-(1-((3,5-dimetilizoxazol-4-il)metil)-1H-pirazol-4-il)-7-metoxibenzo[d][1,3]dioxol-5-carboxamidă



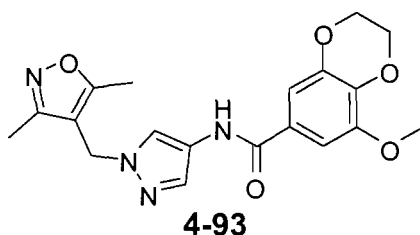
4-92

[00337] N-(1-((3,5-dimetilizoxazol-4-il)metil)-1H-pirazol-4-il)-3,4-dihidroxi-5-metoxibenzamidă (exemplul 73) (50 mg, 0,14 mmol) și carbonat de cesiu (113 mg, 2,5 mmoli) s-au dizolvat în 1 mL acetonă urmat de adăugarea de dibrommetan (239 mg, 1,4 mmol). Reacția a fost plasată într-un reactor cu microunde la 120°C timp de 20 minute. Soluția limpede din reacție fost îndepărtată și s-a evaporat sub vid. Produsul a fost dizolvată în 1 mL etanol și a fost purificat prin HPLC varian (10%-95% ACN în H₂O: gradient de 25 minute). Frațiile pure au fost combinate și s-au concentrat pentru a da N-(1-((3,5-dimetilizoxazol-4-il)metil)-1H-pirazol-4-il)-2-(7-

metoxibenzo[d][1,3]dioxol-5-il)acetamidă. (12 mg, 23%). LC/MS; [M+H] calculat pentru C₁₈H₁₈N₄O₅; așteptat 371,1; găsit 371,1.

[00338] Compusul avut un IC₅₀ pentru receptorul de amar hT2R8 de 0,7 μM

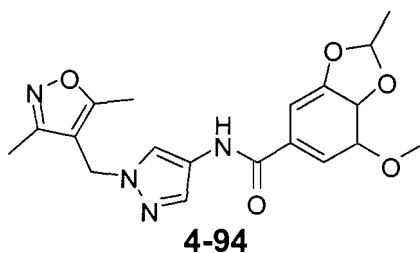
Exemplul 4-93: N-(1-((3,5-dimetilizoxazol-4-il)metil)-1H-pirazol-4-il)-8-metoxi-2,3-dihidrobenzo[b][1,4]dioxin-6-carboxamidă



[00339] Preparată ca în Exemplul 4-92 din N-(1-((3,5-dimetilizoxazol-4-il)metil)-1H-pirazol-4-il)-3,4-dihidroxi-5-metoxibenzamidă (Exemplul 4-73), carbonat de cesiu și dibrometan. Randament 20 %. MS M+H calculat 385,1, găsit 385,1.

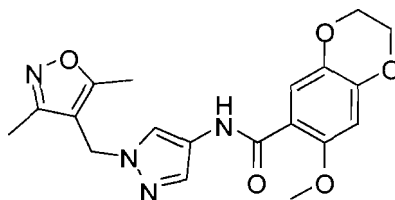
[00340] Compusul avut un IC₅₀ pentru receptorul de amar hT2R8 de 0,7 μM

Exemplul 4-94: N-(1-((3,5-dimetilizoxazol-4-il)metil)-1H-pirazol-4-il)-7-metoxi-2-metilbenzo[d][1,3]dioxole-5-carboxamidă



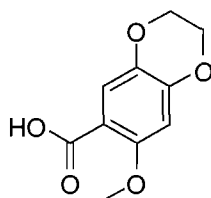
[00341] Preparat ca în Exemplul 4-92 din N-(1-((3,5-dimetilizoxazol-4-il)metil)-1H-pirazol-4-il)-3,4-dihidroxi-5-metoxibenzamidă (Exemplul 4-73), carbonat de cesiu și 1,1-dibrometan. Randament 20 %. MS M+H calculat 385,1, găsit 385,1.

[00342] Compusul avut un IC₅₀ pentru receptorul de amar hT2R8 de 0,7 μM

Exemplul 4-95: N-(1-((3,5-dimetilizoxazol-4-il)metil)-1H-pirazol-4-il)-7-metoksi-2,3-dihidrobenzo[b][1,4]dioxin-6-carboxamidă**4-95**

Preparată ca în Exemplul 4-73 din clorhidrat de 1-((3,5-dimetil- izoxazol-4-il)metil)-1H-pirazol-4-amină (exemplul 4-1a) și acid 7-metoksi-2,3-dihidrobenzo[b][1,4]dioxin-6-carboxilic (exemplul 4-95a). Randament 50 %. MS M+H calculat 385,1, găsit 385,1. ^1H RMN (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).

Compusul avut un IC_{50} pentru receptorul de amar hT2R8 de 0,7 μM

Exemplul 4-95a: Acid 7-metoksi-2,3-dihidrobenzo[b][1,4]dioxin-6-carboxilic

[00343] Într-o fiolă de microunde de 2mL s-au dizolvat în DMF anhidru, 7-brom-2,3-dihidrobenzo[b][1,4]dioxin-6-carboxilat de metil (273 mg, 1 mmol) și CuBr (14,3 mg, 0,1 mmol) și s-au plasat în baie de gheață. În amestecul reacție s-a adăugat în picătură metoxid de sodiu (540 mg, 10 mmoli) în timp ce s-a agitat la 0°C. Reacția a fost încălzită la temperatura camerei și s-a agitat timp de 45 minute. Reacția a fost apoi plasată într-un reactor cu microunde timp de 5 minute la 135°C. Amestecul de reacție a fost dizolvat în apă și s-a spălat cu acetat de etil. Stratul de apă a fost colectat și s-a acidulat la pH 4 cu HCl 1M. Produsul a fost extras utilizând acetat de etil, apoi s-a uscat pe sulfat de sodiu. Solventul a fost evaporat sub vid pentru a da intermediarul acid 7-metoksi-2,3-dihidrobenzo[b][1,4]dioxin-6-carboxilic dorit care a

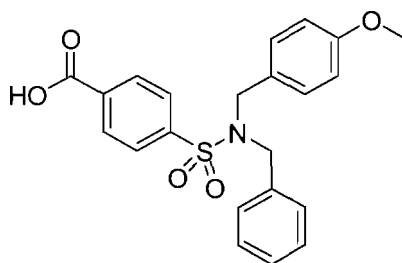
fost utilizat direct, fără altă purificare. Randament 57 %. MS M+H calculat 211,1, găsit 211,1.

Exemplul 5

Antagoniști hT2R14: Obținerea compușilor din invenție

[00344] Următoarele exemple sunt date pentru a ilustra o diversitate de variante exemplificatoare ale invenției și nu se intenționează a fi limitative în niciun fel.

Exemplul 5-1: Acid 4-(N-benzil-N-(4-metoxibenzil)sulfamoil)benzoic



5-1

[00345] 4-(N-Benzil-N-(4-metoxibenzil)sulfamoil)benzoatul de benzil (Exemplul 5-1a) (517mg, 1 mmol) a fost agitat într-o soluție 10/1/2 de NaOH 6N (após)/THF/MeOH (27 mL) la temperatura ambiantă timp de 6 ore. Soluția a fost acidulată cu HCl 3N (após) la pH of ~3 (circa. 50 mL), iar faza apoasă a fost extrasă cu acetat de etil (3x, 75 mL). Extractele organice combinate au fost uscate pe sulfat de sodiu și s-au concentrat pe un evaporator rotativ. Reziduul a fost reluat în MeOH (15 mL) și s-a purificat prin HPLC cu fază inversă (gradient acetonitril 5-95% în H₂O: 25 minute) în trei alicoturi de 5 mL. Frațiile pure au fost combinate și s-au concentrat până la obținerea unui solid alb. Produsul a fost dizolvat în 15 mL de etanol absolut și s-a evaporat pe un evaporator rotativ (4x) pentru a da acid 4-(N-benzil-N-(4-metoxibenzil)sulfamoil)benzoic pur (174 mg, 42%) sub forma unui solid alb. P.t. 161-163°C. ¹H RMN (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] Compusul avut un IC₅₀ pentru receptorul de amar hT2R14 de 0,22 μM

Exemplul 5-1a: 4-(N-benzil-N-(4-metoxibenzil)sulfamoil)benzoat de benzil

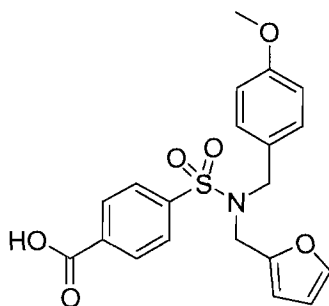
[00347] Acid 4-(N-(4-metoxibenzil)sulfamoil)benzoic (Exemplul 5-1b) (450, mg, 1,4 mmol), bromură de benzil (770 mg, 4,5 mmoli), și carbonat de cesiu (1,5g, 4,5 mmoli) în DMF (10 mL) s-au agitat la 80°C timp de 2 ore. Soluția a fost răcită la temperatura camerei, s-a diluat cu H₂O (200 mL) și s-a extras cu acetat de etil (3x, 100 mL). Straturile organice combinate au fost uscate pe sulfat de sodiu, s-au filtrat și s-au concentrat sub vid. Reziduul a fost purificat prin cromatografie pe silicagel (10% acetat de etil în hexani) pentru a da 4-(N-benzil-N-(4-metoxibenzil)sulfamoil)benzoat de benzil (517 mg, 73 %) sub forma unui solid alb. ¹H RMN (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).

Exemplul 5-1b: Acid 4-(N-(4-metoxibenzil)sulfamoil)benzoic

[00348] Acidul 4-(clorsulfonil)benzoic (5 g, 22,7 mmoli) s-a adăugat, în trei porțiuni sub forma unui solid, la o soluție agitată de 4-metoxi benzilamină (6,1 g, 45 mmoli) și trietilamină (2,3 g, 22,7 mmoli) în acetonă (100 mL) răcită la 0°C cu o baie de gheață apă, pe o perioadă de 10 minute. Baia de gheață a fost îndepărtată și reacția a fost agitată timp de încă 4 ore. Amestecul de reacție a fost diluat cu o soluție 5% de acetic acid în H₂O (150 mL) și s-a extras cu acetat de etil (3x, 100 mL). Extractele organice combinate au fost uscate pe sulfat de sodiu, s-au filtrat, și s-au concentrat pe un evaporator rotativ. Solidul alb rezultat a fost triturat cu hexani/acetat de etil (9/1) pentru a da acid 4-(N-(4-metoxibenzil)sulfamoil)benzoic (5,1 g, 70 %) sub forma unui solid alb. ¹H RMN (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).

Exemplul 5-2: Acid 4-(N-(furan-2-ilmetil)-N-(4-metoxibenzil)sulfamoil)- benzoic

144



5-2

[00349] 4-(N-(furan-2-ilmetil)-N-(4-metoxibenzil)sulfamoil)benzoatul de 4-metoxibenzil (Exemplul 5-2a) (750 mg, 1,4 mmol) a fost agitat într-un amestec apos 2/2/1 de LiOH 2N /THF/MeOH (45 mL) la temperatura ambiantă timp de 3 ore. Soluția a fost acidulată cu HCl 1N apos la un pH de ~3 (circa. 100 mL) și s-a extras cu acetat de etil (3x, 100 mL). Extractele organice combinate au fost uscate pe sulfat de sodiu și s-au concentrat pe un evaporator rotativ. Reziduul a fost reluat în MeOH (9 mL) și s-a purificat prin HPLC cu fază inversă (gradient ACN 5-95% în H₂O: 40 minute) în trei alicoturi de 3 mL. Frațiile pure au fost combinate și s-au concentrat la un solid alb. Produsul a fost dizolvat în etanol absolut și s-a evaporat (4x, 20 mL) pentru a da acid 4-(N-(furan-2-ilmetil)-N-(4-metoxibenzil)- sulfamoil)benzoic pur (205 mg, 36 %) sub forma unui solid alb. P.t. 151 –152⁰C. ¹H RMN (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] Compusul avut un IC₅₀ pentru receptorul de amar hT2R14 de 0,59 μM

Exemplul 5-2a: 4-(N-(furan-2-ilmetil)-N-(4-metoxibenzil)sulfamoil)benzoat de 4-metoxibenzil:

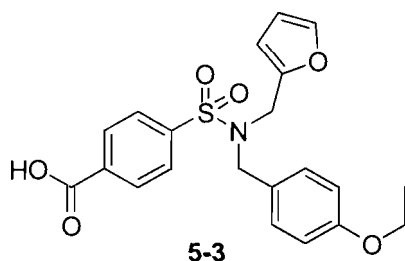
[00351] Acid 4-(N-(furan-2-ilmetil)sulfamoil)benzoic (Exemplul 5-2b) (500 mg, 1,8 mmol), clorură de p-metoxibenzil (624 mg, 4,0 mmoli), și carbonat de cesiu (1,3 g, 4,0 mmoli) s-au dizolvat în DMF (10 mL) și s-au agitat la 80⁰C timp de 1 oră. Amestecul a fost răcit la temperatura ambiantă, s-a diluat cu H₂O (200 mL), și s-a extras cu acetat de etil (3 x 100 mL). Fazele organice combinate au fost uscate pe sulfat de sodiu și s-au concentrat pe un evaporator rotativ. Produsul a fost purificat prin cromatografie pe silicagel (15% acetat de etil în hexani) pentru a da 4-(N-(furan-

2-ilmetil)-N-(4-metoxibenzil)sulfamoil) benzoatul de 4-metoxibenzil (753 mg, 80%) sub forma unui ulei limpede. ^1H RMN (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).

Exemplul 5-2b: Acid 4-(N-(furan-2-ilmetil)sulfamoil)benzoic:

[00352] Acidul 4-(clorsulfonil)benzoic (5,0 g, 22,7 mmoli) s-a adăugat în trei porțiuni pe o perioadă de 10 minute la o soluție agitată de furfuril amină (6,6 g, 68 mmoli) în acetonă (200 mL) răcită la 0°C cu o baie de gheață apă. După ce adăugarea clorurii de sulfonil a fost completă, baia de gheață a fost îndepărtată și soluția a fost agitată timp de 1 oră la temperatura ambiantă. Amestecul a fost concentrat și a fost supus cromatografiei pe silicagel (90% acetat de etil, 8% hexani și 2% acid acetic) pentru a da acid 4-(N-(furan-2-ilmetil)sulfamoil)benzoic (4,4 g, 68%) sub forma unui solid alb. ^1H RMN (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).

Exemplul 5-3: acid 4-(N-(4-etoxibenzil)-N-(furan-2-ilmetil)sulfamoil)benzoic



[00353] 4-ciano-N-(4-etoxibenzil)-N-(furan-2-ilmetil)benzensulfonamida (Exemplul 5-3a) (300 mg, 0,8 mmol) s-a supus agitării într-un amestec 1/1 de dioxan/ NaOH apos 1,5 N (100 mL) la 80°C timp de 16 ore. Amestecul a fost răcit, s-a acidulat cu HCl apos 1N (100 mL), și s-a extras cu acetat de etil (3x, 75 mL). Extractele organice combinate au fost uscate pe sulfat de sodiu, s-au filtrat și s-au concentrat pe un evaporator rotativ. Solidul a fost triturat cu acetat de etil/hexani (~1/9) și s-a colectat prin filtrare pentru a da acid 4-(N-(4-etoxibenzil)-N-(furan-2-ilmetil)sulfamoil)benzoic (250 mg, 69 %) sub forma unui solid alb. RMN (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] Compusul avut un IC_{50} pentru receptorul de amar hT2R14 de 3,0 μ M

Exemplul 5-3a : 4-ciano-N-(4-etoxibenzil)-N-(furan-2-ilmetil)

benzensulfon- amidă

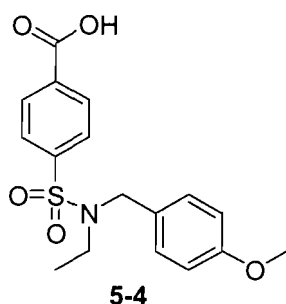
[00355] Clorura de 4-cianobenzen-1-sulfonil (600 mg, 2,9 mmoli) s-a adăugat la o soluție agitată de N-(4-etoxibenzil)-1-(furan-2-il)metanamină (Exemplul 5-3b) (685 mg, 2,9 mmoli) și trietilamină (455 mg, 4,5 mmoli) în DCM (100 mL) și reacția a fost agitată timp de 2 ore. Reacția a fost diluată cu H_2O (200mL) și s-a extras cu DCM (3x, 75 mL). Extractele organice combinate au fost uscate pe sulfat de sodiu, s-au filtrat și s-au concentrat pe un evaporator rotativ. Reziduul a fost purificat prin cromatografie pe silicagel (10% acetat de etil în hexani) pentru a da 4-ciano-N-(4-etoxibenzil)-N-(furan-2-ilmetil) benzensulfonamidă (665 mg, 68 %) sub forma unui solid aproape alb. RMN ($DMSO-d_6$, 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).

Exemplul 5-3b : 4 N-(4-etoxibenzil)-1-(furan-2-il)metanamină

[00356] 4-Etoxibenzaldehida (5 g, 33 mmoli) și furfurilamina (4,2 g, 43 mmoli) într-un amestec de metanol (50 mL), trimetilortoformiat (10 mL) și AcOH (1 mL) s-au agitat la temperatura camerei, sub atmosferă de azot timp de 16 ore. S-a adăugat borohidru de sodiu (1,4 g, 35 mmoli), în 4 porțiuni, pe o perioadă de 30 minute (reacție exotermă). Reacția a fost agitată timp de încă 2 ore la temperatura camerei. Solventul a fost îndepărtat sub vid și reziduul a fost reluat în acetat de etil (150 mL). Faza organică a fost spălată cu H_2O (200 mL) și faza apoasă a fost reextrasă cu acetat de etil (2x, 100 mL). Straturile organice combinate au fost concentrate și reziduul a fost purificat pe silicagel (70% acetat de etil în hexani cu ~0,5 % trietilamină) pentru a da N-(4-etoxibenzil)-1-(furan-2-il)metanamină (6,1 g, 80 %) sub forma unui ulei limpede. RMN ($CDCl_3$, 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).

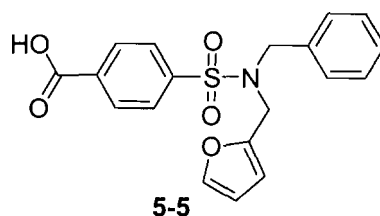
Exemplul 5-4: Acid 4-(N-etil-N-(4-metoxibenzil)sulfamoil)benzoic



[00357] Acid 4-(N-(4-metoxibenzil)sulfamoil)benzoic (Exemplul 5-1b) (160 mg, 0,5 mmol) și carbonat de cesiu (325 mg, 1 mmol) s-au plasat într-o fiolă de microunde și s-au dizolvat în 2 mL DMF. În amestecul de reacție s-a adăugat iodură de etil (155 mg, 1 mmol). Reacția a fost plasată într-un reactor cu microunde și s-a încălzit la 165 °C timp de 5 minute. Amestecul de reacție a fost dizolvat în acetat de etil și s-a spălat cu apă. Stratul organic a fost uscat pe sulfat de sodiu și s-a evaporat sub vid. Produsul a fost dizolvat în soluție 4/1 de NaOH 6N (apos)/tetrahidrofuran (3 mL) și s-a agitat la temperatura ambiantă timp de 6 ore. Soluția a fost acidulată cu HCl 3N (apos) la un pH de ~3 și produsul a fost extras cu acetat de etil (3x, 75 mL). Extractele organice combinate au fost uscate pe sulfat de sodiu și s-au concentrat sub vid. Reziduul a fost reluat în metanol (3 mL) și s-a purificat prin HPLC cu fază inversă (5-95 % acetonitril în H₂O gradient: 25 minute). S-a aflat că compusul inhibă hT2R14 cu IC₅₀ de 20 μM. Randament 35%. MS M+H calculat 350,11, găsit 350,0.

[00358] Compusul a avut un IC₅₀ pentru receptorul hT2R14 de amar de 10 μM.

Exemplul 5-5: Acid 4-(N-benzil-N-(furan-2-ilmetil)sulfamoil)benzoic

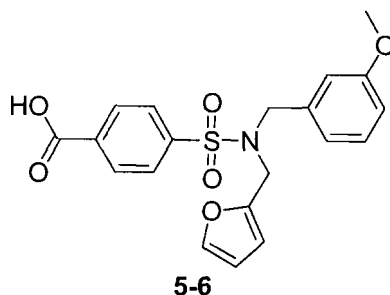


[00359] Acid 4-(N-(furan-2-ilmetil)sulfamoil)benzoic (Exemplul 5-2b) (140 mg, 0,5 mmol) și carbonat de cesiu (325 mg, 1 mmol) s-au plasat într-o fiolă de microunde și

s-au dizolvat în 2 mL DMF. În amestecul de reacție s-a adăugat (brommetil)benzen (170 mg, 1 mmol). Reacția a fost plasată într-un reactor cu microunde și s-a încălzit la 165°C timp de 5 minute. Amestecul de reacție a fost dizolvat în acetat de etil și s-a spălat cu apă. Stratul organic a fost uscat pe sulfat de sodiu și s-a evaporat sub vid. Produsul a fost dizolvat într-o soluție 4/1 de NaOH 6N (apos)/tetrahidrofuran (3 mL) și s-a agitat la temperatura ambiantă timp de 6 ore. Soluția a fost acidulată cu HCl 3N (apos) la un pH de ~3 și produsul a fost extras cu acetat de etil (3x, 75 mL). Extractele organice combinate au fost uscate pe sulfat de sodiu și s-au concentrat sub vid. Reziduul a fost reluat în metanol (3 mL) și s-a purificat prin HPLC cu fază inversă (5-95 % acetonitril în H₂O gradient: 25 minute). Randament 35 %. MS M+H calculat 372,4, găsit 372,0.

[00360] Compusul a avut un IC₅₀ pentru receptorul hT2R14 de amar de 4,6 μM

Exemplul 5-6: Acid 4-(N-(furan-2-ilmetil)-N-(3-metoxibenzil)sulfamoil)benzoic

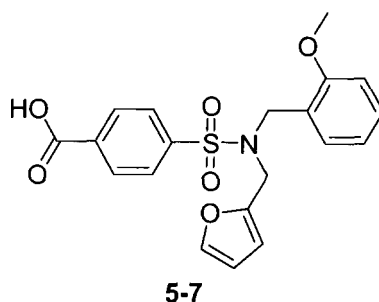


[00361] Preparat ca în Exemplul 5-5 din 1-(brommetil)-3-metoxibenzen și acid 4-(N-(furan-2-ilmetil)sulfamoil)benzoic (Exemplul 5-2b). Randament 35 %. MS M+H calculat 402,3, găsit 402,0.

[00362] Compusul a avut un IC₅₀ pentru receptorul hT2R14 de amar de 10 μM

Exemplul 5-7: Acid 4-(N-(furan-2-ilmetil)-N-(2-metoxibenzil)sulfamoil)benzoic

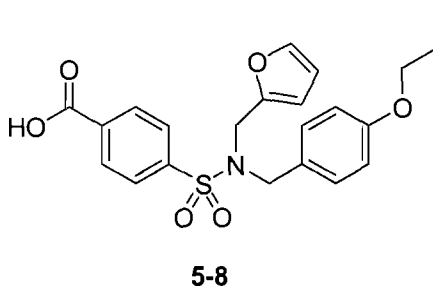
149



[00363] Preparat ca în Exemplul 5-5 din 1-(brommetil)-2-metoxibenzen și acid 4-(N-(furan-2-ilmetil)sulfamoil)benzoic (Exemplul 5-2b). Randament 35%. MS M+H calculat 402,3, găsit 402,0.

[00364] Compusul a avut un IC_{50} pentru receptorul hT2R14 de amar de 12 μ M

Exemplul 5-8: Acid 4-(N-(4-propoxibenzil)-N-(furan-2-ilmetil)sulfamoil)- benzoic



[00365] 4-ciano-N-(4-propoxibenzil)-N-(furan-2-ilmetil)benzensulfonamidă (Exemplul 5-8a) (300 mg, 0,8 mmol) a fost agitată într-un amestec 1/1 de dioxan/ NaOH apos 1,5 N (100 mL) la 80°C timp de 16 ore. Amestecul a fost răcit, s-a acidulat cu HCl apos 1N (100 mL) și s-a extras cu acetat de etil (3x, 75 mL). Extractele organice combinate au fost uscate pe sulfat de sodiu, s-au filtrat, și s-au concentrat pe un evaporator rotativ. Solidul a fost triturat cu acetat de etil/hexani (~1/9) și s-a colectat prin filtrare pentru a da acid 4-(N-(4-propoxibenzil)-N-(furan-2-ilmetil)sulfamoil)benzoic (165 mg, 63 %) sub forma unui solid alb. RMN (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] Compusul a avut un IC_{50} pentru receptorul hT2R14 de amar de 2,5 μ M

Exemplul 5-8a : 4-ciano-N-(4-propoxibenzil)-N-(furan-2-ilmetil)benzen-sulfonamidă:

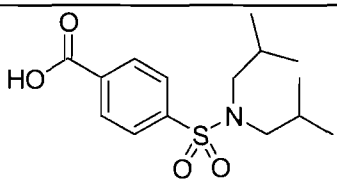
[00367] La o soluție agitată de N-(4-propoxibenzil)-1-(furan-2-il)metanamină (Exemplul 5-8b) (685 mg, 2,9 mmoli) și trietilamină (455 mg, 4,5 mmoli) în DCM (100 mL) s-a adăugat clorură de 4-cianobenzen-1-sulfonil (600 mg, 2,9 mmol) și reacția a fost agitată timp de 2 ore. Reacția a fost diluată cu H₂O (200 mL) și s-a extras cu DCM (3x, 75 mL). Extractele organice combinate au fost uscate pe sulfat de sodiu, s-au filtrat, și s-au concentrat pe un evaporator rotativ. Reziduul a fost purificat prin cromatografie pe silicagel (10% acetat de etil în hexani) pentru a da 4-ciano-N-(4-propoxibenzil)-N-(furan-2-ilmetil)benzensulfonamidă (500 mg, 50 %) sub forma unui solid aproape alb. RMN (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).

Exemplul 5-8b : 4 N-(4-propoxibenzil)-1-(furan-2-il)metanamină:

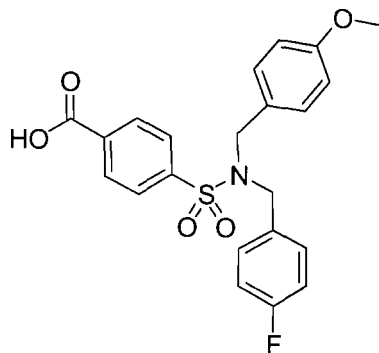
[00368] 4-Propoxibenzaldehidă (5 g, 31 mmoli) și furfurilamină (3,9 g, 40 mmoli) într-un amestec de metanol (50 mL), trimetilortoformiat (10 mL) și AcOH (~1 mL) s-au agitat la temperatura camerei, sub o atmosferă de azot timp de 16 ore. S-a adăugat borohidru de sodiu (1,4 g, 35 mmoli) în 4 porții, pe o perioadă de 30 minute (reacție exotermă). Reacția a fost agitată timp de încă 2 ore la temperatura camerei. Solventul a fost îndepărtat pe un evaporator rotativ și reziduul a fost reluat în acetat de etil (150 mL). Faza organică a fost spălată cu H₂O (200 mL) și faza apoasă a fost reextrasă cu acetat de etil (2x, 100 mL). Straturile organice combinate au fost concentrate și reziduul a fost purificat pe silicagel (70 % acetat de etil în hexani cu ~2% trietilamină) pentru a da N-(4-propoxibenzil)-1-(furan-2-il)metanamină (5,3 g, 75 %) sub forma unui ulei galben. RMN (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] Au fost testați experimental compuși suplimentari și s-a găsit că au un nivel relativ mare de eficacitate ca inhibitori ai receptorului hT2R14 de amar. Rezultatele acelor testări sunt arătate mai jos în Tabelul B.

Tabelul B

Compus No.	Compus	hT2R14 IC ₅₀ (μM)
5-9	 acid 4-(N,N-diizobutilsulfamoil)benzoic	15

Exemplul 5-10: Acid 4-(N-(4-fluorbenzil)-N-(4-metoxibenzil)sulfamoil)benzoic



[00370] 4-(N-(4-fluorbenzil)-N-(4-metoxibenzil)sulfamoyl)benzoat de metil (Exemplul 5-10a) (3,7 g, 8,3 mmoli) a fost dizolvat în MeOH/THF (1:1,5, 30 mL) și a fost tratat cu NaOH apos (3 N, 15 mL). Amestecul a fost agitat la temperatura ambiantă peste noapte, apoi MeOH și THF s-au îndepărtat în vid. Soluția apoasă rezultată a fost acidulată cu HCl apos 6 N la un pH de ~3 și s-a extras cu AcOEt (3 x 40 mL). Straturile organice combinate au fost spălate cu apă și saramură, s-au uscat pe Na₂SO₄ și s-au concentrat. Produsul a fost purificat prin recristalizare din EtOH pentru a da acid 4-(N-(4-fluorbenzil)-N-(4-metoxibenzil)sulfamoyl)benzoic pur sub forma unui solid alb cristalin (2,1 g, 58,6%). MS (M-H, 428,1); ¹H RMN (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). Compusul a avut un IC₅₀ pentru receptor hT2R14 de amar de 1,97 μ M.

Exemplul 5-10a: 4-(N-(4-fluorbenzil)-N-(4-metoxibenzil)sulfamoil)-benzoat de metil

[00371] 4-(N-(4-metoxibenzil)sulfamoil)benzoat de metil (Exemplul 5-10b) (4,3 g, 12,8 mmoli) a fost dizolvat în acetonă (70 mL). S-au adăugat carbonat de cesiu (8,57g, 25,6 mmoli) și bromură de 4-fluorbenzil (1,76 mL, 14,08 mmoli) și amestecul a fost agitat la temperatura camerei peste noapte. Sărurile anorganice au fost îndepărtate prin filtrare și acetona a fost îndepărtată la vid. Reziduul a fost redizolvat în acetat de etil, s-a spălat cu apă și saramură, apoi stratul organic a fost uscat pe sulfat de magneziu și s-a concentrat. Produsul a fost purificat prin recristalizare cu acetat de etil/hexani pentru a da 4-(N-(4-fluorbenzil)-N-(4-metoxibenzil)sulfamoil)benzoat de metil pur (3,7 g, 65 %) sub forma unui solid alb. ¹H RMN (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).

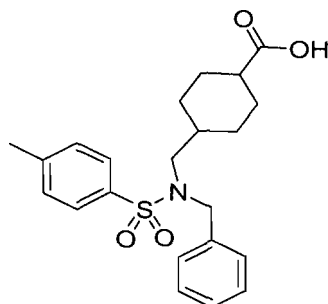
Exemplul 5-10b: 4-(N-(4-metoxibenzil)sulfamoil)benzoat de metil.

[00372] La o soluție de 4-(clorsulfonil)benzoat de metil (Exemplul 5-10c) (4 g, 17,09 mmoli) în diclormetan (40 mL) la 0°C într-o baie de gheață, s-a adăugat (4-metoxifenil)metanamină (2,56 mL, 19,65 mmoli) și trietilamină (2,38 mL, 17,1 mmoli). Baia de gheață a fost apoi îndepărtată și amestecul a fost lăsat să se încălzească la temperatura ambiantă cu agitare timp de încă 2 ore. După terminare (monitorizată prin TLC 40 % acetat de etil/hexani), solventul a fost îndepărtat în vid. Reziduul a fost redizolvat în acetat de etil (200 mL), s-a spălat cu HCl 1N (apos, 20 mL), apă (20 mL) și saramură (20 mL) apoi s-a uscat pe sulfat de magneziu. Soluția a fost concentrată și produsul a fost purificat prin recristalizare cu acetat de etil/hexani fierbinte pentru a da 4-(N-(4-metoxibenzil)sulfamoil)benzoat de metil pur (4,3 g, 74,8 %) sub forma unui solid alb. ¹H RMN (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).

Exemplul 5-10c: 4-(clorsulfonil)benzoat de metil

[00373] Acid 4-clorsulfonil benzoic (5 g, 23 mmoli) și clorură de tionil (20 mL) în dicloretan (10 mL) s-au încălzit la 80°C timp de 2 h. Amestecul de reacție a fost concentrat prin evaporare rotativă pentru a da un solid brun. Solidul a fost răcit pe gheață timp de 5 minute și s-a adăugat metanol rece gheață (40 mL) cu agitare la 0°C timp de 5 minute. Amestecul de reacție a fost lăsat să se încălzească la temperatura ambiantă și s-a agitat încă 10 minute. Adăugarea de apă rece gheață (40 mL) a condus la obținerea unui solid alb care a fost colectat prin filtrare și uscare sub vid pentru a da 4-(clorsulfonil)benzoat de metil pur (4,5 g, 84 %). ^1H RMN (400MHz, DMSO-d₆): δ , ppm: 3,84 (s, 3H), 7,70 (d, 2H, J=8,4Hz), 7,93 (d, 2H, J=8,4Hz).

Exemplul 5-11: Acid 4-((N-benzil-4-metilfenilsulfonamido)metil)ciclohexancarboxilic



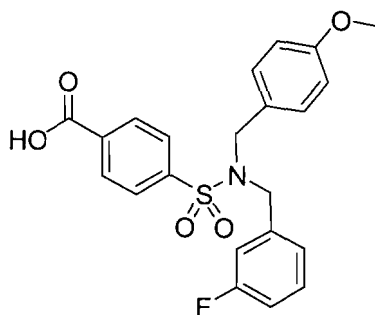
[00374] La suspensia de acid 4-(aminometil)ciclohexancarboxilic (1,57 g, 10 mmoli) în 100 ml de 2,2-dimetoxipropan, s-a adăugat HCl (10 ml, 36% apos). Amestecul a fost agitat la temperatura ambiantă timp de 18 h and apoi a fost concentrat. Reziduul a fost dizolvat într-un volum minim de MeOH și s-a adăugat dietileter pentru a precipita sarea HCl, a 4-(aminometil)ciclohexancarboxilatului de metil sub forma unui solid aproape alb. Acest material a fost utilizat fără altă purificare sau caracterizare.

[00375] La amestecul de sare HCl a 4-(aminometil)ciclohexancarboxilatului de metil (208 mg, 1 mmol) în 5 mL de diclormetan, la 0°C într-o baie de gheață, s-au adăugat trietilamină (360 μL , 2,58 mmol) și clorură de 4-metilbenzen-1-sulfonil (190 mg, 1 mmol). Baia de gheață a fost lăsată să se încălzească încet la temperatura ambiantă și reacția s-a agitat peste noapte. Solventul a fost îndepărtat în vid. Reziduul a fost redizolvat în acetat de etil (20 mL), s-a spălat cu HCl 1N (5 mL), apă (5 mL) și saramură (5 mL), apoi s-a uscat pe sulfat de magneziu și s-a concentrat. Acest

produs brut (162mg, 0,5mmol) a fost redizolvat în acetonă (5mL) și s-a tratat cu carbonat de potasiu (110 mg, 0,79 mmol) și (4-fluorfenil)metanamină (1,76 mL, 14,08 mmoli). Amestecul a fost agitat într-un vas de presiune la 80°C peste noapte, apoi s-a răcit și sărurile anorganice au fost îndepărtate prin filtrare. Acetona a fost îndepărtată în vid și reziduul a fost redizolvat în acetat de etil și s-a spălat cu apă urmată de saramură. Stratul organic a fost uscat pe sulfat de magneziu și s-a concentrat. Produsul (162 mg, 0,4 mmol) a fost dizolvat în MeOH/THF (1:1,5, 10 mL) și s-a tratat cu NaOH apos (10N, 400 uL). Amestecul a fost agitat la 100°C timp de 20 minute în microunde, și apoi MeOH și THF s-au îndepărtat în vid. Reziduul a fost acidulat cu HCl apos 6 N la un pH de ~3 și s-a extras cu AcOEt; straturile organice combinate au fost spălate cu apă și saramură, s-au uscat pe Na₂SO₄ și s-au concentrat. Produsul a fost purificat prin recristalizare din EtOH pentru a da acid 4-((N-benzil-4-metilfenilsulfonamido)metil)ciclohexancarboxilic pur sub forma unui solid alb (120mg, 74%). MS (M+H, 402); ¹H RMN (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] Compusul a avut un IC₅₀ pentru receptorul hT2R14 de amar de 0,014 μM.

Exemplul 5-12: 4-(N-(3-fluorbenzil)-N-(4-metoxibenzil)sulfamoil)benzoic acid



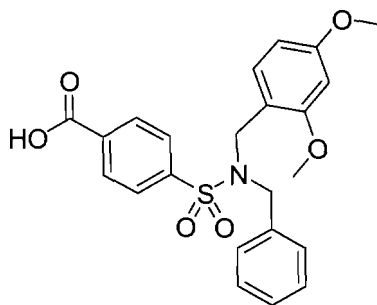
[00377] 4-(N-(4-metoxibenzil)sulfamoil)benzoat de metil (Exemplul 5-10b) (500 mg, 1,49 mmol), bromură de 3-fluorbenzil (280 mg, 2,98 mmoli) și carbonat de cesiu (971 mg, 2,98 mmoli) s-au plasat în DMF (12 mL) și s-au agitat la 90°C timp de 4 ore. Soluția a fost răcită la temperatura ambiantă, s-a diluat cu H₂O (200 mL) și s-a extras cu acetat de etil (3x, 100 mL). Straturile organice combinate s-au uscat pe MgSO₄, s-au filtrat și s-au concentrat sub vid. Reziduul a fost purificat prin cromatografie pe

silicagel (10-20 % acetat de etil în hexan) pentru a da 4-(N-(3-fluorbenzil)-N-(4-metoxibenzil)sulfamoil)benzoat de metil (528 mg, 80 %) sub forma unui solid alb.

[00378] 4-(N-(3-fluorbenzil)-N-(4-metoxibenzil)sulfamoil)benzoat de metil (500 mg, 1,12 mmol) s-a dizolvat în MeOH/THF (1:1, 40 mL) și s-a tratat cu o soluție de NaOH apos (10 N, 8 ml). Amestecul a fost agitat la temperatura ambiantă peste noapte, apoi MeOH și THF s-au îndepărtat prin evaporare rotativă. Soluția apoasă rezultată a fost spălată cu AcOEt (10 mL) și s-a acidulat cu HCl 6 N apos (~15 mL) la pH~4. Soluția apoasă a fost extrasă cu AcOEt (3x, 40 mL) și straturile organice combinate s-au spălat cu apă, saramură, s-au uscat pe MgSO₄ și s-au concentrat. Produsul a fost purificat prin recristalizare din EtOH pentru a da compusul din titlu acid 4-(N-(3-fluorbenzil)-N-(4-metoxibenzil)sulfamoil)benzoic sub forma unui solid alb cristalin (150 mg) cu randament 30 %.

[00379] MS (M-H, 428,1); ¹H RMN (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).

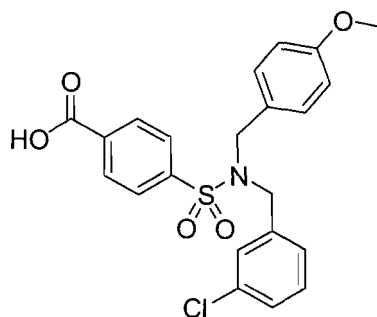
Exemplul 5-13: Acid 4-(N-benzil-N-(2,4-dimetoxibenzil)sulfamoil)benzoic



[00380] Preparat ca în exemplul 5-10 din (2,4-dimetoxifenil)metanamină, 4-(clorsulfonil)benzoat de metil (Exemplul 5-10c) și bromură de benzil. MS (M - H, 440,10); ¹H RMN (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).

Exemplul 5-14: Acid 4-(N-(3-clorbenzil)-N-(4-metoxibenzil)sulfamoil)benzoic

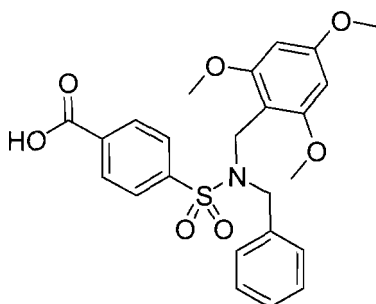
156



[00381] Preparat ca în exemplul 5-10 din 4-(N-(4-metoxibenzil)sulfamoil)benzoat de metil (Exemplul 5-10b) și 1-(brommetil)-3-clorbenzen. MS (M-H, 444,1); ¹H RMN (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] Compusul a avut un IC₅₀ pentru receptorul hT2R14 de amar de 1,88 μM.

Exemplul 5-15: Acid 4-(N-benzil-N-(2,4,6-trimetoxibenzil)sulfamoil)benzoic

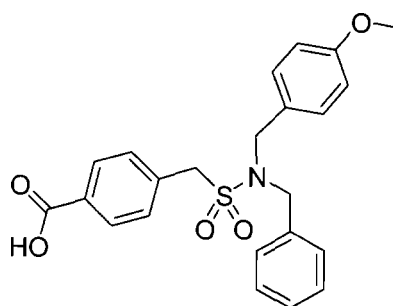


[00383] Preparat ca în exemplul 5-10 din (2,4,6-trimetoxifenil)metanamină, 4-(clorsulfonil)benzoat de metil (Exemplul 5-10c) și bromură de benzil. MS (M - H, 470,10); ¹H RMN (400MHz, DMSO-d₆): δ, ppm: 3,45(s, 6H), 3,69(s, 3H), 4,26(s, 2H), 4,28(s, 2H), 5,98(s, 2H), 7,11-7,26(m, 5H), 7,82(d, J=8,0Hz, 2H), 8,07(d, J = 8 Hz, 2H), 13,49(s, 1H). Analiză elementară (găsit, %): C 61,05; H 5,49; N 2,98; (calculat, %): C61,13; H 5,34 și 2,97

[00384] Compusul a avut un IC₅₀ pentru receptorul hT2R14 de amar de 10,76 μM.

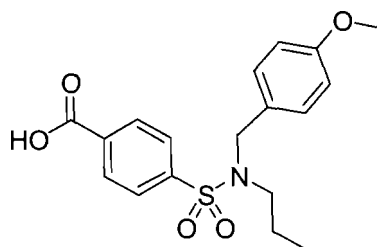
Exemplul 5-16: Acid 4-((N-benzil-N-(4-metoxibenzil)sulfamoil)metil)benzoic

157



[00385] Preparat ca în exemplul 5-10 din 4-(N-(4-metoxibenzil)sulfamoil)- benzoat de metil (Exemplul 5-10b) și bromură de benzil. MS (M-H, 424,1); ¹H RMN (400MHz, DMSO-d6): 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).

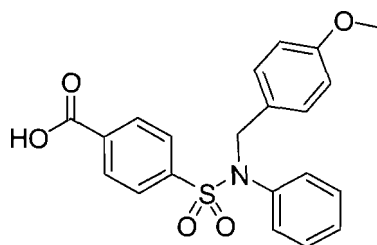
Exemplul 5-17: Acid 4-(N-(4-metoxibenzil)-N-propilsulfamoil)benzoic



[00386] Preparat ca în exemplul 5-10 din 4-(N-(4-metoxibenzil)sulfamoil)- benzoat de metil (Exemplul 5-10b) și bromură de *n*-propil. MS (M-H, 362,1); ¹H RMN (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).

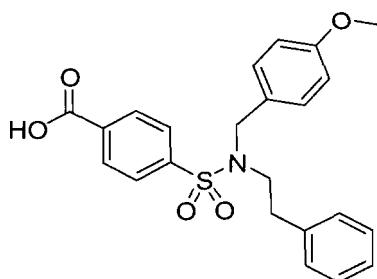
[00387] Compusul a avut un IC₅₀ pentru receptorul hT2R14 de amar de 3,75 μM.

Exemplul 5-18: Acid 4-(N-(4-metoxibenzil)-N-fenilsulfamoil)benzoic



[00388] Preparat ca în exemplul 5-10 din anilină, 4-(clorsulfonil)benzoat de metil (Exemplul 5-10c) și 1-(clormetil)-4-metoxibenzen. MS (M - H, 396,1); ^1H RMN (400MHz, DMSO- d_6): 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).

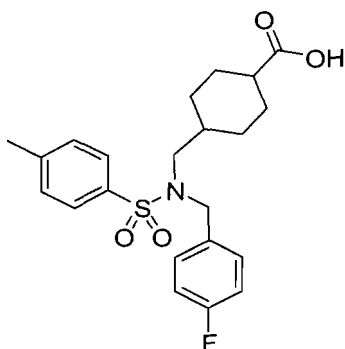
Exemplul 5-19: 4-(N-(4-metoxibenzil)-N-fenetilsulfamoil)benzoic acid



[00389] Preparat ca în exemplul 5-10 din 2-feniletanamină, 4-(clorsulfonil)-benzoat de metil (Exemplul 5-10c) și 1-(clormetil)-4-metoxibenzen. MS (M-H, 424,1); ^1H RMN (400MHz, DMSO- d_6): 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] Compusul a avut un IC_{50} pentru receptorul hT2R14 de amar de 4,58 μM .

Exemplul 5-20: Acid 4-((N-(4-fluorbenzil)-4-metilfenilsulfonamido)metil)-ciclohexan carboxilic

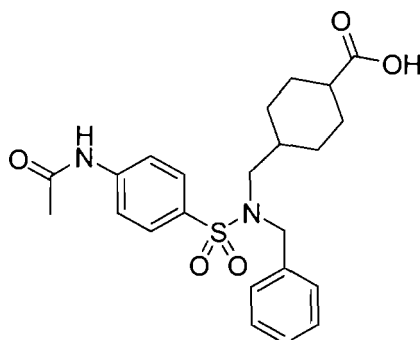


[00391] Preparat ca în exemplul 5-11 din 1-(brommetil)-4-fluorbenzen, acid 4-(aminometil)ciclohexancarboxilic și clorură de 4-metilbenzen-1-sulfonil. MS (M+H, 420); ^1H RMN (400MHz, DMSO- d_6): δ , ppm: 0,71 (m, 2H), 0,95 (m, 2H), 1,15 (br, s,

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] Compusul a avut un IC_{50} pentru receptorul hT2R14 de amar de 0,083 μ M.

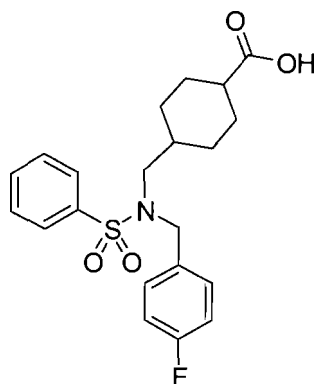
Exemplul 5-21: Acid 4-((4-acetamido-N-benzilfenilsulfonamido)metil)-ciclohexan carboxilic



[00393] A fost preparat ca în Exemplul 5-11 din acetamidobenzen-1-sulfonil clorură, acid 4-(aminometil)ciclohexan carboxilic și bromură de benzil. SM (M+H, 445,2); 1H RMN (400MHz, DMSO- d_6): 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] Compusul a avut un IC_{50} față de receptorul de gust amar hT2R14 de 1,619 μ M.

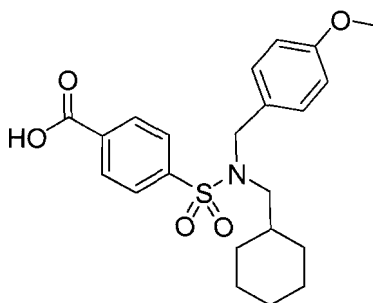
Exemplul 5-22: Acid 4-((N-(4-fluorobenzil)fenilsulfonamido)metil)-ciclohexan carboxilic



[00395] A fost preparat ca în Exemplul 5-11 din benzensulfonil clorură, acid 4-(aminometil)-ciclohexan carboxilic și 1-(bromometil)-4-fluorobenzen. SM (M+ H, 406); ¹H RMN (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] Compusul a avut un IC₅₀ față de receptorul de gust amar hT2R14 de 0,240 μM.

Exemplul 5-23: Acid 4-(N-(ciclohexilmetil)-N-(4-metoxibenzil)sulfamoil)-benzoic

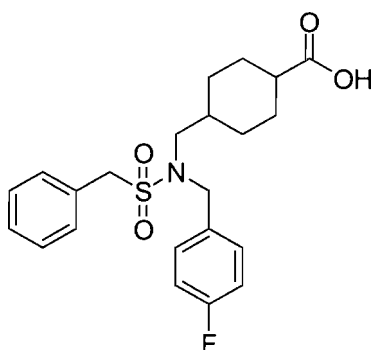


[00397] A fost preparat ca în Exemplul 5-10 din 4-(N-(4-metoxibenzil)sulfamoil)benzoat de metil (Exemplul 5-10b) și ciclohexilmetanamină. SM (M-H, 416,1); ¹H RMN (400MHz, DMSO-d₆): δ, ppm: 0,63 (m, 2H), 0,87 (m, 3H), 0,94 (m, 1H), 1,25-1,52 (m, 5H), 1,70 (m, 2H), 2,86 (m, 2H), 3,70 (s, 3H), 4,22 (s, 2H), 6,84 (m, 2H), 7,16 (m, 2H), 7,91(m, 2H), 7,62(m, 2H), 8,09(m, 2H).

[00398] Compusul a avut un IC₅₀ față de receptorul de gust amar hT2R14 de 3,47 μM.

Exemplul 5-24: Acid 4-((N-(4-fluorobenzil)-1-fenilmetilsulfonamido)metil)-ciclohexan carboxilic

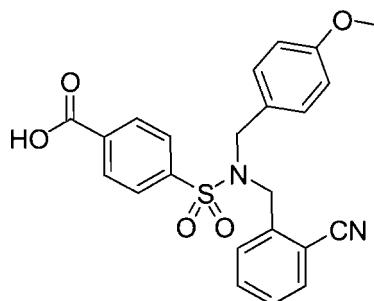
161



[00399] A fost preparat ca în Exemplul 5-10 din fenilmetansulfonil clorură și metil 4-(aminometil)ciclohexancarboxilat și 1-(bromometil)-4-fluorobenzen. MS (M-H, 418); ^1H RMN (400MHz, DMSO- d_6): δ , ppm: 0,639 (m, 2H), 0,897 (m, 2H), 1,034 (m, 1H), 1,467 (d, larg, 2H, J= 11,2Hz), 1,709 (d, larg, 2H, J=11,2Hz), 1,961 (m, 1H), 2,828 (d, 2H, J=7,6Hz), 4,207(s, 2H), 4,449 (s, 2H), 7,155 (t, 2H, J=9,2Hz), 7,377 (m, 7H), 12 (s, larg, 1H)

[00400] Compusul are un IC_{50} față de receptorul de gust amar hT2R14 de 9,57 μM .

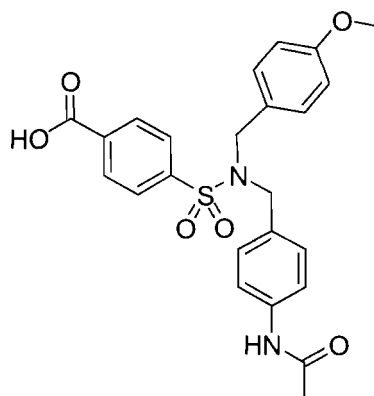
Exemplul 5-25: Acid 4-(N-(2-cianobenzil)-N-(4-metoxibenzil)sulfamoil) benzoic



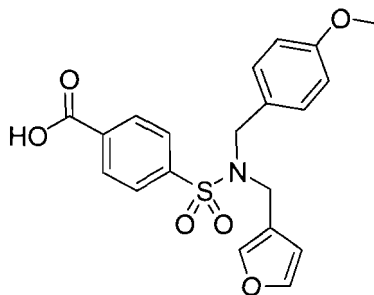
[00401] A fost preparat ca în Exemplul 5-10 din 4-(N-(4-metoxibenzil)sulfamoil)-benzoat de metil (Exemplul 5-10b) și α -bromo-*o*-tolunitril. SM (M-H, 435,1); ^1H RMN (400MHz, DMSO- d_6): δ , ppm: 3,664 (s, 2H), 4,348 (s, 2H), 4,498 (s, 2H), 6,728 (d, 2H, J= 8,4 Hz), 7,036 (d, 2H, j= 8,4 Hz), 7,352 (t, 2H, J=9,2Hz), 7,548 (t, 1H, J=7,6Hz), 7,640 (d, 1H, J= 7,6 Hz), 8,003 (d, 2H, J=8 Hz), 8,139 (d, 2H, J= 8,4Hz), 13,559 (s, larg, 1H).

[00402] Compusul are un IC_{50} față de receptorul de gust amar hT2R14 de 4,61 μM .

Exemplul 5-26: Acid 4-(N-(4-acetamidobenzil)-N-(4-metoxibenzil)sulfamoil)benzoic



[00403] A fost preparat ca în Exemplul 5-10 din 4-(N-(4-metoxibenzil)sulfamoil)benzoat de metil (Exemplul 5-10b) și N-(4-(clormetil)fenil)acetamidă. SM (M-H, 467,1); ^1H RMN (400MHz, DMSO- d_6): δ , ppm: 2,0(s, 3H), 3,69s, 3H), 4,23(s, 4H), 6,78(d, 2H, J=7,6Hz), 6,98(m, 4H), 7,41(d, 2H, J=8Hz), 7,94(d, 2H, J=8Hz), 8,09(d, 2H, J=8Hz), 9,90(s, 1H).

Exemplul 5-27: Acid 4-(N-(furan-3-ilmetil)-N-(4-metoxibenzil)sulfamoil)benzoic

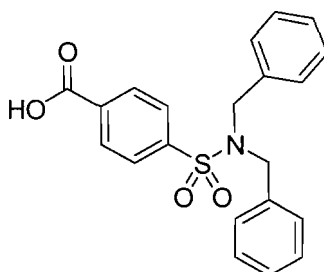
[00404] S-au amestecat 110 mg 1-(furan-3-il)-N-(4-metoxibenzil)metanamină (Exemplul 5-27a) cu metil 4-(clorsulfonil)benzoat (Exemplul 5-10c) (117mg, 0,5mmol) și trietil amină (100uL) în DCM (5mL). Amestecul a fost menținut sub agitare peste noapte la temperatura camerei și concentrat. Reziduul a fost redizolvat în acetat de etil (20 mL), spălat cu soluție HCl 1N (aq., 2mL), urmat de apă (5mL) și saramură (5mL) apoi uscat pe sulfat de magneziu. Produsul brut a fost purificat prin TLC preparativă (amestec 40 % acetat de etil /hexani) pentru a se obține 4-(N-(furan-3-ilmetil)-N-(4-metoxibenzil)sulfamoil)benzoat de metil sub formă de solid alb. Saponificarea ca în exemplul 5-10 a condus la acid 4-(N-(furan-3-ilmetil)-N-(4-metoxibenzil)sulfamoil)benzoic sub formă de solid alb cristalin (68 mg, randament 64 %). SM (M-H, 400,1); ¹H RMN (400MHz, DMSO-d6): 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).

Exemplul 5-27a: 1-(furan-3-il)-N-(4-metoxibenzil)metanamină

[00405] Un amestec de 3-furaldehidă (5 mmol, 437 μL) și (4-metoxifenil)metanamină în MeOH (20 mL) a fost menținut sub agitare la temperatura camerei peste noapte apoi, s-a adăugat lent borohidru de sodiu (300 mg, 7,89 mmol). Amestecul rezultat a fost menținut sub agitare la temperatura camerei timp de 15 minute și răcit brusc cu NaOH (1 N, aq). Metanolul a fost îndepărtat *in vacuo* și șlamul rezultat a fost redizolvat în acetat de etil apoi spălat cu apă, saramură, uscat pe sulfat de sodiu și concentrat. Purificarea prin cromatografie pe silica gel (amestec acetat de etil: Hexani 7:3) a condus la 1-(furan-3-il)-N-(4-metoxibenzil)metanamină sub forma unui ulei. SM (M+H, 218,10); ¹H RMN (400MHz, CDCl3): 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).

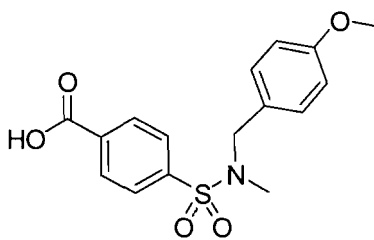
Exemplul 5-28: Acid 4-(N,N-dibenzilsulfamoil)benzoic



[00406] A fost preparat ca în Exemplul 5-27 din dibenzilamină și 4-(clorsulfonil)-benzoat de metil (Exemplul 5-10c). SM (M-H, 380,1); ^1H RMN (400MHz, DMSO- d_6): 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, larg, 1H).

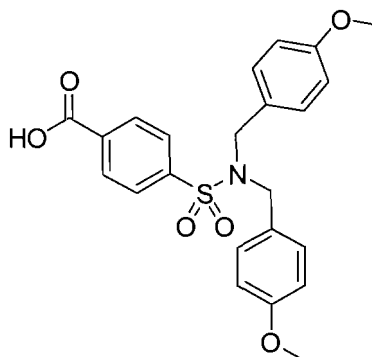
[00407] Compusul a avut un IC_{50} față de receptorul de gust amar hT2R14 de 7,74 μM .

Exemplul 5-29: Acid 4-(N-(4-metoxibenzil)-N-metilsulfamoil)benzoic



[00408] A fost preparat ca în Exemplul 5-27 din 1-(4-metoxifenil)-N-metilmetanamină și 4-(clorsulfonil)-benzoat de metil (Exemplul 5-10c). SM (M-H, 335,1); ^1H RMN (400MHz, DMSO- d_6): 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), Analiza elementară: (găsit): C 57,47%, H 4,77% și N 4,31%; (teoretic): C 57,30%, H 5,11% și N 4,18%

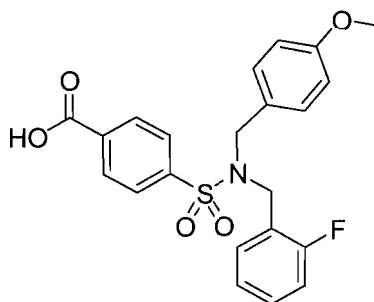
Exemplul 5-30: Acid 4-(N,N-bis(4-metoxibenzil)sulfamoil)benzoic



[00409] A fost preparat ca în Exemplul 5-27 din bis(4-metoxibenzil)amină și 4-(clorsulfonil)-benzoat de metil (Exemplul 5-10c). SM (M-H, 440,1); ¹H RMN (400MHz, DMSO-d6): δ, ppm: 3,68 (s, 6H), 4,20 (s, 4H), 6,77 (d, 4H, J=10 Hz), 6,98 (d, 4H, J=10 Hz), 7,92 (dd, 2H J=8 Hz), 8,06(dd, 2H, J=8 Hz). Analiza elementară: (găsit): C 62,45%, H 5,19% și N 3,06%; (teoretic): C 62,57%, H 5,25% și N 3,17%

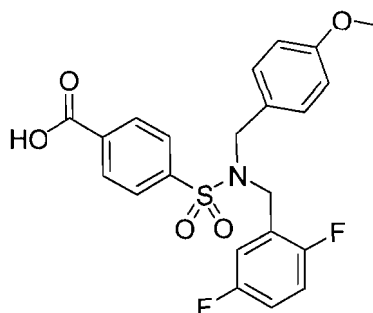
[00410] Compusul a avut un IC₅₀ față de receptorul de gust amar hT2R14 de 4,14 μM.

Exemplul 5-31: Acid 4-(N-(2-fluorobenzil)-N-(4-metoxibenzil)sulfamoil)benzoic



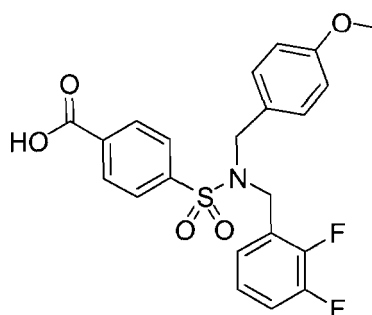
[00411] A fost preparat ca în Exemplul 5-10 din 4-(N-(4-metoxibenzil)sulfamoil)-benzoat de metil (Exemplul 5-10b) și 1-(bromometil)-2-fluorobenzen. ¹H RMN (400MHz, DMSO-d6): δ, ppm: 3,66 (s, 3H), 4,29 (s, 2H), 4,37(s, 2H), 6,72 (d, 2H, J=8 Hz), 7,01-7,03 (m, 6H), 7,93 (d, 2H, J=8 Hz), 8,08 (d, 2H, J=8Hz).

Exemplul 5-32: Acid 4-(N-(2,5-difluorobenzil)-N-(4-metoxibenzil)sulfamoil)-benzoic

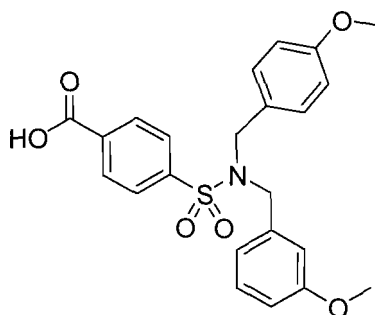


[00412] A fost preparat ca în Exemplul 5-10 din metil 4-(N-(4-metoxibenzil)sulfamoil)-benzoat (Exemplul 5-10b) și 2-(bromometil)-1,4-difluorobenzen. ¹H RMN (400MHz, DMSO-d₆): δ, ppm: 3,66 (s, 3H), 4,31 (s, 2H), 4,33 (s, 2H), 6,74-7,06 (m, 7H), 7,95 (d, 2H, J=8 Hz), 8,09 (d, 2H, J=8Hz).

Exemplul 5-33: Acid 4-(N-(2,3-difluorobenzil)-N-(4-metoxibenzil)sulfamoil)benzoic

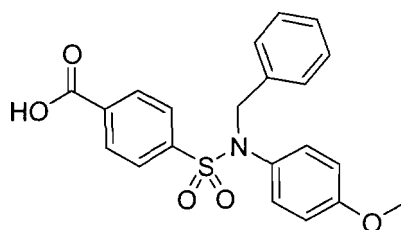


[00413] A fost preparat ca în Exemplul 5-10 din 4-(N-(4-metoxibenzil)sulfamoil)-benzoat de metil (Exemplul 5-10b) și 1-(bromometil)-2,3-difluorobenzen. ¹H RMN (400MHz, DMSO-d₆): δ, ppm: 3,30 (s, 3H), 4,29 (s, 2H), 4,32(s, 2H), 6,87 (d, 2H, J=8Hz), 7,02-7,20 (m, 5H), 7,95 (d, 2H, J=8Hz), 8,05 (d, 2H, J=8Hz).

Exemplul 5-34: Acid 4-(N-(3-metoxibenzil)-N-(4-metoxibenzil)sulfamoil)-benzoic

[00414] A fost preparat ca în Exemplul 5-10 din 4-(N-(4-metoxibenzil)sulfamoil)benzoat de metil (Exemplul 5-10b) și 3-metoxibenzil bromură. SM (M - H, 440,50); ¹H RMN (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] Compusul a avut un IC₅₀ față de receptorul de gust amar hT2R14 de 2,46 μM.

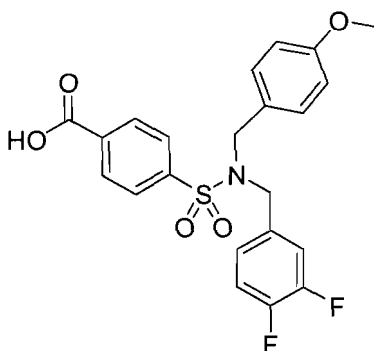
Exemplul 5-35: Acid 4-(N-benzil-N-(4-metoxifenil)sulfamoil)benzoic

[00416] A fost preparat ca în Exemplul 5-10 din 4-(N-(4-metoxifenil)sulfamoil)benzoat de metil (Exemplul 5-35a) și bromură de benzil. SM (M - H, 396); ¹H RMN (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).

Exemplul 5-35a: Metil 4-(N-(4-metoxifenil)sulfamoil)benzoat

[00417] La un amestec de 4-metoxibenzenamină (580 mg, 4,71 mmol) și trietilamină (1,48 mL, 10,7 mmol) în diclormetan (10 mL) s-a adăugat 4-(clorsulfonil)benzoat de metil (1,00 g, 4,28 mmol). Acest amestec a fost menținut sub agitare timp de 16 ore la temperatura camerei. Amestecul de reacție a fost diluat cu diclormetan (50 mL) și spălat consecutiv cu apă, acid citric 10 % și saramură. Compușii organici au fost uscați pe sulfat de sodiu și concentrați pe un evaporator rotativ. Produsul brut rezultat a fost cromatografiat pe silica gel folosind drept efluent diclormetan 100 % conducând la metil 4-(N-(4-metoxifenil)sulfamoil)benzoat drept un solid alb cristalin (400 mg, randament 30 %).

Exemplul 5-36: Acid 4-(N-(3,4-difluorobenzil)-N-(4-metoxibenzil)sulfamoil)benzoic



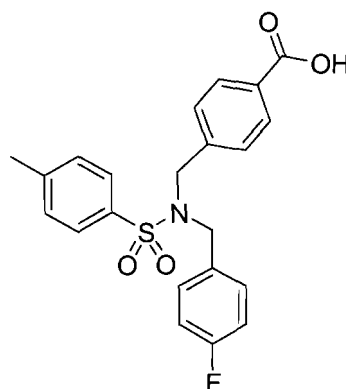
[00418] A fost preparat ca în Exemplul 5-10 din N-(3,4-difluorobenzil)(4-metoxifenil)-metanamină (Exemplul 5-36a) și metil 4-(clorsulfonil)benzoat (Exemplul 5-10c). SM (M - H, 446); ¹H RMN (400MHz, DMSO-d₆): δ ppm: 3,69 (s, 3H), 4,20 (s, 4H), 6,73 (d, J = 8,8 Hz, 2H), 6,93 (m, 2H), 6,98 (d, J = 8,8 Hz, 2H), 7,22 (m, 1H), 7,74(d, J = 8,4 Hz, 2H), 7,99 (d, J = 8,4 Hz, 2H).

Exemplul 5-36a: N-(3,4-difluorobenzil)(4-metoxifenil)metanamină

[00419] La un amestec de (4-metoxifenil)metanamină (1,77 mL, 13,6 mmol) și acid acetic (2,7 mL, 45 mmol) în diclormetan (15 mL) s-a adăugat 3,4-difluorobenzaldehidă (1,0 m, 9,08 mmol). Acest amestec a fost încălzit în cuptorul cu microunde la 100 °C timp de 15 min. Reacția a fost răcită la temperatura camerei și s-a adăugat în porții rășină macroporoasă de cianoborohidruură (9,8 g, 22,7 mmol).

Acest amestec a fost menținut sub agitare la temperatura camerei timp de 16 ore. Rășina a fost filtrată și clătită cu diclormetan și produșii organici au fost spălați cu soluție de bicarbonat de sodiu saturat până când spumarea a încetat. Produșii organici au fost uscați pe sulfat de sodiu și concentrați pe un evaporator rotativ. Materialul brut rezultat a fost purificat prin cromatografie pe silica gel folosind un gradient metanol diclormetan drept eluent pentru a conduce la N-(3,4-difluorobenzil)(4-metoxifenil)metanamină sub formă de ulei gălbui (1,9 g, randament 80 %). SM (M + H, 264); ¹H RMN (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).

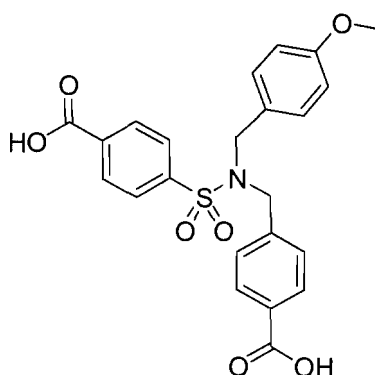
Exemplul 5-37: Acid 4-((N-(4-fluorobenzil)-4-metilfenilsulfonamido)metil)benzoic



[00420] A fost preparat ca în Exemplul 5-11 din acid 4-(aminometil)fenilcarboxilic, 4-metilbenzen-1-sulfonilclorură și 4-fluorobenzil bromură. ¹H RMN (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= 8Hz), 7,63 (d, 2H, J=8Hz), 7,73 (d, 2H, J=8Hz)

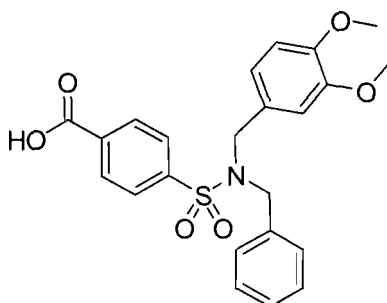
[00421] Compusul a avut un IC₅₀ față de receptorul de gust amar hT2R14 de 0,054 μM.

Exemplul 5-38: Acid 4-((4-carboxi-N-(4-metoxibenzil)fenilsulfonamido)metil)benzoic



[00422] A fost preparat ca în Exemplul 5-10 din 4-(bromometil)benzoat și 4-(N-(4-metoxibenzil)sulfamoil)benzoat de metil (Exemplul 5-10b). ^1H RMN (400MHz, DMSO- d_6): 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, $J = 8\text{Hz}$).

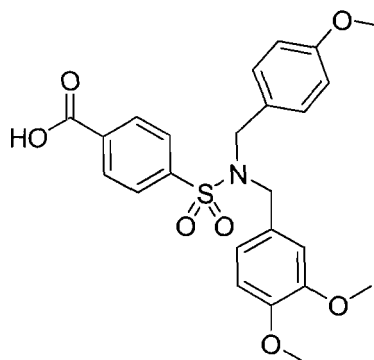
Exemplul 5-39: Acid 4-(N-benzil-N-(3,4-dimetoxibenzil)sulfamoil)benzoic



[00423] A fost preparat ca în Exemplul 5-10 din (3,4-dimetoxifenil)metanamină, metil 4-(clorsulfonil)benzoat (Exemplul 5-10c) și clorură de benzil. SM (M - H, 440,10); ^1H RMN (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] Compusul a avut un IC_{50} față de receptorul de gust amar hT2R14 de 0,678 μM .

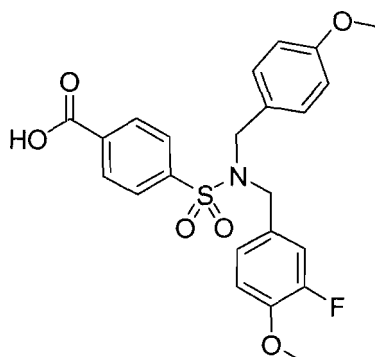
Exemplul 5-40: Acid 4-(N-(3,4-dimetoxibenzil)-N-(4-metoxibenzil)sulfamoil)benzoic



[00425] A fost preparat ca în Exemplul 5-10 din (3,4-dimetoxifenil)metanamină, 4-(clorsulfonil)benzoat de metil (Exemplul 5-10c) și 4- metoxibenzilbromură. SM (M - H, 470,10); ^1H RMN (400MHz, 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, $J = 1,4$ Hz), 6,58 (dd, 1H, $J_1 = 8,2$ Hz, $J_2 = 1,4$ Hz), 6,78 (m, 3H), 7,02 (d, 2H, $J = 8,6$ Hz), 7,94 (d, 2H, $J = 8,4$ Hz), 8,09 (d, 2H, $J = 8,4$ Hz).

[00426] Compusul a avut un IC_{50} față de receptorul de gust amar hT2R14 de 1,47 μM .

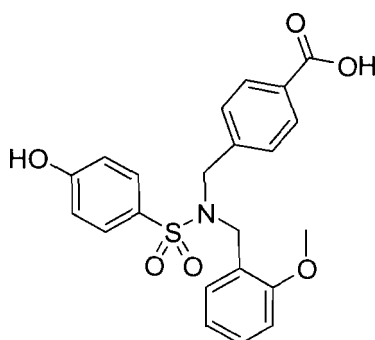
Exemplul 5-41: Acid 4-(N-(3-fluoro-4-metoxibenzil)-N-(4-metoxibenzil)sulfamoil)-benzoic



[00427] A fost preparat ca în Exemplul 5-10 din 4-(bromometil)-2-fluoro-1-metoxibenzen și 4-(N-(4-metoxibenzil)sulfamoil)benzoat de metil (Exemplul 5-10b). SM (M - H, 458,10); ^1H RMN (400MHz, CD_3OD): 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] Compusul a avut un IC_{50} față de receptorul de gust amar hT2R14 de 1,11 μM .

Exemplul 5-42: Acid 4-((4-hidroxi-N-(2-metoxibenzil)fenilsulfonamido)metil)-benzoic



[00429] S-a dizolvat în acetonă (1,0 mL) 4-(N-(2-metoxibenzil)sulfamoil)fenil acetat (Exemplul 5-42a) (50 mg, 0,15 mmol) urmată de adăugarea de carbonat de cesiu (97 mg, 0,30 mmol) și 4-(bromometil)benzoat de metil (38 mg, 0,17 mmol). Amestecul a fost menținut sub agitare la temperatura camerei peste noapte și apoi sărurile

anorganice au fost filtrate. Acetona a fost îndepărtată în vacuo și reziduul a fost redizolvat în acetat de etil și spălat cu apă, urmată de saramură. Stratul organic a fost uscat pe sulfat de magneziu și concentrat. Produsul brut a fost purificat pe coloană cromatografică cu amestec de acetat de etil/hexani ca efluent până la obținerea de metil 4-((4-acetoxi-N-(2-metoxibenzil)fenilsulfonamido)metil)benzoat.

[00430] 4-((4-Acetoxi-N-(2-metoxibenzil)fenilsulfonamido)metil)benzoatul de metil (brut) a fost dizolvat în THF (1,0 mL) și tratat cu soluție apoasă de NaOH (1N, 2,0 mL, 2,0 mmol). Amestecul a fost refluxat timp de o oră. După terminarea reacției, THF a fost îndepărtat *in vacuo* și soluția aposă rezultată a fost acidulată cu o soluție apoasă de HCl 6 N la un pH of ~3. Faza apoasă a fost extrasă cu EtOAc (2 x 15 mL) și straturile organice combinate au fost spălate cu apă, saramură, uscate pe Na₂SO₄ și concentrate. Produsul brut a fost purificat prin HPLC cu fază inversă conducând la 10,8 mg compus din titlu (randament 15% după două etape). SM (M-H, 426,1); ¹H RMN (400MHz, acetonă-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] Compusul a avut un IC₅₀ față de receptorul de gust amar hT2R14 de 2,56 μM.

Exemplul 5-42a: 4-(N-(2-metoxibenzil)sulfamoil)fenil acetat

[00432] O soluție de 4-(clorsulfonil)fenil acetat (Exemplul 5-42b) (531 mg, 2,265 mmol) în 5,0 mL diclormetan, a fost răcită la 0 °C într-o baie de gheață. S-au adăugat (2-metoxifenil)metanamină (325 μL, 2,492 mmol) și trietilamină (347 μL, 2,492 mmol). Baia de gheață a fost îndepărtată și amestecul a fost încălzit la temperatura camerei și menținut sub agitare timp de 2 ore. Amestecul de reacție a fost concentrat și produsul brut a fost purificat pe coloană cromatografică (amestec hexani/acetat de etil = 90/10 la 30/70) pentru a conduce la compusul pur 4-(N-(2-metoxibenzil)sulfamoil)fenil acetat (743 mg, 89 %) sub formă de solid alb. SM (M+H, 336,1) ¹H RMN (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),

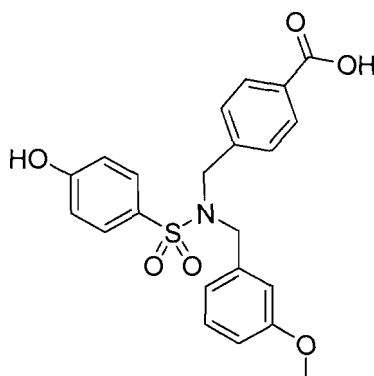
7,07(br d, 1H, J = 7,4 Hz), 7,10 (d, 2H, J= 8,7 Hz), 7,19 (br t, 1H, J = 7,8 Hz), 7,74 (d, 2H, J= 8,7 Hz).

Exemplul 5-42b: 4-(Clorsulfonil)fenil acetat

[00433] S-au dizolvat 6,285 g (36,08 mmol) acid 4-hidroxibenzensulfonic într-un amestec de 30 mL anhidridă acetică și 15 mL acid acetic și s-au refluxat timp de 6 ore. Fazele volatile au fost evaporate și plasate în vid înaintat peste noapte. Produsul brut rezultat a fost dizolvat în 100 mL DCM și tratat cu 4,72 mL clorură de oxalil (54,12 mmol) și 139 μ L DMF (1,804 mmol) la 0 °C. Amestecarea a fost continuată până când eliminarea de gaz a încetat, apoi reacția a fost concentrată și amestecul de reacție redizolvat în EtOAc. Stratul organic a fost spălat de două ori cu soluție 2 N H_2SO_4 și uscat cu saramură și $MgSO_4$. Concentrarea a condus la 7,067 g 4-(clorsulfonil)fenil acetat sub formă de ulei gros de culoare închisă care eventual se solidifică (randament 83 % după două etape).

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

Exemplul 5-43: Acid 4-((4-hidroxi-N-(3-metoxibenzil)fenilsulfonamido)metil)-benzoic

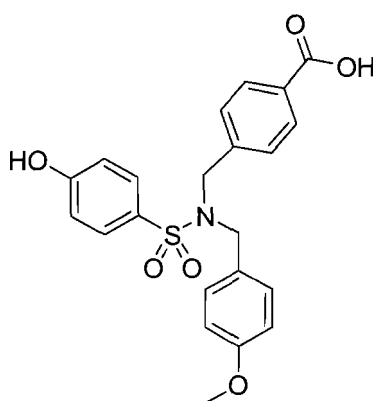


[00435] A fost preparat ca în Exemplul 5-42 din (3-metoxifenil)metanamină și 4-(bromometil)benzoat de metil. SM (M - H, 426,10); 1H RMN (400MHz, acetonă- d_6): δ ,

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] Compusul a avut un IC_{50} față de receptorul de gust amar hT2R14 de 0,188 μ M.

Exemplul 5-44: Acid 4-((4-hidroxi-N-(4-metoxibenzil)fenilsulfonamido)metil)-benzoic

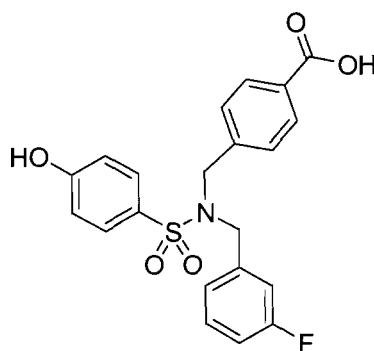


[00437] A fost preparat ca în Exemplul 5-42 din (4-metoxifenil)metanamină și metil 4-(bromometil)benzoat de metil. SM (M - H, 426,10); 1H RMN (400MHz, acetonă- d_6): δ , ppm: 3,73 (s, 3H), 4,27 (s, 2H), 4,35 (s, 2H), 6,76 (d, 2H, $J = 8,0$ Hz), 7,04 (d, 4H), 7,24 (d, 2H, $J = 7,8$ Hz), 7,79 (d, 2H, $J = 8,2$ Hz), 7,88 (d, 2H, $J = 7,8$ Hz).

[00438] Compusul a avut un IC_{50} față de receptorul de gust amar hT2R14 de 3,43 μ M.

Exemplul 5-45: Acid 4-((N-(3-fluorobenzil)-4-hidroxifenilsulfonamido)til)benzoic

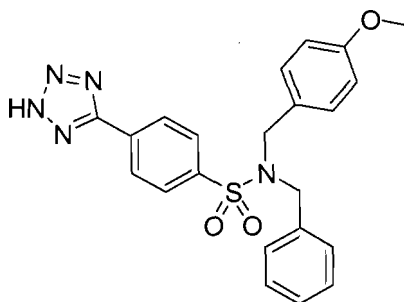
176



[00439] A fost preparat ca în Exemplul 5-42 din (3-fluorofenil)metanamină și 4-(bromometil)benzoat de metil. SM (M - H, 414,1), ^1H RMN (400MHz, acetona- d_6): 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] Compusul a avut un IC_{50} față de receptorul de gust amar hT2R14 de 0,459 μM .

Exemplul 5-46: N-benzil-N-(4-metoxibenzil)-4-(1H-tetrazol-5-il)benzen-sulfonamidă



[00441] S-au dizolvat N-benzil-4-ciano-N-(4-metoxibenzil)benzensulfonamidă (Exemplul 5-46a, 400 mg, 1 mmol) și trimetiltin azidă (400 mg, 2 mmol) în toluen (10 mL) și s-a încălzit cu microunde la 150 °C timp de 3 ore. S-au adăugat suplimentar 2 echivalenți de trimetiltin azidă și reacția a fost încălzită la microunde la 150 °C pentru încă 3 ore. Amestecul a fost răcit și filtrat pentru a se obține staniu tetrazol brut care a fost hidrolizat în MeOH/conc HCl (50 mL: 20 mL). S-a adăugat apă și precipitatul rezultat a fost colectat prin filtrare. Produsul a fost recristalizat cu etanol absolut și apă pentru a se obține N-benzil-N-(4-metoxibenzil)-4-(1H-tetrazol-5-il)benzen-

sulfonamidă sub formă de solid alb. SM (M + H, 436,10); ¹H RMN (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).00

[00442] Compusul a avut un IC₅₀ față de receptorul de gust amar hT2R14 de 3,67 μM.

Exemplul 5-46a: N-benzil-4-ciano-N-(4-metoxibenzil)benzensulfonamidă.

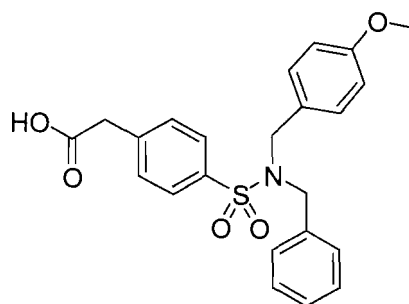
[00444] S-a adăugat 4-cianobenzen-1-sulfonil clorură (600 mg, 3 mmol) la o soluție de N-benzil-1-(4-metoxifenil)metanamină (Exemplul 5-46b, 750 mg, 3,3 mmol) și trietilamină (500 mg, 3,6 mmol) în diclormetan (15 mL). Reacția a fost menținută sub agitare la temperatura camerei timp de 4 ore apoi a fost concentrată pe un evaporator rotativ. Produsul brut a fost purificat pe silica gel pentru a se obține N-benzil-4-ciano-N-(4-metoxibenzil)benzen-sulfonamidă drept un solid alb. ¹H RMN (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).

Exemplul 5-46b: N-benzil-1-(4-metoxifenil)metanamină

[00444] S-au adăugat 4-metoxibenzaldehidă (5 g, 35 mmol) și benzilamină (3,8 g, 35 mmol) la triacetoxiborohidru de sodiu (10,4 g, 49 mmol) în dicloretan (125 mL). Reacția a fost menținută sub agitare la temperatura camerei 2 ore, apoi concentrată. Amestecul a fost diluat cu diclormetan (200 mL), spălat cu soluție apoasă saturată de carbonat acid de sodiu (200 mL), saramură (200 mL) și uscat pe sulfat de magneziu. Amina brută a fost concentrată și purificată prin cromatografie pe silica gel (70% acetat de etil în hexani) pentru a obține N-benzil-1-(4-metoxifenil)metanamină ca ulei. ¹H RMN (400MHz, DMSO-d₆): 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).

Exemplul 5-47: Acid 2-(4-(N-benzil-N-(4-metoxibenzil)sulfamoil)fenil) acetic.

178

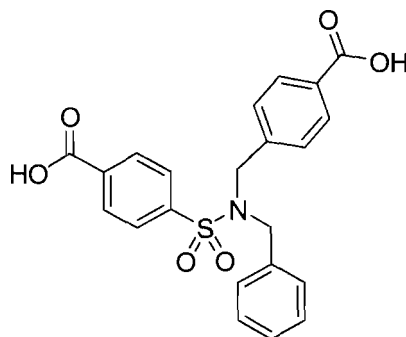


[00445] A fost preparat ca în Exemplul 5-27 din 2-(4-(clorsulfonil)fenil)acetat de metil (Exemplul 5-47a), 4-metoxibenzaldehidă și benzilamină. SM (M - H, 424,10); ¹H RMN (400MHz, DMSO-d₆): δ, ppm: 3,66(s, 3H), 3,72(s, 2H), 4,18(s, 2H), 4,22(s, 2H), 6,73(d, J = 8,4 Hz, 2H), 6,91(d, J = 8,4 Hz, 2H), 7,02(m, 2H), 7,19(m, 3H), 7,49(d, J = 8,4 Hz, 2H), 7,80(d, J = 8 Hz, 2H).

Exemplul 5-47a: Metil 2-(4-(clorsulfonil)fenil)acetat

[00446] S-a adăugat acid 2-(4-(clorsulfonil)fenil) acetic (600 mg, 2,6 mmol) la clorură de tionil (3 mL) și s-a încălzit la 80 °C timp de 1 oră. Amestecul de reacție a fost concentrat, răcit la 0 °C într-o baie cu gheață și s-a adăugat metanol rece în picătură. Amestecul a fost menținut sub agitare timp de 30 minute și concentrat pentru a obține metil 2-(4-(clorsulfonil)fenil)-acetat ca ulei. ¹H RMN (400MHz, DMSO-d₆): δ, ppm: 3,57(s, 3H), 3,65(s, 2H), 7,21(d, J = 8 Hz, 2H), 7,55(d, J = 8 Hz, 2H).

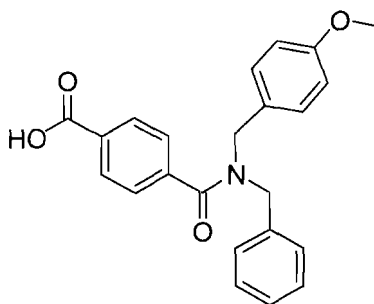
Exemplul 5-48: Acid 4-((N-benzil-4-carboxifenilsulfonamido)metil)benzoic.



[00447] A fost preparat ca în Exemplul 5-10 din 4-(clorsulfonil)benzoat de metil (Exemplul 5-10c), benzil amină și 4-(bromometil)benzoat de metil. SM (M + H,

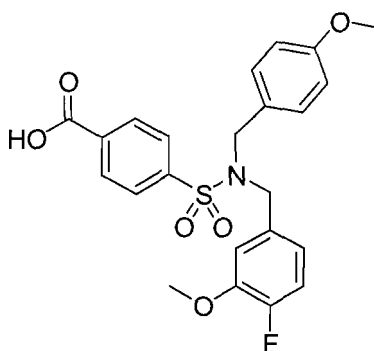
426,10); ^1H RMN (400MHz, DMSO- d_6): δ , ppm: 4,29(s, 2H), 4,34(s, 2H), 7,03(m, 2H), 7,12(m, 2H), 7,68(d, $J = 8$ Hz, 2H), 7,94(d, $J = 8,8$ Hz, 2H), 8,06(d, $J = 8,8$ Hz, 2H), 13,03(s, 2H).

Exemplul 5-49: Acid 4-(benzil(4-metoxibenzil)carbamoil)benzoic



[004489] A fost preparat ca în Exemplul 5-27 din 4-(clorcarbonil)benzoat și N-benzil-1-(4-metoxifenil)metanamină. ^1H RMN (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).

Exemplul 5-50: Acid 4-(N-(4-fluoro-3-metoxibenzil)-N-(4-metoxibenzil)sulfamoil)-benzoic



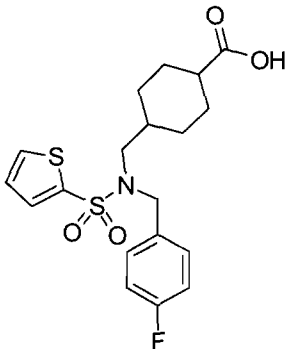
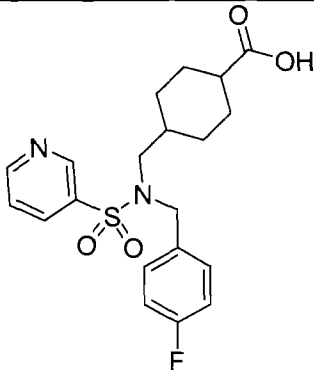
[00449] A fost preparat ca în Exemplul 5-10 din 4-(bromometil)-4-fluoro-3-metoxibenzen și 4-(N-(4-metoxibenzil)sulfamoil)benzoat de metil (Exemplul 5-10b). SM (M - H, 458,10); ^1H RMN (400MHz, DMSO- d_6): δ , ppm: 3,59(s, 3H), 3,67(s, 3H),

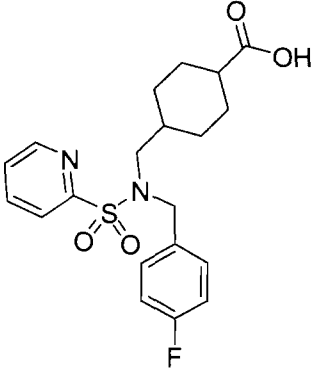
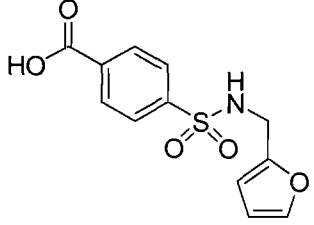
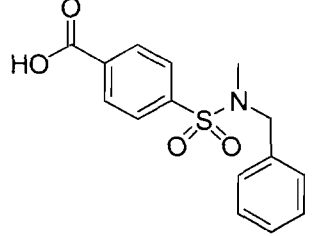
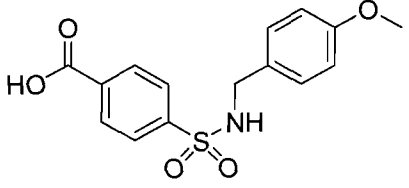
4,25(s, 2H), 4,25(s, 2H), 6,62(m, 2H), 6,77(d, J = 8,4 Hz, 2H), 7,02(m, 3H), 7,97(d, J = 8 Hz, 2H), 8,01(d, J = 8,8 Hz, 2H), 13,49(s, 1H).

[00450] Compusul a avut un IC_{50} față de receptorul de gust amar hT2R14 de 1,65 μ M.

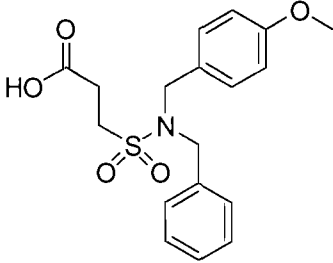
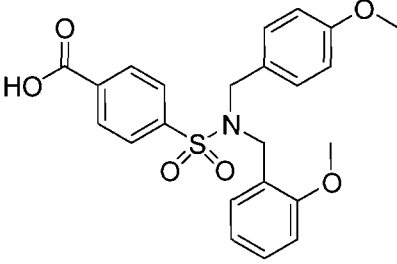
[00451] Compușii suplimentari au fost testați experimental și s-a găsit că prezintă un nivel de eficiență relativ ridicat ca inhibitori ai receptorului de gust amar hT2R14. Rezultatele testării sunt prezentate în tabelul de mai jos în Tabelul C.

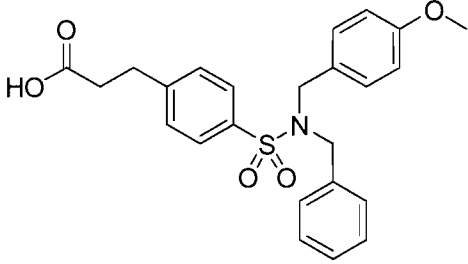
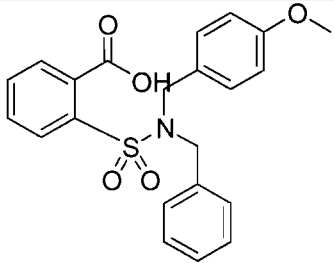
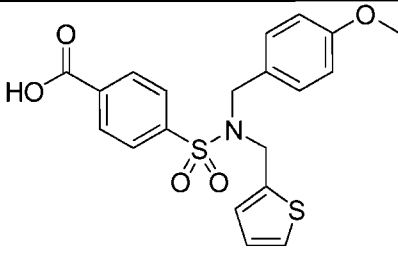
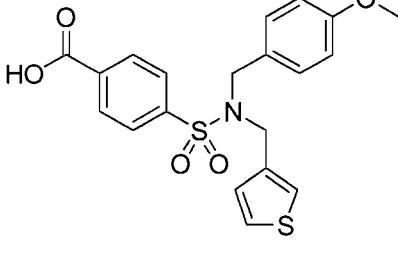
Tabelul C

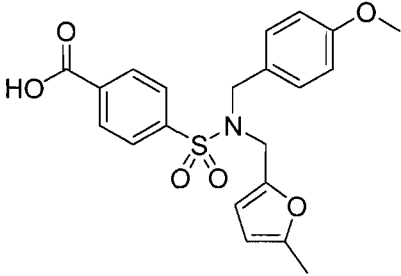
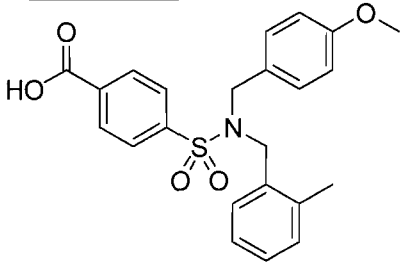
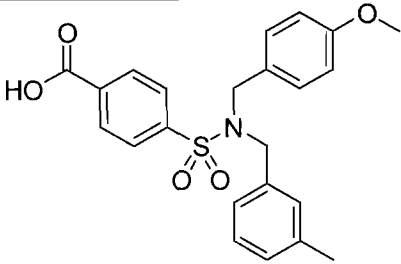
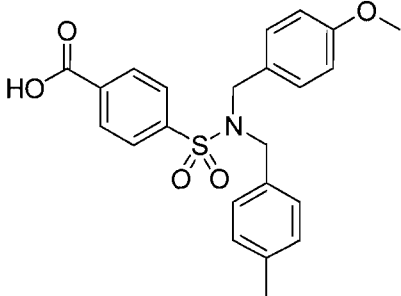
Compus nr.	Compus	hT2R14 IC ₅₀ (μM)
5-51	 acid 4-((N-(4-fluorobenzil)tiofen-2-sulfonamido)metil)ciclohexancarboxilic	0,342
5-52	 acid 4-((N-(4-fluorobenzil)piridin-3-sulfonamido)metil)ciclohexancarboxilic	8,434

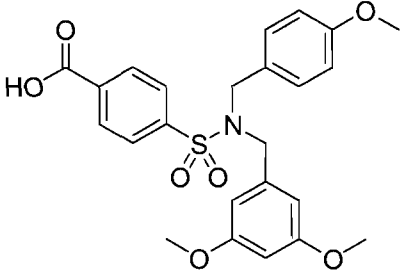
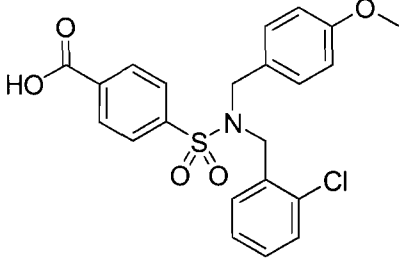
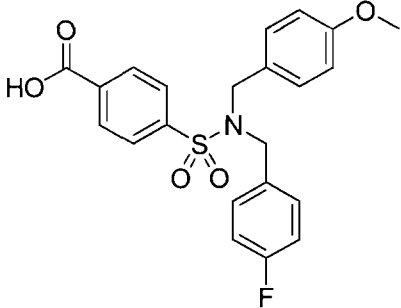
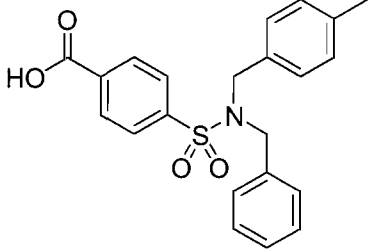
5-53	 acid 4-((N-(4-fluorobenzil)piridin-2-sulfonamido)metil)ciclohexancarboxilic	
5-54	 acid 4-(N-(furan-2-ilmetil)sulfamoil)benzoic	
5-55	 acid 4-(N-benzil-N-metilsulfamoil)benzoic	
5-56	 acid 4-(N-(4-metoxibenzil)sulfamoil)benzoic	

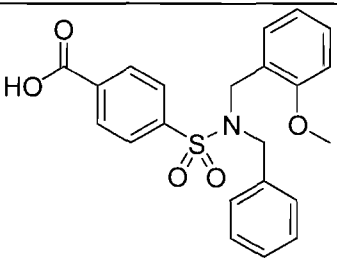
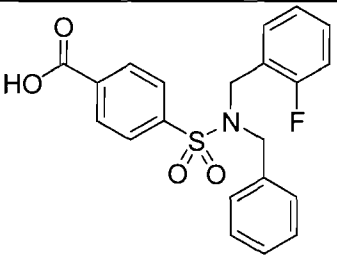
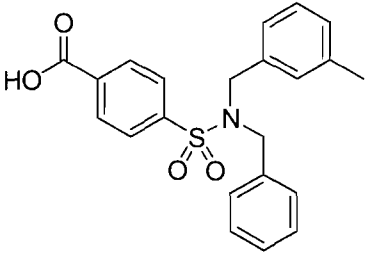
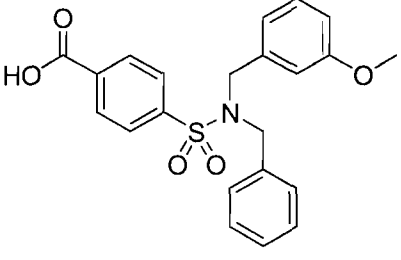
183

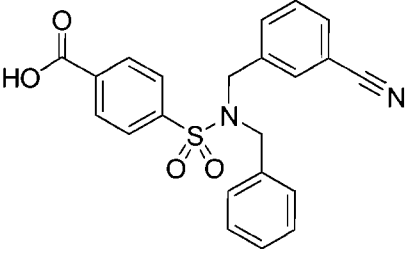
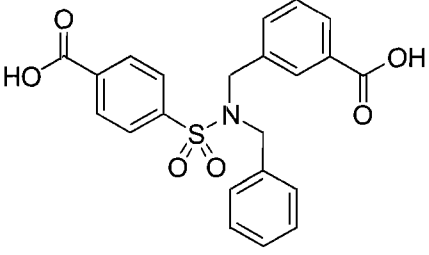
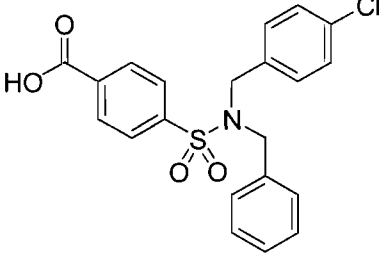
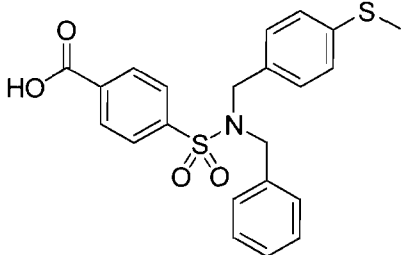
5-57	 acid 3-(N-benzyl-N-(4-metoxibenzil)sulfamoil)propanoic	
5-58	 acid 4-(N-(2-metoxibenzil)-N-(4-metoxibenzil)sulfamoil)benzoic	2,943

Compus nr.	Compus	hT2R14 IC ₅₀ (μM)
5-59	 acid 3-(4-(N-benzyl-N-(4-methoxybenzyl)sulfamoyl)phenyl)propanoic	
5-60	 acid 2-(N-benzyl-N-(4-methoxybenzyl)sulfamoyl)benzoic	
5-61	 acid 4-(N-(4-methoxybenzyl)-N-(thiophen-2-ylmethyl)sulfamoyl)benzoic	
5-62	 acid 4-(N-(4-methoxybenzyl)-N-(thiophen-3-ylmethyl)sulfamoyl)benzoic	

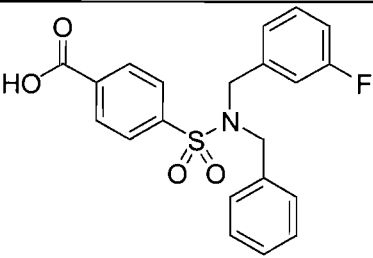
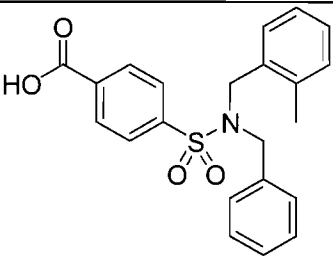
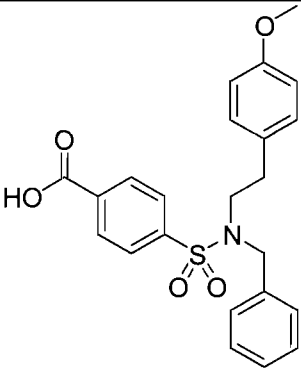
5-63	 4-(N-(4-metoxibenzil)-N-((5-metilfuran-2-il)metil)sulfamoil)benzoic acid	
5-64	 acid 4-(N-(4-metoxibenzil)-N-(2-metilbenzil)sulfamoil)benzoic	
5-65	 acid 4-(N-(4-metoxibenzil)-N-(3-metilbenzil)sulfamoil)benzoic	
5-66	 acid 4-(N-(4-metoxibenzil)-N-(4-metilbenzil)sulfamoil)benzoic	

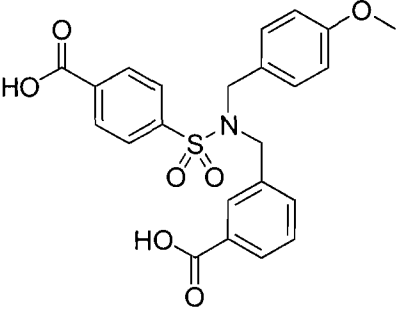
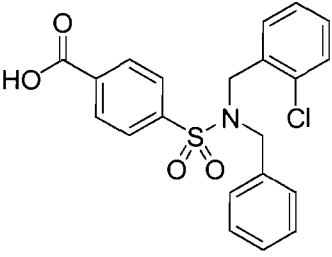
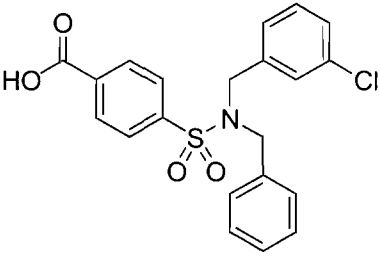
5-67	 acid 4-(N-(3,5-dimethoxybenzyl)-N-(4-methoxybenzyl)sulfamoyl)benzoic	12,141
5-68	 acid 4-(N-(2-chlorobenzyl)-N-(4-methoxybenzyl)sulfamoyl)benzoic	7,044
5-69	 acid 4-(N-(4-fluorobenzyl)-N-(4-methoxybenzyl)sulfamoyl)benzoic	8,283
5-70	 acid 4-(N-benzyl-N-(4-methylbenzyl)sulfamoyl)benzoic	5,394

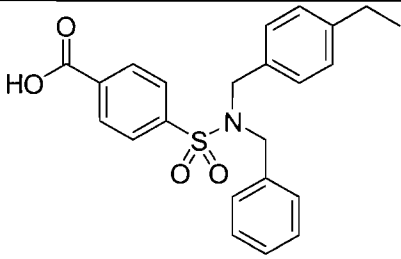
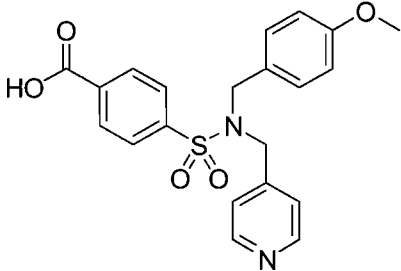
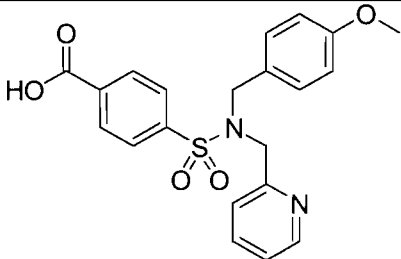
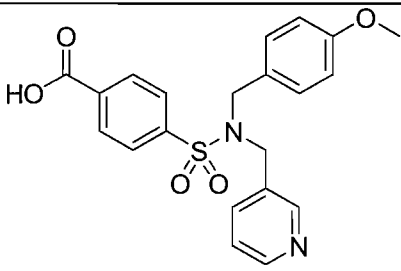
5-71	 acid 4-(N-benzil-N-(2-metoxibenzil)sulfamoyl)benzoic	5,061
5-72	 acid 4-(N-benzil-N-(2-fluorobenzil)sulfamoyl)benzoic	6,164
5-73	 acid 4-(N-benzil-N-(3-metilbenzil)sulfamoyl)benzoic	2,290
5-74	 acid 4-(N-benzil-N-(3-metoxibenzil)sulfamoyl)benzoic	5,991

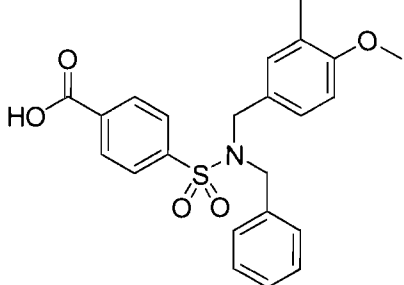
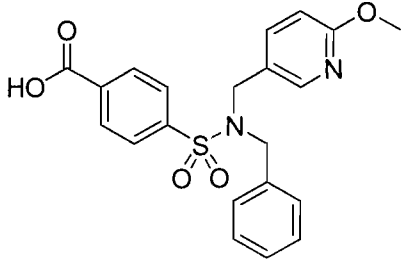
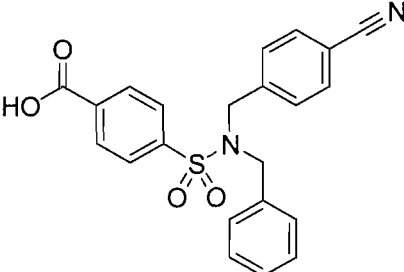
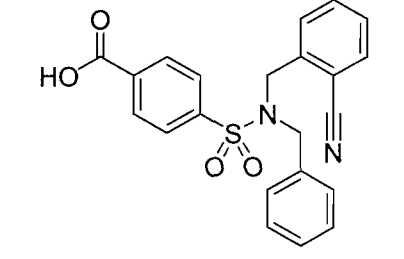
5-75	 acid 4-(N-benzil-N-(3-cyanobenzil)sulfamoyl)benzoic	
5-76	 acid 3-((N-benzil-4-carboxyphenyl)sulfonamido)methylbenzoic	
5-77	 acid 4-(N-benzil-N-(4-chlorobenzil)sulfamoyl)benzoic	3,977
5-78	 acid 4-(N-benzil-N-(4-(methylthio)benzyl)sulfamoyl)benzoic	2,458

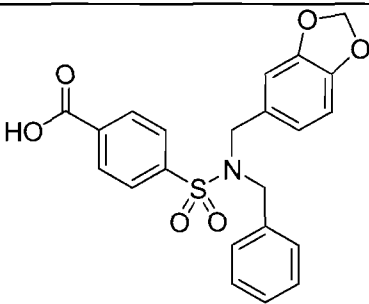
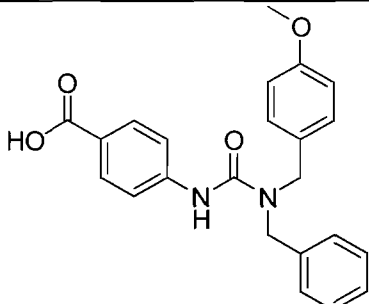
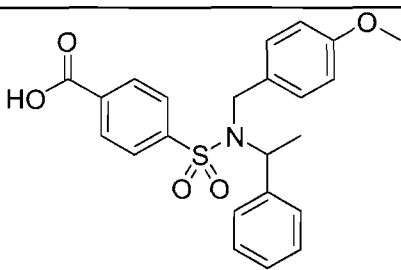
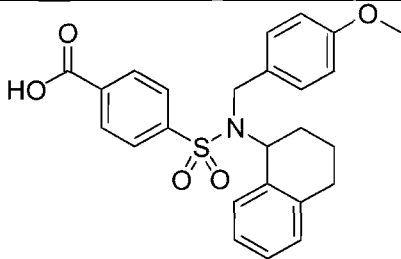
189

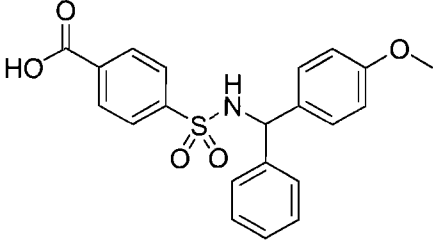
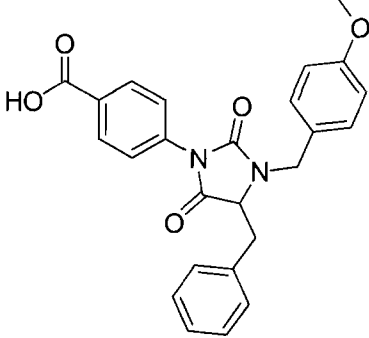
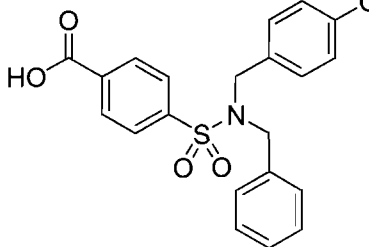
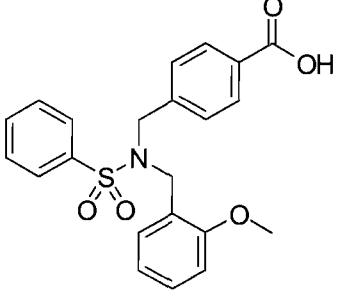
5-79	 acid 4-(N-benzil-N-(3-fluorobenzil)sulfamoyl)benzoic	2,310
5-80	 acid 4-(N-benzil-N-(2-methylbenzyl)sulfamoyl)benzoic	2,926
5-81	 acid 4-(N-benzil-N-(4-methoxyphenethyl)sulfamoyl)benzoic	

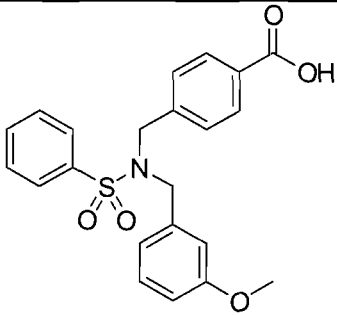
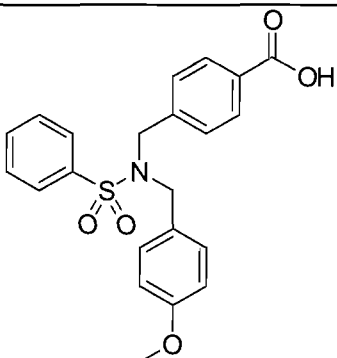
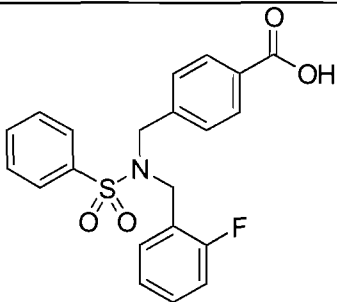
Compus Nr.	Compus	hT2R14 IC ₅₀ (μM)
5-82	 acid 3-((4-carboxi-N-(4-metoxibenzil)fenilsulfonamido)metil)benzoic	
5-83	 acid 4-(N-benzil-N-(2-clorbenzil)sulfamoil)benzoic	4,486
5-84	 acid 4-(N-benzil-N-(3-clorbenzil)sulfamoil)benzoic	4,286

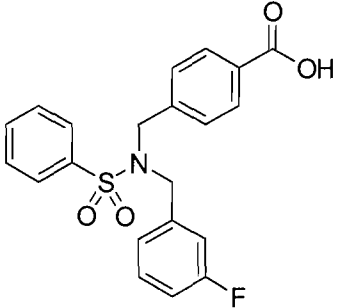
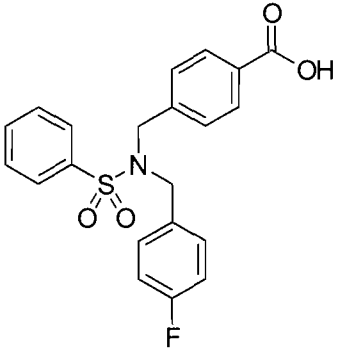
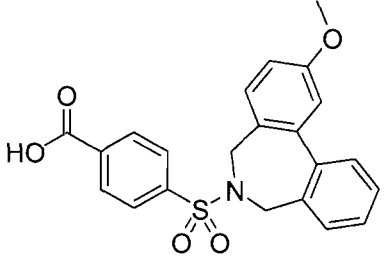
5-85	 acid 4-(N-benzil-N-(4-ethylbenzil)sulfamoyl)benzoic	8,580
5-86	 acid 4-(N-(4-methoxybenzil)-N-(pyridin-4-ylmethyl)sulfamoyl)benzoic	
5-87	 acid 4-(N-(4-methoxybenzil)-N-(pyridin-2-ylmethyl)sulfamoyl)benzoic	
5-88	 acid 4-(N-(4-methoxybenzil)-N-(pyridin-3-ylmethyl)sulfamoyl)benzoic	

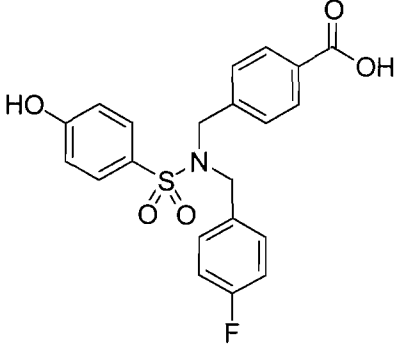
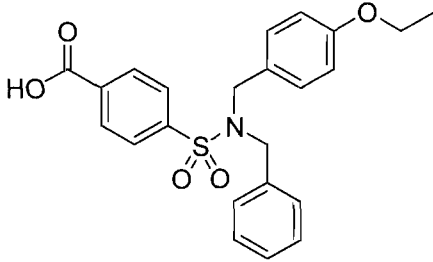
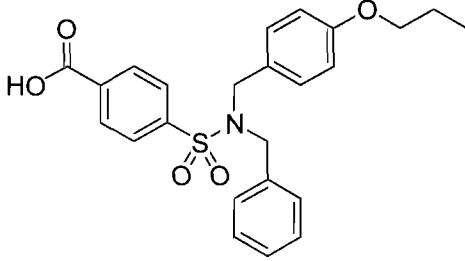
5-89	 acid 4-(N-benzil-N-(4-metoxi-3-metilbenzil)sulfamoil)benzoic	1,995
5-90	 acid 4-(N-benzil-N-((6-metoxipiridin-3-il)metil)sulfamoil)benzoic	3,258
5-91	 acid 4-(N-benzil-N-(4-cianobenzil)sulfamoil)benzoic	1,848
5-92	 acid 4-(N-benzil-N-(2-cianobenzil)sulfamoil)benzoic	4,627

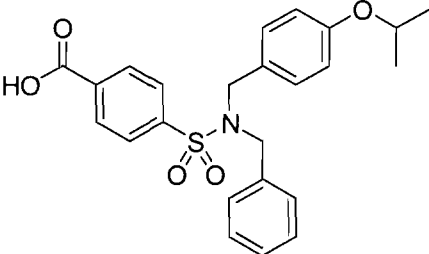
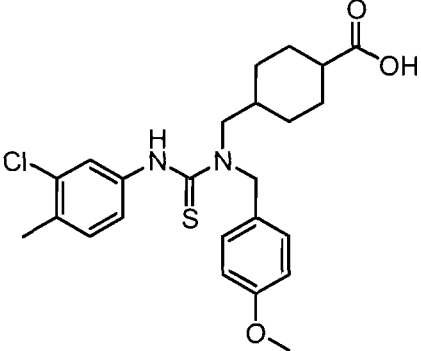
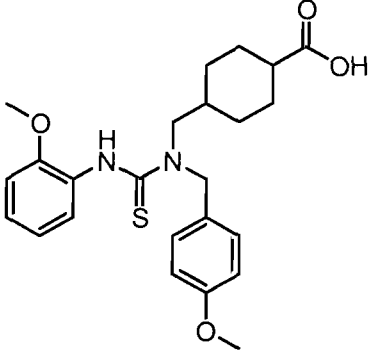
5-93	 acid 4-(N-(benzo[d][1,3]dioxol-5-ylmethyl)-N-benzylsulfamoyl)benzoic	2,167
5-94	 acid 4-(3-benzyl-3-(4-methoxybenzyl)ureido)benzoic	
5-95	 acid 4-(N-(4-methoxybenzyl)-N-(1-phenylethyl)sulfamoyl)benzoic	1,397
5-96	 acid 4-(N-(4-methoxybenzyl)-N-(1,2,3,4-tetrahydronaphthalen-1-yl)sulfamoyl)benzoic	2,415

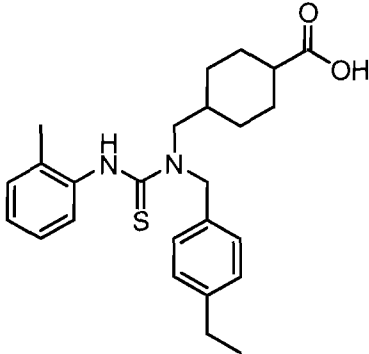
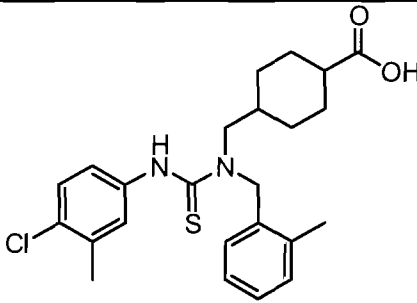
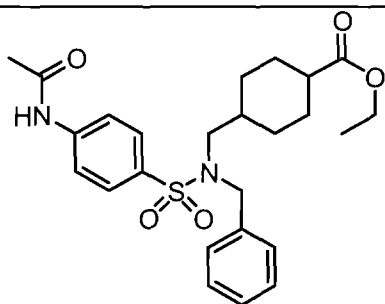
5-97	 acid 4-(N-((4-metoxifenil)(fenil)metil)sulfamoil)benzoic	
5-98	 acid 4-(4-benzil-3-(4-metoxibenzil)-2,5-dioxoimidazolidin-1-il)benzoic	
5-99	 acid 4-(N-benzil-N-(4-hidroxibenzil)sulfamoil)benzoic	5,207
5-100	 acid 4-((N-(2-metoxibenzil)fenilsulfonamido)metil)benzoic	1,294

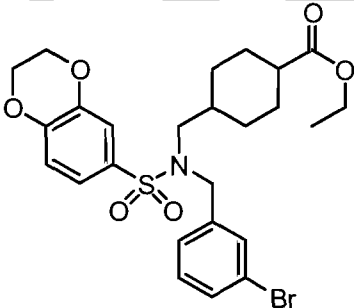
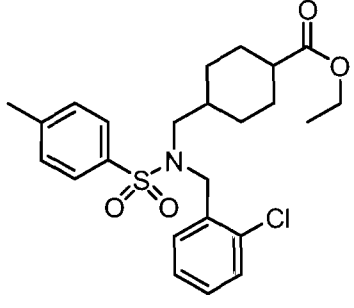
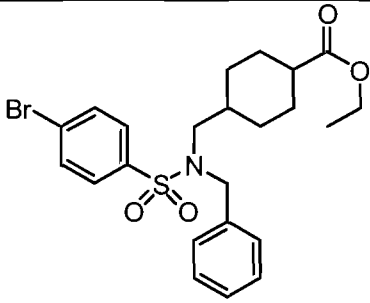
5-101	 acid 4-((N-(3-metoxibenzil)fenilsulfonamido)metil) benzoic	0,345
5-102	 acid 4-((N-(4-metoxibenzil)fenilsulfonamido)metil) benzoic	2,219
5-103	 acid 4-((N-(2-fluorobenzil)fenilsulfonamido)metil)- benzoic	0,429

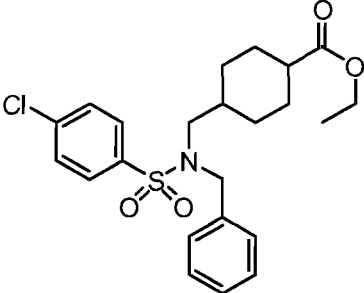
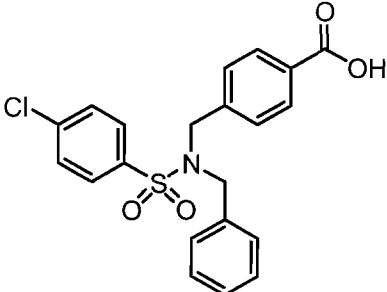
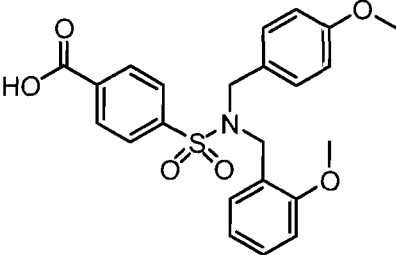
5-104	 acid 4-((N-(3-fluorobenzil)fenilsulfonamido)metil)-benzoic	0,406
5-105	 acid 4-((N-(4-fluorobenzil)fenilsulfonamido)metil)-benzoic	0,935
5-106	 acid 4-(2-metoxi-5H-dibenzo[c,e]azepin-6(7H)-ilsulfonil)benzoic	

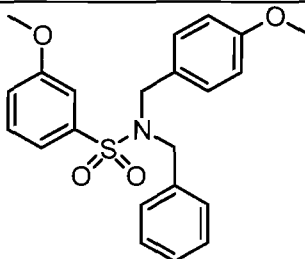
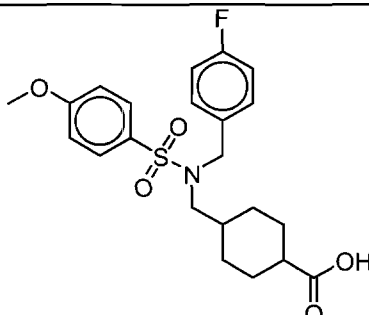
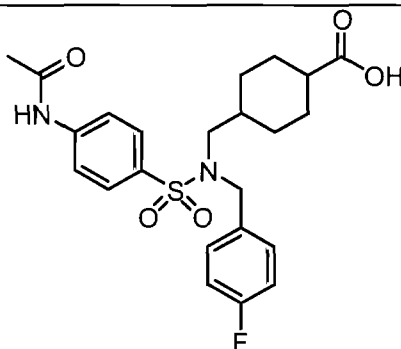
5-107	 acid 4-((N-(4-fluorobenzil)-4-hidroksifenilsulfonamido)metil)benzoic	4,086
5-108	 acid 4-(N-benzil-N-(4-ethoksibenzil)sulfamoil)benzoic	
5-109	 acid 4-(N-benzil-N-(4-propoksibenzil)sulfamoil)benzoic	

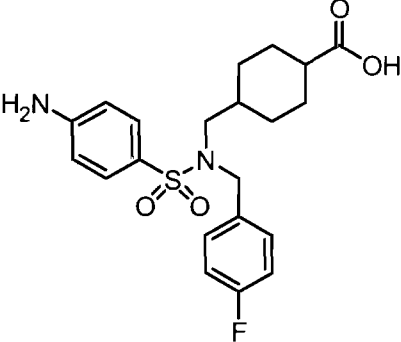
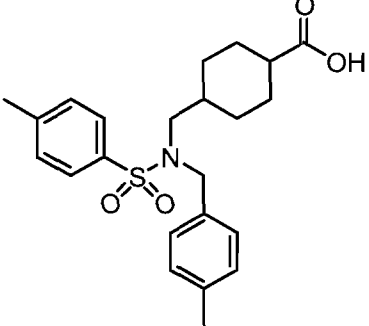
Compus nr.	Compus	hT2R14 IC ₅₀ (μM)
5-110	 acid 4-(N-benzil-N-(4-isopropoxibenzil)sulfamoil)benzoic	
5-111	 acid 4-((3-(3-clor-4-metilfenil)-1-(4-metoxibenzil)tioureido)metil)ciclohexan carboxilic	6,136
5-112	 acid 4-((1-(4-metoxibenzil)-3-(2-metoxifenil)tioureido)metil)ciclohexan carboxilic	8,852

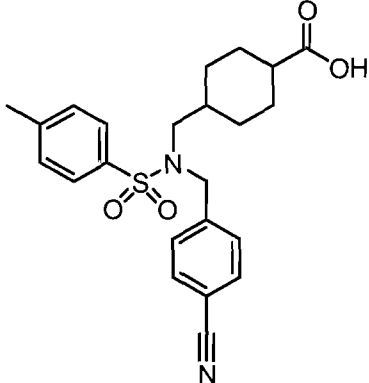
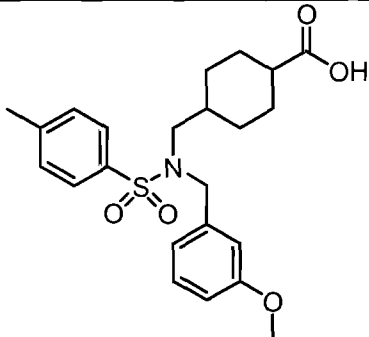
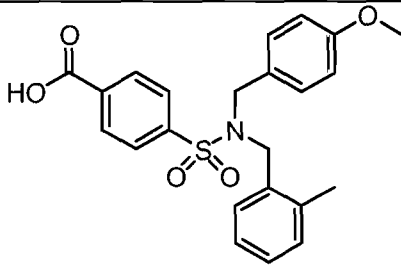
Compus nr.	Compus	hT2R14 IC ₅₀ (μM)
5-113	 acid 4-((1-(4-etilbenzil)-3-o- toliltioureido)metil)ciclohexancarboxilic	5,018
5-114	 acid 4-((3-(4-clor-3-metilfenil)-1-(2- metilbenzil)tioureido)metil)ciclohexancar boxilic	4,872
5-115	 etil 4-((4-acetamido-N- benzilfenilsulfonamido)metil)ciclohexan carboxilat	0,334

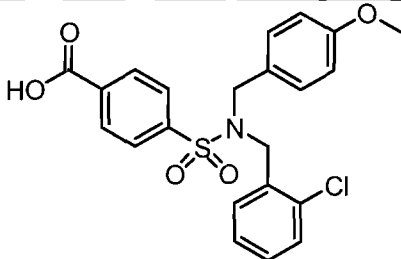
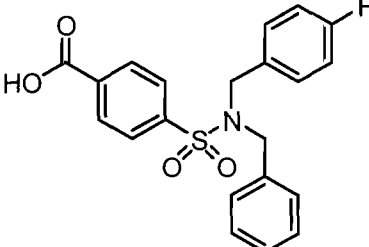
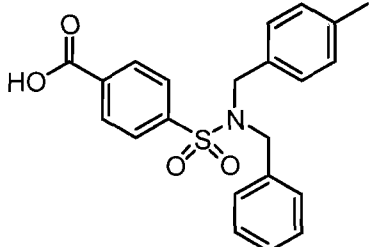
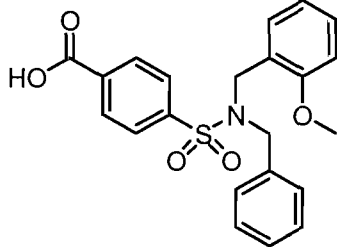
Compus nr.	Compus	hT2R14 IC ₅₀ (μM)
5-116	 4-((N-(3-bromobenzil)-2,3-dihydrobenzo[b][1,4]dioxin-6-sulfonamido)metil)ciclohexancarboxilat de etil	2,567
5-117	 4-((N-(2-clorbenzil)-4-metilfenilsulfonamido)metil)ciclohexan carboxilat de etil	2,816
5-118	 4-((N-benzil-4-bromofenilsulfonamido)metil)ciclohexan carboxilat de etil	2,344

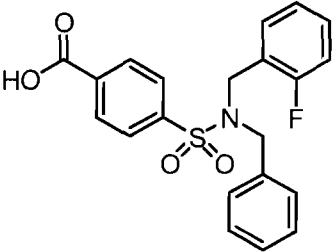
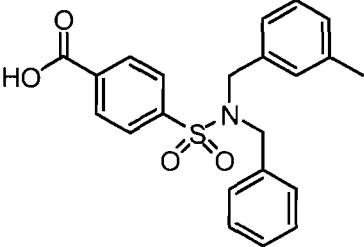
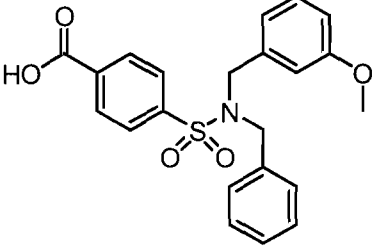
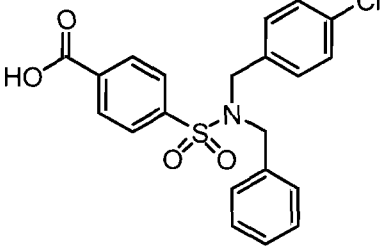
Compus nr.	Compus	hT2R14 IC ₅₀ (μM)
5-119	 4-((N-benzil-4-clorfenilsulfonamido)metil)ciclohexan carboxilat de etil	0,672
5-120	 acid 4-((N-benzil-4-clorfenilsulfonamido)metil)benzoic	0,394
5-121	 acid 4-(N-(2-metoxibenzil)-N-(4-metoxibenzil)sulfamoil)benzoic	2,943

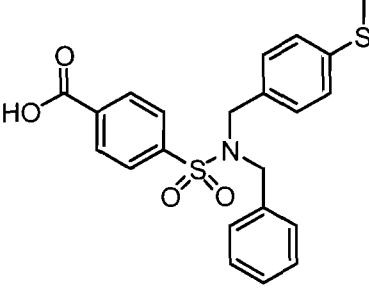
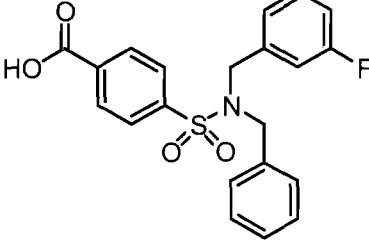
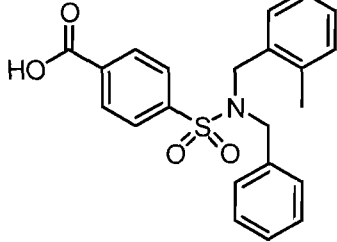
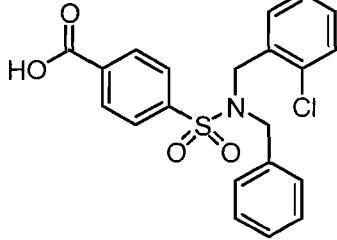
Compus nr.	Compus	hT2R14 IC ₅₀ (μM)
5-122	 N-benzil-3-metoxi-N-(4-metoxibenzil)benzensulfonamidă	2,219
5-123	 acid 4-((N-(4-fluorobenzil)-4-metoxifenilsulfonamido)metil)ciclohexan carboxilic	0,092
5-124	 acid 4-((4-acetamido-N-(4-fluorobenzil)fenilsulfonamido)metil)ciclo hexancarboxilic	0,842

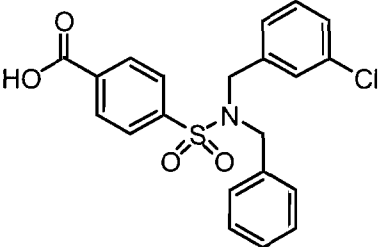
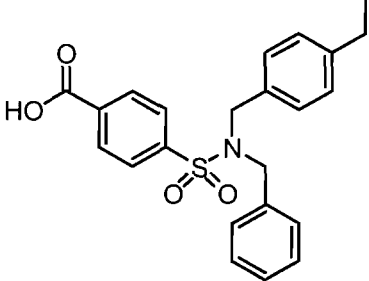
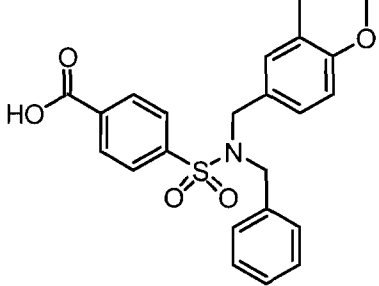
Compus nr.	Compus	hT2R14 IC ₅₀ (μM)
5-125	 acid 4-((4-amino-N-(4-fluorobenzyl)fenilsulfonamido)metil)ciclohexancarboxilic	1,651
5-126	 acid 4-((4-metil-N-(4-metilbenzil)fenilsulfonamido)metil)ciclohexancarboxilic	0,109

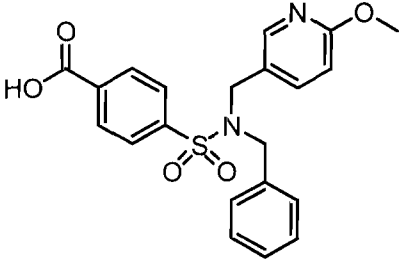
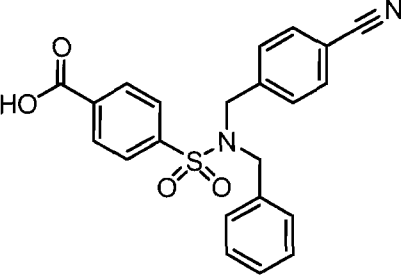
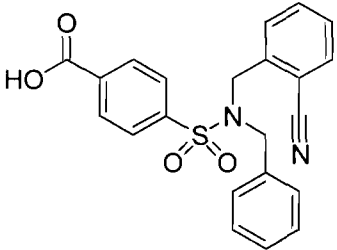
Compus nr.	Compus	hT2R14 IC ₅₀ (μM)
5-127	 acid 4-((N-(4-cianobenzil)-4-metilfenilsulfonamido)metil)ciclohexan carboxilic	0,499
5-128	 acid 4-((N-(3-metoxibenzil)-4-metilfenilsulfonamido)metil)ciclohexan carboxilic	0,036
5-129	 acid 4-(N-(4-metoxibenzil)-N-(2-metilbenzil)sulfamoil)benzoic	5,316

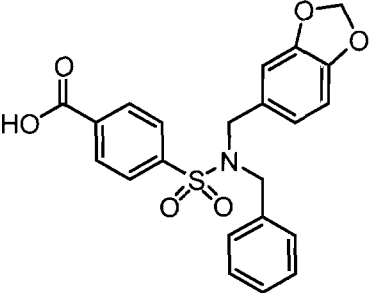
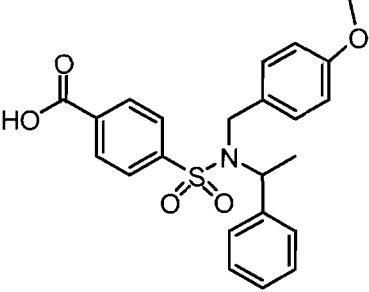
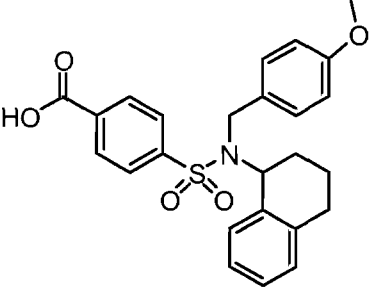
Compus nr.	Compus	hT2R14 IC ₅₀ (μM)
5-130	 acid 4-(N-(2-clorbenzil)-N-(4-metoxibenzil)sulfamoil)benzoic	7,044
5-131	 acid 4-(N-benzil-N-(4-fluorobenzil)sulfamoil)benzoic	8,283
5-132	 acid 4-(N-benzil-N-(4-metilbenzil)sulfamoil)benzoic	5,394
5-133	 acid 4-(N-benzil-N-(2-metoxibenzil)sulfamoil)benzoic	5,061

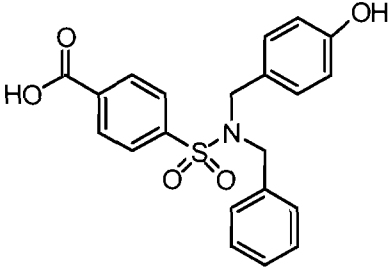
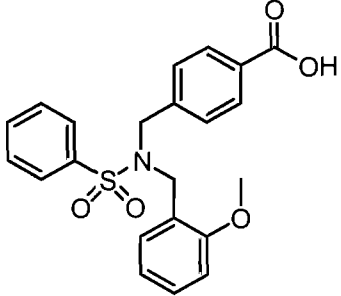
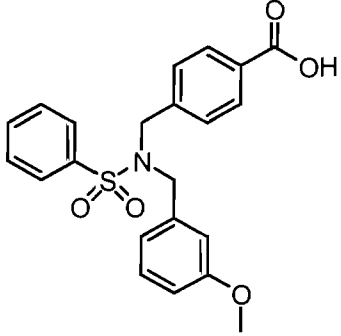
Compus nr.	Compus	hT2R14 IC ₅₀ (μM)
5-134	 acid 4-(N-benzil-N-(2-fluorobenzil)sulfamoil)benzoic	6,164
5-135	 acid 4-(N-benzil-N-(3-metilbenzil)sulfamoil)benzoic	2,290
5-136	 acid 4-(N-benzil-N-(3-metoxibenzil)sulfamoil)benzoic	5,991
5-137	 acid 4-(N-benzil-N-(4-clorbenzil)sulfamoil)benzoic	3,977

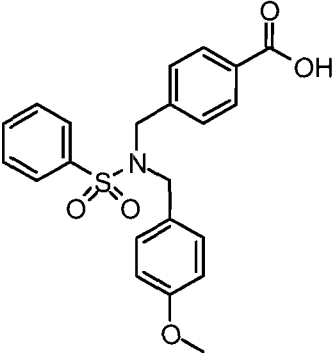
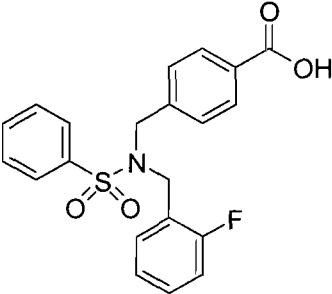
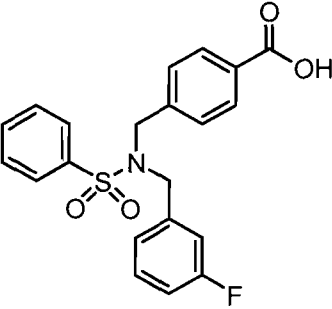
Compus nr.	Compus	hT2R14 IC ₅₀ (μM)
5-138	 acid 4-(N-benzil-N-(4-(metiltio)benzil)sulfamoil)benzoic	2,458
5-139	 acid 4-(N-benzil-N-(3-fluorobenzil)sulfamoil)benzoic	2,310
5-140	 acid 4-(N-benzil-N-(2-metilbenzil)sulfamoil)benzoic	2,926
5-141	 acid 4-(N-benzil-N-(2-clorbenzil)sulfamoil)benzoic	4,486

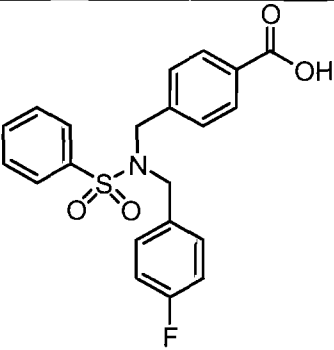
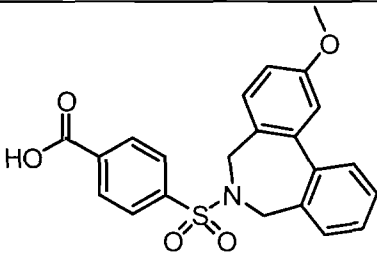
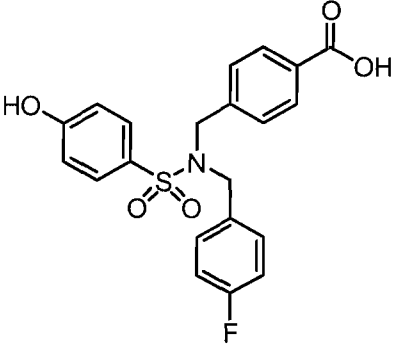
Compus nr.	Compus	hT2R14 IC ₅₀ (μM)
5-142	 acid 4-(N-benzil-N-(3-clorbenzil)sulfamoil)benzoic	4,286
5-143	 acid 4-(N-benzil-N-(4-etilbenzil)sulfamoil)benzoic	8,580
5-144	 acid 4-(N-benzil-N-(4-metoxi-3-metilbenzil)sulfamoil)benzoic	1,995

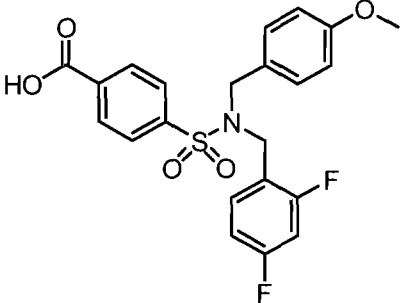
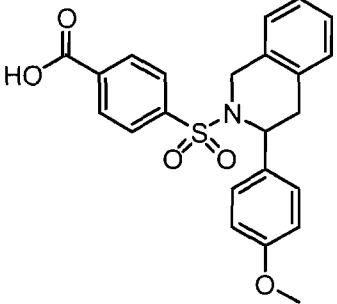
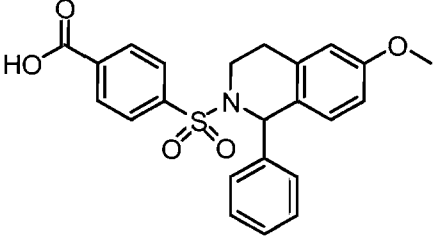
Compus nr.	Compus	hT2R14 IC ₅₀ (μM)
5-145	 acid 4-(N-benzil-N-((6-metoxipiridin-3-il)metil)sulfamoil)benzoic	3,258
5-146	 acid 4-(N-benzil-N-(4-cianobenzil)sulfamoil)benzoic	1,848
5-147	 acid 4-(N-benzil-N-(2-cianobenzil)sulfamoil)benzoic	4,627

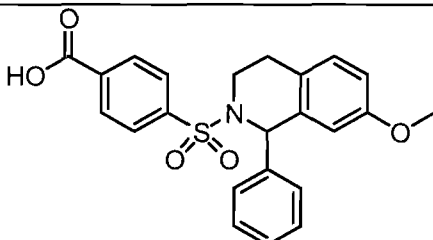
Compus nr.	Compus	hT2R14 IC ₅₀ (μM)
5-148	 acid 4-(N-(benzo[d][1,3]dioxol-5-ylmethyl)-N-benzylsulfamoyl)benzoic	2,167
5-149	 acid 4-(N-(4-methoxybenzyl)-N-(1-phenylethyl)sulfamoyl)benzoic	1,397
5-150	 acid 4-(N-(4-methoxybenzyl)-N-(1,2,3,4-tetrahydronaphthalen-1-yl)sulfamoyl)benzoic	2,415

Compus nr.	Compus	hT2R14 IC ₅₀ (μM)
5-151	 acid 4-(N-benzil-N-(4-hidroxi benzil)sulfamoil)benzoic	5,207
5-152	 acid 4-((N-(2-metoxi benzil)fenil sulfonamido)metil) benzoic	1,294
5-153	 acid 4-((N-(3-metoxi benzil)fenil sulfonamido)metil) benzoic	0,345

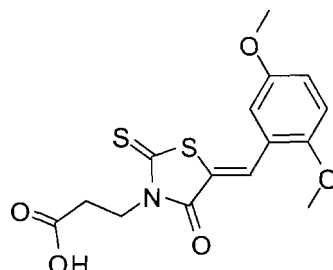
Compus nr.	Compus	hT2R14 IC ₅₀ (μM)
5-154	 acid 4-((N-(4-metoxibenzil)fenilsulfonamido)metil)benzoic	2,219
5-155	 acid 4-((N-(2-fluorobenzil)fenilsulfonamido)metil)benzoic	0,429
5-156	 acid 4-((N-(3-fluorobenzil)fenilsulfonamido)metil)benzoic	0,406

Compus nr.	Compus	hT2R14 IC ₅₀ (μM)
5-157	 acid 4-((N-(4-fluorobenzil)fenilsulfonamido)metil)benzoic	0,935
5-158	 acid 4-(2-metoxi-5H-dibenzo[c,e]azepin-6(7H)-ilsulfonil)benzoic	3,571
5-159	 acid 4-((N-(4-fluorobenzil)-4-hidroxifenilsulfonamido)metil)benzoic	4,086

Compus nr.	Compus	hT2R14 IC ₅₀ (μM)
5-160	 acid 4-(N-(2,4-difluorobenzil)-N-(4-metoxibenzil)sulfamoyl)benzoic	1,255
5-161	 acid 4-(3-(4-metoxifenil)-3,4-dihidroizochinolin-2(1H)-ilsulfonil)benzoic	6,267
5-162	 acid 4-(6-metoxi-1-fenil-3,4-dihidroizochinolin-2(1H)-ilsulfonil)benzoic	9,616

Compus nr.	Compus	hT2R14 IC ₅₀ (μM)
5-163	 acid 4-(7-metoxi-1-fenil-3,4-dihidroizochinolin-2(1H)-ilsulfonil)benzoic	2,879

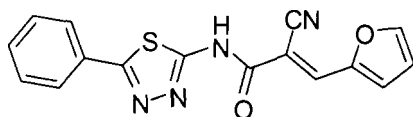
Exemplul 6-1: Acid (Z)-3-(5-(2,5-dimetoxibenziliden)-4-oxo-2-tioxotiazolidin-3-il)propanoic



[00452] S-au combinat în etanol (3mL), acid 3-(4-oxo-2-tioxotiazolidin-3-il)propanoic (200 mg, 1 mmol), 2,5-dimetoxi benzaldehidă (168 mg, 1 mmol) și piperidină (0,3 mL) și s-a supus iradierii într-un cuptor cu microunde la 100 °C timp de 10 minute. Reacția a fost răcită, solidul a fost colectat prin filtrare, spălat cu amestec acetat de etil/hexani (1/1) și recristalizat din etanol pentru a se obține, cu un randament de 85 %, compusul din titlu (309 mg, solid brun-portocaliu). SM (M+H, 284); ¹H RMN (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] Compusul a avut un IC₅₀ față de receptorul de gust amar hT2R14 de 2,75 μM.

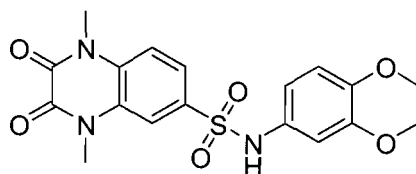
Exemplul 6-2: (E)-2-ciano-3-(furan-2-il)-N-(5-fenil-1,3,4-tiadiazol-2-il)acrilamidă



[00454] S-au menținut sub agitare în acetonitril (15 mL), 5-fenil-1,3,4-tiadiazol-2-amină (600 mg, 3,3 mmol), acid ciano acetic (300 mg, 3,6 mmol) și EDC-HCl (861 mg, 4,5 mmol) sub agitare la temperatura camerei timp de 2 ore. Amestecul a fost diluat cu soluție apoasă de HCl 1N și faza apoasă a fost extrasă cu acetat de etil. Extractele organice combinate au fost uscate pe sulfat de sodiu, filtrate și concentrate *in vacuo*. Reziduul a fost triturat cu amestec acetat de etil/hexani (1/9) pentru a se obține 2-ciano-N-(5-fenil-1,3,4-tiadiazol-2-il)acetamidă sub formă de solid alb, care a fost utilizat fără purificare ulterioară.

[00455] S-au amestecat 312 mg 2-ciano-N-(5-fenil-1,3,4-tiadiazol-2-il)acetamidă și 150uL furan-2-carbaldehidă în 2,5mL DMF și s-au încălzit într-un cuptor cu microunde la 150°C timp de 15 min. S-au adăugat 5ml H₂O și precipitatul rezultat a fost colectat și spălat cu apă (4 x) pentru a se obține produsul brut. Recristalizarea din etanol a condus la 180 mg produs solid brun. SM (M+H, 323); ¹H RMN (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] Compusul a avut un IC₅₀ față de receptorul de gust amar hT2R14 de 0,499μM.

Exemplul 6-3: N-(2,3-dihidrobenzo[b][1,4]dioxin-6-il)-1,4-dimetil-2,3-dioxo-1,2,3,4-tetrahydrochinoxalin-6-sulfonamidă

[00457] S-a adăugat 1,4-dimetil-2,3-dioxo-1,2,3,4-tetrahydrochinoxalin-6-sulfonil clorură (Exemplul 6-3a, 450 mg, 1,6 mmol) într-o soluție menținută sub agitare de 2,3-dihidrobenzo[b][1,4]dioxin-6-amină (215 mg, 1,4 mmol) și trietilamină (170 mg, 1,7 mmol) în diclormetan (10 mL). Reacția s-a menținut sub agitare la temperatura camerei peste noapte apoi s-a concentrat. Produsul brut s-a purificat prin cromatografie pe silica gel (0-30 % acetat de etil în hexani) pentru a furniza N-(2,3-dihidrobenzo[b][1,4]dioxin-6-il)-1,4-dimetil-2,3-dioxo-1,2,3,4-tetrahydrochinoxalin-6-sulfonamidă sub formă de produs solid alb. SM (M + H, 404,10); ¹H RMN (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] Compusul a avut un IC₅₀ față de receptorul de gust amar hT2R14 de 7,71 μM.

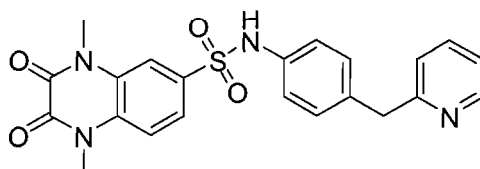
Exemplul 6-3a: 1,4-dimetil-2,3-dioxo-1,2,3,4-tetrahydrochinoxalin-6-sulfonil clorură

[00459] S-a încălzit acid clorsulfonic (3 mL) la 65 °C și s-a adăugat 1,4-dimetilchinoxalin-2,3(1H,4H)-dionă (Exemplul 6-3b, 1 g, 5,5 mmol) în porții în decurs de 0,5 ore. Amestecul de reacție a fost menținut sub agitare timp de 4 ore, apoi a fost răcit la temperatura camerei și turnat ușor peste gheață. Precipitatul rezultat a fost filtrat și spălat cu apă pentru a se obține 1,4-dimetil-2,3-dioxo-1,2,3,4-tetrahydrochinoxalin-6-sulfonil clorură sub formă de produs solid alb. ¹H RMN (400MHz, DMSO-d₆): δ, ppm: 3,50(s, 6H), 7,25(m, 2H), 7,38(m, 4H).

Exemplul 6-3b: 1,4-dimetilchinoxalin-2,3(1H,4H)-dionă

[00460] La o soluție de NaH (2,5 g) în DMF (200 mL) s-a adăugat, în porții, chinoxalin-2,3(1H,4H)-dionă (5 g), urmată de adăugarea lentă a iodurii de metil (3,8 mL). Amestecul de reacție a fost menținut sub agitare la temperatura camerei timp de 4 ore, apoi s-a adăugat apă (200 mL). Precipitatul rezultat a fost colectat prin filtrare și spălat cu apă pentru a se obține 1,4-dimetilchinoxalin-2,3(1H,4H)-dionă sub formă de solid alb cu un randament de 95 %. ¹H RMN (400MHz, DMSO-d₆): δ, ppm: 3,50(s, 6H), 7,25(m, 2H), 7,38(m, 4H).

Exemplul 6-4: 1,4-dimetil-2,3-dioxo-N-(4-(piridin-2-ilmetil)fenil)-1,2,3,4-tetrahydrochinoxalin-6-sulfonamidă

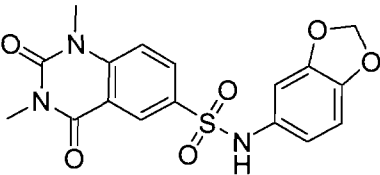
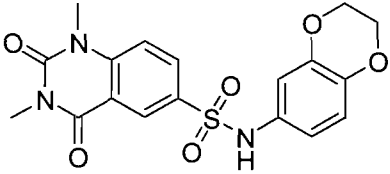
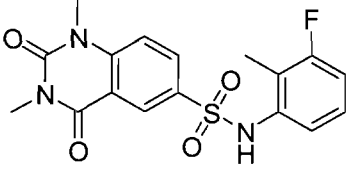
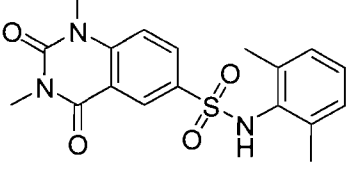


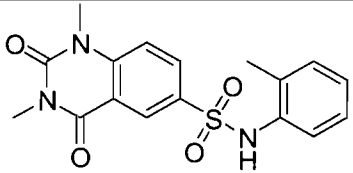
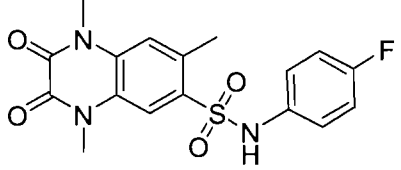
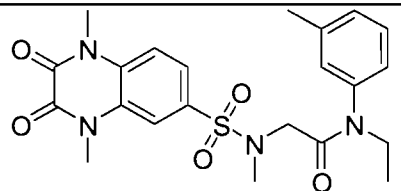
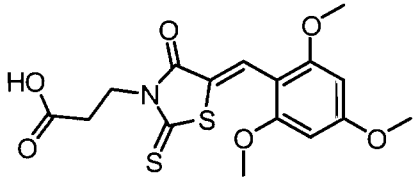
[00461] Compusul este disponibil comercial și a fost procurat prin Ryan Scientific.

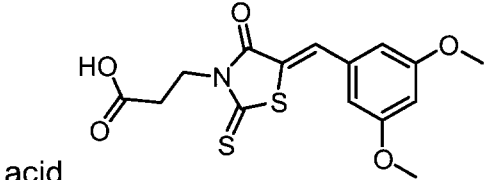
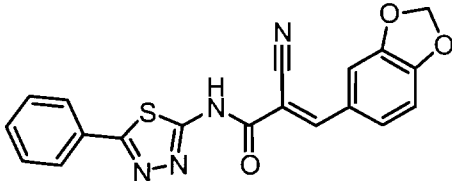
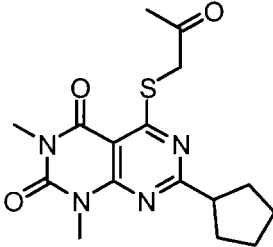
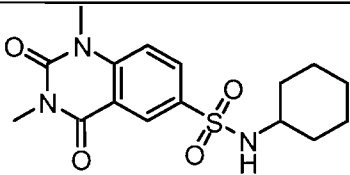
[00462] Compusul a avut un IC₅₀ față de receptorul de gust amar hT2R14 de 6,14 μM.

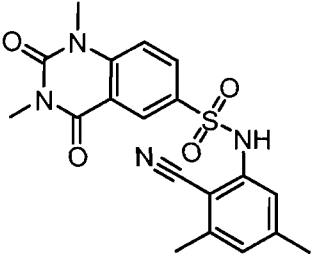
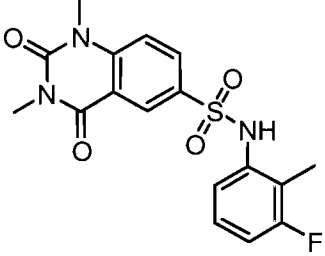
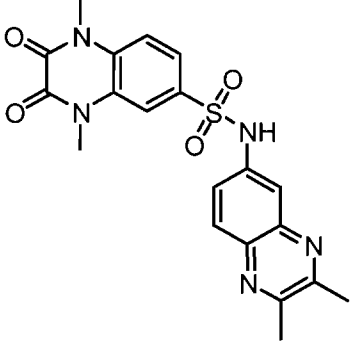
[00463] Compuși suplimentari au fost testați experimental și s-a constatat că prezintă un nivel relativ ridicat de eficiență ca inhibitori ai receptorului de gust amar hT2R14. Rezultatele acestor testări sunt prezentate mai jos în tabelul D.

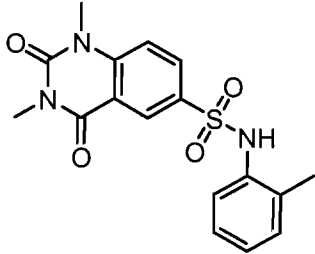
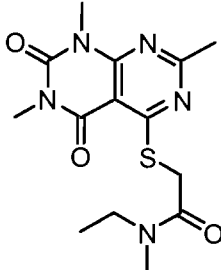
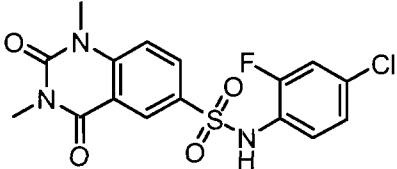
Tabelul D

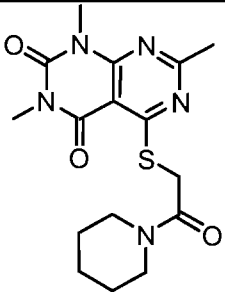
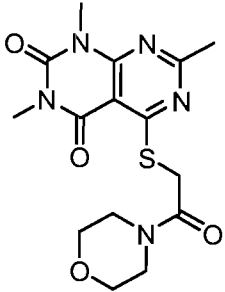
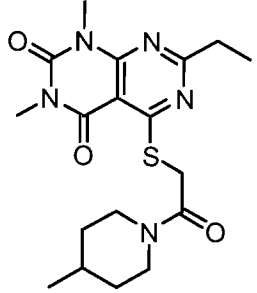
Compus Nr.	Compus	hT2R14 IC ₅₀ (μM)
6-5	 N-(benzo[d][1,3]dioxol-5-il)-1,3-dimetil-2,4-dioxo-1,2,3,4-tetrahidrochinazolin-6-sulfonamidă	0,264
6-6	 N-(2,3-dihidrobenzo[b][1,4]dioxin-6-il)-1,3-dimetil-2,4-dioxo-1,2,3,4-tetrahidrochinazolin-6-sulfonamidă	0,706
6-7	 N-(3-fluoro-2-metilfenil)-1,3-dimetil-2,4-dioxo-1,2,3,4-tetrahidrochinazolin-6-sulfonamidă	0,935
6-8	 N-(2,6-dimetilfenil)-1,3-dimetil-2,4-dioxo-1,2,3,4-tetrahidrochinazolin-6-sulfonamidă	

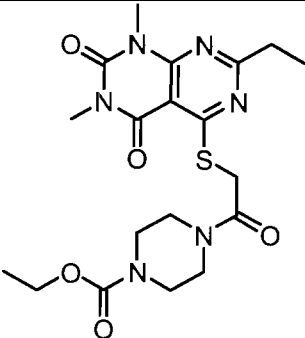
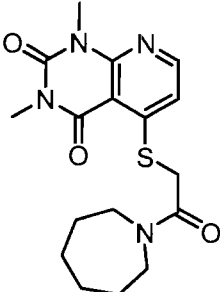
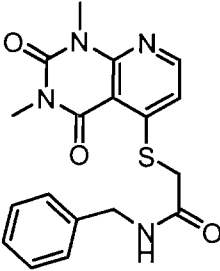
Compus Nr.	Compus	hT2R14 IC ₅₀ (μM)
6-9	 1,3-dimetil-2,4-dioxo-N-o-tolil-1,2,3,4-tetrahidrochinazolin-6-sulfonamidă	1,726
6-10	 N-(4-fluorofenil)-1,4,7-trimetil-2,3-dioxo-1,2,3,4-tetrahidrochinoxalin-6-sulfonamidă	12,623
6-11	 N-etil-N-m-tolil-2-(N,1,4-trimetil-2,3-dioxo-1,2,3,4-tetrahidrochinoxalin-6-sulfonamido)acetamidă	14,926
6-12	 acid (Z)-3-(4-oxo-2-tioxo-5-(2,4,6-trimetoxibenziliden)thiazolidin-3-il)propanoic	9,371

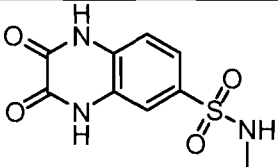
Compus Nr.	Compus	hT2R14 IC ₅₀ (μM)
6-13	 acid (Z)-3-(5-(3,5-dimetoxibenziliden)-4-oxo-2-tioxotiazolidin-3-il)propanoic	5,378
6-14	 (E)-3-(benzo[d][1,3]dioxol-5-il)-2-ciano-N-(5-fenil-1,3,4-tiadiazol-2-il)acrilamidă	2,906
6-15	 7-ciclopentil-1,3-dimetil-5-(2-oxopropiltio)pirimido[4,5-d]pirimidin-2,4(1H,3H)-dionă	5,428
6-16	 N-ciclohexil-1,3-dimetil-2,4-dioxo-1,2,3,4-tetrahidrochinazolin-6-sulfonamidă	7,239

Compus Nr.	Compus	hT2R14 IC ₅₀ (μM)
6-17	 N-(2-ciano-3,5-dimetilfenil)-1,3-dimetil-2,4-dioxo-1,2,3,4-tetrahydrochinazolin-6-sulfonamidă	1,946
6-18	 N-(3-fluoro-2-metilfenil)-1,3-dimetil-2,4-dioxo-1,2,3,4-tetrahydrochinazolin-6-sulfonamidă	0,935
6-19	 N-(2,3-dimetilchinoxalin-6-il)-1,4-dimetil-2,3-dioxo-1,2,3,4-tetrahydrochinoxalin-6-sulfonamidă	6,332

Compus Nr.	Compus	hT2R14 IC ₅₀ (μM)
6-20	 1,3-dimetil-2,4-dioxo-N-o-tolil-1,2,3,4- tetrahydrochinazolin-6-sulfonamidă	1,726
6-22	 N-etil-N-metil-2-(2,6,8-trimetil-5,7-dioxo- 5,6,7,8-tetrahidropirimido[4,5- d]pirimidin-4-iltio)acetamidă	0,861
6-23	 N-(4-clor-2-fluorofenil)-1,3-dimetil-2,4- dioxo-1,2,3,4-tetrahydrochinazolin-6- sulfonamidă	9,703

Compus Nr.	Compus	hT2R14 IC ₅₀ (μM)
6-24	 1,3,7-trimetil-5-(2-oxo-2-(piperidin-1-il)etiltio)pirimido[4,5-d]pirimidin-2,4(1H,3H)-dionă	0,292
6-25	 1,3,7-trimetil-5-(2-morfolin-2-oxoetiltio)pirimido[4,5-d]pirimidin-2,4(1H,3H)-dionă	1,006
6-26	 7-etil-1,3-dimetil-5-(2-(4-metilpiperidin-1-il)-2-oxoetiltio)pirimido[4,5-d]pirimidin-2,4(1H,3H)-dionă	0,721

Compus Nr.	Compus	hT2R14 IC ₅₀ (μM)
6-27	 etil 4-(2-(2-etil-6,8-dimetil-5,7-dioxo-5,6,7,8-tetrahidropirimido[4,5-d]pirimidin-4-iltio)acetil)piperazin-1-carboxilat	0,763
6-28	 5-(2-(azepan-1-il)-2-oxoetiltio)-1,3-dimetilpirido[2,3-d]pirimidin-2,4(1H,3H)-dionă	2,377
6-29	 N-benzil-2-(1,3-dimetil-2,4-dioxo-1,2,3,4-tetrahidropirido[2,3-d]pirimidin-5-iltio)acetamidă	0,710

Compus Nr.	Compus	hT2R14 IC ₅₀ (μM)
6-30	 N-metil-2,3-dioxo-1,2,3,4-tetrahydrochinoxalin-6-sulfonamidă	6,234

Tabelul 7: Rezultate reprezentative ale examinării față de 23 de receptori de gust amar

[00464] Compușii din Exemplele 5 și 6 de mai sus au fost examinați față de un număr de 23 de receptori de gust amar. Receptorii de gust amar au fost activați la EC80 cu agonistul corespunzător și apoi au fost tratați cu compușii de mai sus la o concentrație de 25μM. Datele au fost prezentate în tabelul de mai jos.

Inhibare 80% sau mai mare = ++++

Inhibare 60% la 80% = +++

Inhibare 40% la 60% = ++

Inhibare 20% la 40% = +

Example	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		+	+		+			+		++		++			++++	++++	++++	++++		+	++	+
5-6		+	+		+			++		++++	+	++	++	+	++++	++++	++++	++++	+		++	+
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							+		+				++	+++	+		+	+	

Example	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										+		+				+++	++++					
5-58		+++		+	+++			+++		++++	+	+++	+	+++	+++	++++	++++	+++	++++	+	++++	+
5-17					+			+++		++++	+	+++		++	++++	++++	++++	++++	++		++	+
5-37		+								++++		+++			++++	++++	+	+++	++		+++	
5-1		++++		+	++		+	++++	+	++++	++	+++	+++	++	++++	++++	++++	+++	++	+	++++	++
5-16		++		+				+		+		+++			++++	+++	++	++++			++	+
5-92		+		+	+			+		++++	+	++++			++++	++++	++++	++++			++	
5-91		+++		+				++		++++	+	+++		+	++++	++++	++++	++++		+	+++	
5-1		+++	+	++	++		++	+++	+	++++	++	+++	+++	++	++++	++++	++++	+++	+++	+	+++	+
5-13		++		+	+			+		++++	+	+++	+	+++	++++	++++	++++	+++	+		++	
5-15		+		+	+		+	++		+++	+	+++			++++	++++	+++	+++			++	
5-19		+		+				+		++++	+	++		+	++++	+++	++	+++			++	
5-16		+++	+		+		+	+		+	+	++			++++	++++	+++	+++	+		++	
5-1		+++	++	+	++		++	+++	+	++++	++	+++	+++	++	++++	++++	++++	+++	+++	++	+++	++
5-17		+	+					+		+++				++	++++	++++	++	++			+	+
5-1		++		++	++			++	+	++++	+++	+++	++++	++	++++	++++	++++	+++	+++	++	+++	+
5-30		++	396	+	+			++	+	++++	++	+++	++	+++	++++	++++	++++	++++	+++	++	+++	++
5-96		+	+						+	++++	+	+++			++++	++++	++++	+++	++++	+	++	
5-95		++		+	+			+		++++	++	+++	+		++++	++++	++++	+++	+++	+	++	+
5-97										+	+++	+				+	+++	+				
5-50		++	565	+	+			+	+	++++	++	+++	+		++++	++++	++++	+++	++	++	+++	
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			++		+							+				+	+++	+++			+	
5-93		+	++	+	+			++		++++	++	+++	++	+++	++++	++++	++++	++++	+++	+++	+++	
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				331						++++							++	+	+			
6-9					++					++++		+				+	+					
6-3									+	++++		+					+				+	
6-8										+												
6-7					+					++							+					
6-11				+	+				++	+						+					+	
6-10		+		+	+				++	++		+				+		+				
6-4				+			+		+++	+++		+				+	+					
6-5			717							++++		++				+	++++	278	++		+++	
6-1		+	3866		932			++++		++++	+	++			+	++	+	+++	+		+	+
6-6			895							++++				+	210			447				

Exemplul 7. Date senzoriale pentru Exemplul 10-10

[0465] Pentru a determina eficiența unui antagonist individual a fost efectuat testul de gust cu un agonist specific T2R8, compusul de testat și un blocant al gustului amar, de referință. Noi am descris mai înainte un bun antagonist hT2R8, care a fost probat ca având un efect asupra gustului, Exemplele 4-8 din cererea provizorie U.S. Ser. Nr. 60/957.129, înregistrată în 21 august 2007: N-(1-((3,5-dimetilizoxazol-4-il)metil)-1H-pirazol-4-il)benzo[d][1,3]dioxol-5-carboxamida. S-a arătat că el însuși reduce gustul amar al cafelei, dar și în combinație cu blocant al gustului amar cu spectru larg). După cum s-a arătat în Tabelul 6, atunci când a fost comparat cu antagonistul nostru de control (Exemplul 10-8), antagonistul hT2R8 din Exemplul 10-10 a indicat o capacitate mai mare de a bloca gustul amar perceput.

Exemplul Numărul	Test HTS IC ₅₀	Selectat ca fiind mai amar		Valoare p	Conc. antagonist
	μM	10-8	+ altul		μM
10-10	0,02- 0,04	14	2	0,004	1

Tabel 6. Rezultatele testului gustului comparând un blocant de control al gustului amar și un blocant mai puternic al gustului amar 10-10.

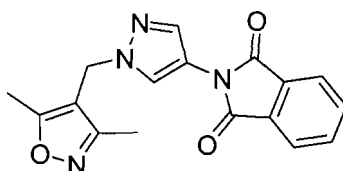
[0466] După cum s-a demonstrat în testele gustului din acest exemplu, percepția gustului amar poate fi redusă sau eliminată prin încorporarea antagoniștilor de hT2R8 și antagonistul din Exemplul 10-10 apare a fi un analog mai puternic când este comparat cu antagoniști ai gustului amar cunoscuți precum N-(1-((3,5-dimetilizoxazol-4-il)metil)-1H-pirazol-4-il)benzo [d][1,3] dioxol-5-carboxamida (7767). Ca urmare, percepția gustului amar poate fi redusă sau eliminată prin încorporarea de antagoniști de hT2R8 în compoziții precum alimente, băuturi și/sau medicamente unde gustul amar este extras de agoniști T2R8.

Exemplul 8. Identificarea antagoniștilor de hT2R8

[0467] Pentru a identifica antagoniștii, au fost generate linii celulare stabile care exprimă hT2R8 împreună cu proteina himerică eterogenă G16g44 așa cum s-a descris în cererile de brevet anterioare. S-a stabilit un test cu capacitate de prelucrare mare utilizând linii celulare stabile și FLIPR (Fluorescent Imaging Plate Reader). S-a utilizat un agonist de hT2R8 pentru a activa receptorii până la 70-80% din respectiva lor activitate maximă. Pentru hT2R8, agonistul utilizat a fost andrografolida (200 μ M). Pentru a identifica antagoniștii, împreună cu agonistul au fost adăugați compuși cu diferite structuri chimice. Compușii care provoacă în mod statistic reducerea semnificativă a activității receptorului sunt adunați împreună și reconfirmați prin curbele de inhibare dependente de doză. Au fost identificate structurile A și structurile B ca antagoniști de hT2R8 (Fig. 1). Exemplele specifice sunt prezentate în Tabelul 1.

Exemplul 9. Antagoniști de hT2R8

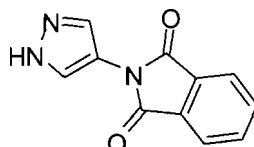
Exemplul 9-1: 2-(1-((3,5-dimetilizoxazol-4-il)metil)-1H-pirazol-4-il)izoindolin-1,3-dionă



[0468] 2-(1H-pirazol-4-il)izoindolin-1,3-dionă (Exemplul 9-1a) (1,5 g, 7 mmol), 4-(clorometil)-3,5-dimetilizoxazol (1,5 g, 10 mmol) și carbonat de cesiu (3,3g, 10 mmol) au fost agitați în DMF (20 mL) la 80°C timp de 3 ore. Reacția a fost răcită, diluată cu H₂O (150 mL) și extrasă cu acetat de etil (3x, 75 mL). Extractele organice combinate au fost uscate pe sulfat de sodiu, filtrate și concentrate pe evaporator rotativ. Produsul solid a fost triturat cu acetat de etil/hexani (1/9) și recristalizat din etanol absolut (30 mL) la reflux, pentru a da 2-(1-((3,5-dimetilizoxazol-4-il)metil)-1H-pirazol-4-il)izoindolin-1,3-dionă (900 mg, 38%) sub formă de solid galben deschis strălucitor. ¹H RMN (DMSO-d₆, 400 MHz) δ 1,36 (d, 3H, J 2,16 (s, 3H), 2,41 (s,

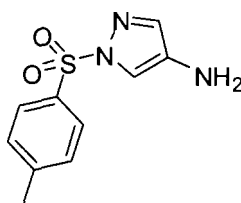
3H), J=7,2 Hz), 5,22 (s, 2H), 7,81 (s, 1H), 7,91-7,83 (m, 4H), 8,21 (s, 1H). MS M+H calculat 323,11; găsit 323,1. Punct de topire: 170-171°C. Compusul din titlu s-a dovedit a fi inhibitor al receptorului de gust amar hT2R08 și că are un IC₅₀ de 0,18 μM.

Exemplul 9-1a: 1-tosil-1H-pirazol-4-amina.



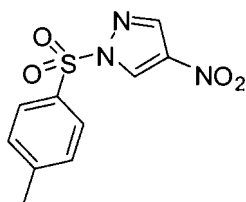
[0469] 1-tosil-1H-pirazol-4-amina (Exemplul 9-1b) (3g, 12,7 mmol) și izobenzofuran-1,3-diona (1,9 g, 13 mmol) au fost agitate în DMF/acetonitril (1/1) (20 mL) la 100°C timp de 1 oră. Amestecul a fost răcit și diluat cu H₂O. Precipitatul a fost colectat prin filtrare, spălat cu apă suplimentară, urmată de spălare cu acetat de etil și hexani. Produsul solid a fost uscat sub vid înaintat pentru a da 2-(1H-pirazol-4-il)izindolin-1,3-dionă (2,5 g, 92%) sub formă de solid galben. MS M+H calculat 214,1; găsit 214,1. ¹H RMN (CDCl₃, 400 MHz) δ 7,93-8,10 (m, 6H), 13,03 (bs, 1H).

Exemplul 9-1b: 1-tosil-1H-pirazol-4-amina.



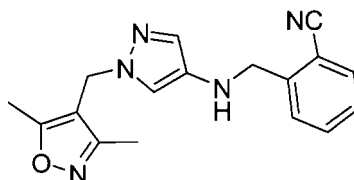
[0470] 4-nitro-1-tosil-1H-pirazol (Exemplul 9-1c) (3 g, 11,2 mmol) și 10 % paladiu pe cărbune (800 mg) în MeOH (150 mL) au fost agitați sub 2 atmosfere de hidrogen într-un hidrogenator Parr timp de 3 ore. Amestecul a fost filtrat prin celită, concentrat și purificat prin cromatografie pe silicagel (80% acetat de etil în hexani) pentru a da 1-tosil-1H-pirazol-4-amină (1,9 g, 71%) sub formă de solid roz. ¹H RMN (CDCl₃, 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).

Exemplul 9-1c: 4-nitro-1-tosil-1H-pirazol.



[0471] 4-nitro-1H-pirazol (500 mg, 4,4 mmol), clorură de 4-metilbenzen-1-sulfonil (840 mg, 4,4 mmol) și trietilamină (510 mg, 5 mmol) au fost agitate în DMF (25 mL) la 80°C timp de 1 oră. Reacția a fost răcită, diluată cu H₂O (200 mL) și extrasă cu acetat de etil (3x, 100 ml). Faza organică a fost spălată cu soluție apoasă 1N de HCl (200 mL) și cu H₂O (200 mL), uscată pe sulfat de sodiu, filtrată și concentrată pe evaporator rotativ. Solidul a fost triturat cu hexani pentru a da 4-nitro-1-tosil-1H-pirazol (600 mg, 50%) sub formă de solid alburui. ¹H RMN (DMSO-d₆, 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).

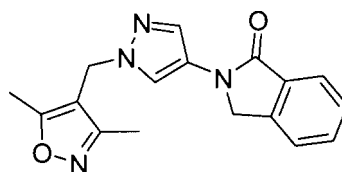
Exemplul 9-2: 2-((1-((3,5-dimetilizoxazol-4-il)metil)-1H-pirazol-4-ilamino)metil)benzonitril



[0472] Clorhidrat de 1-((3,5-dimetilizoxazol-4-il)metil)-1H-pirazol-4-amină (100 mg, 0,44 mmol), 2-(bromometil)benzonitril (115 mg, 0,6 mmol) și trietilamină (0,5 mL, 3,5 mmmol) în DMF (3 mL) au fost iradiate și agitate într-un reactor cu microunde la 80°C timp de 10 minute. Reacția a fost răcită, diluată cu H₂O (50 mL) și extrasă cu acetat de etil (3x, 30 mL). Extractele organice combinate au fost uscate pe sulfat de sodiu și concentrate pe evaporator rotativ. Reziduul a fost dizolvat în etanol (70 mL), H₂O (3 mL) și acetic acid (1 mL) și amestecul a fost refluxat timp de 2 ore. Soluția a fost concentrată pe evaporator rotativ, reluată în metanol (3 mL) și purificată prin HPLC cu fază inversă în 3-1 mL părți alicote (gradient 5 la 95% acetonitril în H₂O: 16 minute). Frațiile pure au fost combinate și concentrate pe evaporator rotativ. Reziduul a fost triturat cu acetat de etil/hexani (1/9) pentru a da 2-(1-((3,5-dimetilizoxazol-4-il)metil)-1H-pirazol-4-il)izoindolin-1-onă (85 mg, 61%) sub formă de

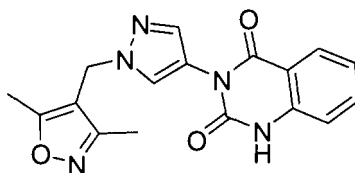
solid pur, alb. ^1H RMN (DMSO- d_6 , 400 MHz): δ 2,18 (s, 3H), 2,43 (s, 3H), 4,97 (s, 2H), 5,18 (s, 2H), 7,58-7,68 (m, 3H), 7,77 (s, 1H), 8,10 (d, J = 8 Hz, 1H), 8,27 (s, 1H), 9,19 (bs, 1H). Compusul din titlu s-a dovedit a fi inhibitor al receptorului de gust amar hT2R08 și are o valoare IC_{50} mai mare de 30 μM .

Exemplul 9-3: 2-(1-((3,5-dimetilizoxazol-4-il)metil)-1H-pirazol-4-il)izoindolin-1-onă



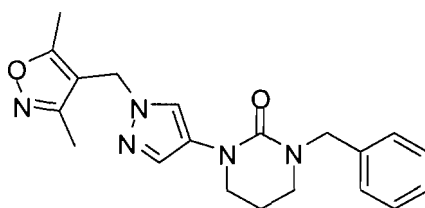
[0473] 2-((1-((3,5-dimetilizoxazol-4-il)metil)-1H-pirazol-4-ilamino)metil)benzonitril (Exemplul 9-2) (30 mg, 0,14 mmol) a fost agitat într-un amestec de MeOH/ soluție apoasă 2N de NaOH (5 mL) la 100°C timp de 30 minute într-un reactor cu microunde. Reacția a fost acidulată cu soluție apoasă 1N de HCl (100 mL) și extrasă cu acetat de etil (3x, 70 mL). Extractele organice combinate au fost uscate pe sulfat de sodiu și concentrate. Reziduul a fost dizolvat în MeOH (3 mL) și purificat prin HPLC cu fază inversă în 2-1,5 mL părți alicote (gradient 5 la 95% acetonitril în H_2O : 16 minute). Frațiile pure au fost combinate și concentrate pentru a da 2-(1-((3,5-dimetilizoxazol-4-il)metil)-1H-pirazol-4-il)izoindolin-1-onă (21 mg, 50%) sub formă de solid pur, alb. ^1H RMN (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). Compusul din titlu s-a dovedit a fi inhibitor al receptorului de gust amar hT2R08 și are un IC_{50} de 11 μM .

Exemplul 9-4: 3-(1-((3,5-dimetilizoxazol-4-il)metil)-1H-pirazol-4-il)chinazolin-2,4 (1H,3H)-dionă



[0474] Clorhidrat de 1-((3,5-dimetilizoxazol-4-il)metil)-1H-pirazol-4-amină (75 mg, 0,33 mmol), 2-izocianatobenzoat de metil și trietilamină (200 mg, 2 mmol) în acetonitril (3 mL) au fost iradiate într-un reactor cu microunde la 100°C timp de 30 minute. Reacția a fost răcită, diluată cu H₂O (75 mL) și extrasă cu acetat de etil (3x, 50 mL). Extractele organice combinate au fost uscate pe sulfat de sodiu, filtrate și concentrate pe evaporator rotativ. Reziduul a fost purificat prin cromatografie pe silicagel (75% acetat de etil în hexani) pentru a da 3-(1-((3,5-dimetilizoxazol-4-il)metil)-1H-pirazol-4-il)chinazolin-2,4(1H,3H)-dionă (20 mg, 18%) sub formă de solid roz deschis. ¹H RMN (DMSO-d₆, 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). Compusul din titlu s-a dovedit a fi inhibitor al receptorului de gust amar hT2R08 și are un IC₅₀ de 1,5 μM.

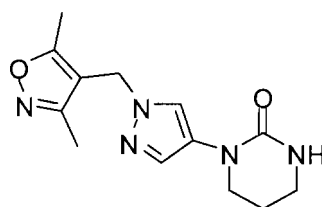
Exemplul 9-5: 1-benzil-3-(1-((3,5-dimetilizoxazol-4-il)metil)-1H-pirazol-4-il)tetrahidropirimidin-2(1H)-onă



[0475] 1-(1-((3,5-dimetilizoxazol-4-il)metil)-1H-pirazol-4-il)tetrahidropirimidin-2(1H)-onă (Exemplul 9-5a) (50 mg, 0,18 mmol) și hidrură de sodiu 60% (8 mg, 0,20 mmol) în DMF (3 mL) au fost agitate la temperatura camerei timp de 15 minute apoi răcite la 0°C. La amestec s-a adăugat bromură de benzil (31 mg, 0,18 mmol) și a fost lăsat să se încălzească la temperatura camerei, apoi a fost agitat timp de 2 ore. Reacția a fost stopată cu metanol și concentrată. Reacția a fost diluată cu saramură (50 mL) și extrasă cu diclorometan (2x, 50 mL). Extractele organice combinate au fost uscate

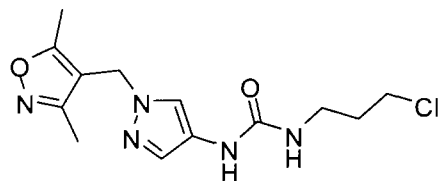
pe sulfat de magneziu, filtrate și concentrate pe evaporator rotativ. Reziduul a fost prelucrat în diclormetan (5 mL) și purificat prin cromatografie pe coloană de silicagel (gradient 100% la 90% diclormetan în metanol: 30 minute) pentru a da 1-benzil-3-((3,5-dimetilizoxazol-4-il)metil)-1*H*-pirazol-4-il)tetrahidropirimidin-2(1*H*)-onă (20 mg, 30%) sub formă de solid alb. ¹H RMN (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]⁺ calculat pentru C₂₀H₂₃N₅O₂; anticipat 366,19; găsit 366,15. Compusul din titlu s-a dovedit a fi inhibitor al receptorului de gust amar hT2R08 și are un IC₅₀ de 1,65 μM.

Exemplul 9-5a: 1-(1-((3,5-dimetilizoxazol-4-il)metil)-1*H*-pirazol-4-il)tetrahidropirimidin-2(1*H*)-onă



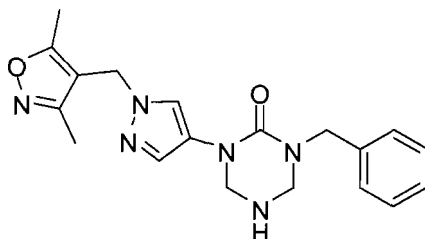
[0476] 1-(3-cloropropil)-3-(1-((3,5-dimetilizoxazol-4-il)metil)-1*H*-pirazol-4-il)uree (Exemplul 9-5b) (200 mg, 0,64 mmol) și hidrură de sodiu 60% (28 mg, 0,71 mmol) în DMF (2 mL) au fost agitate la 0°C timp de 15 minute apoi au fost lăsate să se încălzească până la temperatura camerei și s-au agitat timp de 2 ore. Reacția a fost stopată cu metanol și concentrată. Reacția a fost diluată cu saramură (50 mL) și extrasă cu diclormetan (2x, 50 mL). Extractele organice combinate au fost uscate pe sulfat de magneziu, filtrate și concentrate. Reziduul a fost prelucrat în diclormetan (5 mL) și purificat prin cromatografie pe coloană de silice (gradient 100% la 90% diclormetan în metanol: 30 minute) pentru a da 1-(1-((3,5-dimetilizoxazol-4-il)metil)-1*H*-pirazol-4-il)tetrahidropirimidin-2(1*H*)-onă (84 mg, 48%) sub formă de solid alb. ¹H RMN (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]⁺ calculat pentru C₁₃H₁₇N₅O₂; anticipat 276,14; găsit 276,10.

Exemplul 9-5b: 1-(3-cloropropil)-3-(1-((3,5-dimetilizoxazol-4-il)metil)-1*H*-pirazol-4-il)urea



[0477] 1-((3,5-dimetilizoxazol-4-il)metil)-1*H*-pirazol-4-amină (342mg, 1,78 mmol) și 2-cloropropil izocianat (213mg, 1,78 mmol) în acetonitril (5 mL) au fost încălziți la 65°C timp de 16 ore. Reacția a fost răcită la temperatura camerei, concentrată și reziduul a fost dizolvat în diclormetan (5 mL) și purificat prin cromatografie pe coloană de silice (gradient 100% la 90% diclormetan în metanol: 30 minute). Frațiile pure au fost combinate și concentrate, apoi triturate cu acetat de etil/hexani (1/9) pentru a da (1-(3-cloropropil)-3-(1-((3,5-dimetilizoxazol-4-il)metil)1*H*-pirazol-4-il)urea (218 mg, 39%) sub formă de solid alb. LC/MS; [M+H] calculat pentru C₁₂H₁₆ClN₅O₂; anticipat 298,10; găsit 298,10.

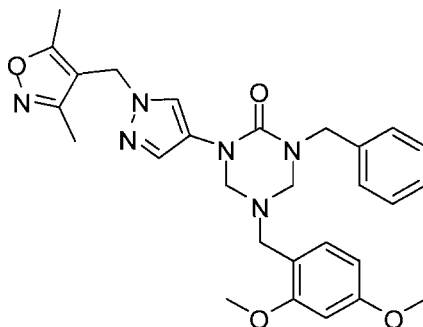
Exemplul 9-6: 1-benzil-3-(1-((3,5-dimetilizoxazol-4-il)metil)-1*H*-pirazol-4-il)-1,3,5-triazinan-2-onă



[0478] 1-benzil-5-(2,4-dimetoxibenzil)-3-(1-((3,5-dimetilizoxazol-4-il)metil)-1*H*-pirazol-4-il)-1,3,5-triazinan-2-onă (Exemplul 9-6a) (44mg, 0,09 mmol), anisol (9 mg, 0,09 mmol) și soluție 50% de acid trifluoracetic /diclormetan (1 mL) în diclormetan (1 mL) au fost agitate la temperatura camerei timp de 2 ore. Reacția a fost concentrată, stopată cu bicarbonat de sodiu saturat (50 mL), extrasă cu acetat de etil (2x, 50 mL) și spălată cu saramură (50 mL). Extractele organice combinate au fost uscate pe sulfat de magneziu, filtrate și concentrate. Purificarea prin cromatografie pe coloană de silice (gradient 100% la 90% diclormetan în metanol: 30 minute) a dat 1-benzil-3-(1-((3,5-dimetilizoxazol-4-il)metil)-1*H*-pirazol-4-il)-1,3,5-triazinan-2-onă (19 mg, 62%)

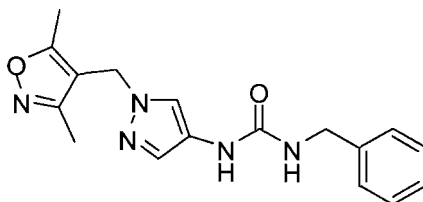
sub formă de solid alb. LC/MS; [M+H] calculat pentru $C_{19}H_{22}N_6O_2$; anticipat 367,18; găsit 367,20. Compusul din titlu s-a dovedit a fi inhibitor al receptorului de gust amar hT2R08 și are un IC_{50} de 5,84 μM .

Exemplul 9-6a: 1-benzil-5-(2,4-dimetoxibenzil)-3-(1-((3,5-dimetilizoxazol-4-il)metil)-1H-pirazol-4-il)-1,3,5-triazinan-2-onă



[0479] 1-Benzil-3-(1-((3,5-dimetilizoxazol-4-il)metil)-1H-pirazol-4-il)urea (Exemplul 9-6b) (50 mg, 0,15 mmol), 2,4-metoxi benzil amină (26 mg, 0,15 mmol) și formaldehidă (37% gr. în apă) (25 mg, 0,31 mmol) au fost încălzite la 100°C timp de 16 ore. Reacția a fost răcită la temperatura camerei, diluată cu saramură (50 mL) și extrasă cu diclormetan (2x, 50 mL). Extractele organice combinate au fost uscate pe sulfat de magneziu, filtrate și concentrate. Reziduul a fost purificat prin cromatografie pe coloană de silice (gradient 100% la 90% diclormetan în metanol: 30 minute) pentru a da 1-benzil-5-(2,4-dimetoxibenzil)-3-(1-((3,5-dimetilizoxazol-4-il)metil)-1H-pirazol-4-il)-1,3,5-triazinan-2-onă (44 mg, 56%) sub formă de ulei. LC/MS; [M+H] calculat pentru $C_{28}H_{32}N_6O_4$; anticipat 517,25; găsit 517,20.

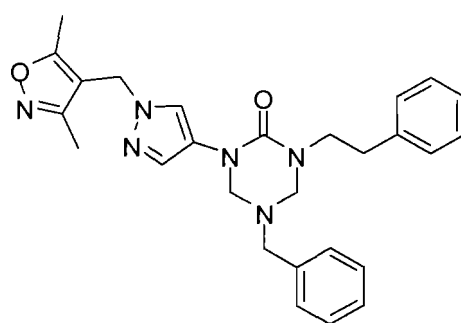
Exemplul 9-6b: 1-benzil-3-(1-((3,5-dimetilizoxazol-4-il)metil)-1H-pirazol-4-il)urea



[0480] 1-((3,5-dimetilizoxazol-4-il)metil)-1H-pirazol-4-amină (287 mg, 1,49 mmol) și benzil izocianat (199 mg, 1,49 mmol) în acetonitril (5 mL) au fost încălziți la 65°C timp

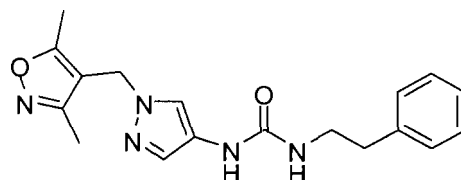
de 16 ore. Reacția a fost răcită la temperatura camerei și concentrată. Reziduul a fost purificat prin cromatografie pe coloană de silice (gradient 100% la 90% diclormetan în metanol: 30 minute) și triturat cu acetat de etil/hexani (1/9) pentru a da 1-benzil-3-(1-((3,5-dimetilizoxazol-4-il)metil)-1*H*-pirazol-4-il)urea (246 mg, 51%) sub formă de solid alb. LC/MS; [M+H] calculat pentru C₁₇H₁₉N₅O₂; anticipat 326,15; găsit 326,10.

Exemplul 9-7: 5-benzil-1-(1-((3,5-dimetilizoxazol-4-il)metil)-1*H*-pirazol-4-il)-3-fenetil-1,3,5-triazinan-2-onă



[0481] Preparată ca în Exemplul 9-6a din 1-(1-((3,5-dimetilizoxazol-4-il)metil)-1*H*-pirazol-4-il)-3-fenetiluree (Exemplul 9-7a), formaldehidă și benzil amină. Randament: 15%. ¹H RMN (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] calculat pentru C₂₇H₃₀N₆O₂; anticipat 471,24; găsit 471,15. Compusul din titlu s-a dovedit a fi inhibitor al receptorului de gust amar hT2R08 și are un IC₅₀ de 2,64 μM.

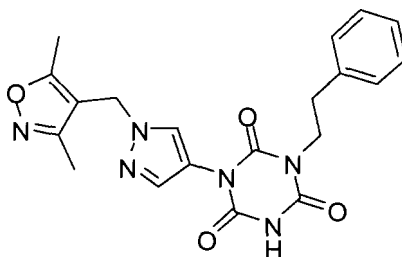
Exemplul 9-7a: 1-(1-((3,5-dimetilizoxazol-4-il)metil)-1*H*-pirazol-4-il)-3-fenetilurea



[0482] Preparată ca în Exemplul 9-6b din 1-((3,5-dimetilizoxazol-4-il)metil)-1*H*-pirazol-4-amină și fenetil izocianat. Randament: 29%. ¹H RMN (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),

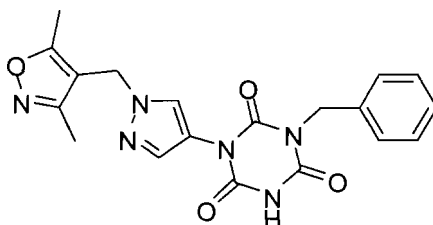
5,02 (s, 2H), 6,00 (t, $J = 5,8$ Hz, 1H), 7,16-7,30 (m, 6H), 7,68 (s, 1H), 8,13 (s, 1H). LC/MS; $[M+H]$ calculat pentru $C_{18}H_{21}N_5O_2$; anticipat 340,17; găsit 340,20.

Exemplul 9-8: 1-(1-((3,5-dimetilizoxazol-4-il)metil)-1H-pirazol-4-il)-3-fenetil-1,3,5-triazinan-2,4,6-trionă



[0483] 1-(1-((3,5-dimetilizoxazol-4-il)metil)-1H-pirazol-4-il)-3-fenetilurea (Exemplul 9-7a) (100 mg, 0,29 mmol) în THF (2 mL) a fost răcită la 0°C și s-a adăugat lent n-clorocarbonil izocianat (93 mg, 0,88 mmol). După adăugare, reacția a fost lăsată să se încălzească la temperatura camerei și s-a agitat timp de 1 oră. Reacția a fost concentrată și reziduul a fost purificat prin cromatografie pe coloană de silice (gradient 100% la 90% diclormetan în metanol: 30 minute) pentru a da 1-(1-((3,5-dimetilizoxazol-4-il)metil)-1H-pirazol-4-il)-3-fenetil-1,3,5-triazinan-2,4,6-trionă (100 mg, 83%) sub formă de solid alb. 1H RMN ($DMSO-d_6$, 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; $[M+H]$ calculat pentru $C_{20}H_{20}N_6O_4$; anticipat 409,15; găsit 409,20. Compusul din titlu s-a dovedit a fi inhibitor al receptorului de gust amar hT2R08 și are un IC_{50} de 3,03 μM .

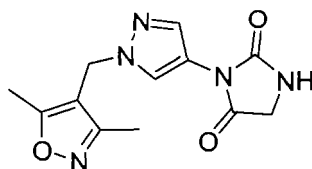
Exemplul 9-9: 1-benzil-3-(1-((3,5-dimetilizoxazol-4-il)metil)-1H-pirazol-4-il)-1,3,5-triazinan-2,4,6-trionă



[0484] 1-benzil-3-(1-((3,5-dimetilizoxazol-4-il)metil)-1*H*-pirazol-4-il)urea (Exemplul 95b) (100 mg, 0,31 mmol) în THF (2 mL) a fost răcită la 0°C și s-a adăugat lent *n*-clorocarbonil izocianat (97 mg, 0,92 mmol). După adăugare, reacția a fost lăsată să se încălzească la temperatura camerei și agitată timp de 1 oră. Reacția a fost concentrată și reziduul a fost purificat prin cromatografie pe coloană de silice (gradient 100% la 90% diclormetan în metanol: 30 minute) pentru a da 1-benzil-3-(1-((3,5-dimetilizoxazol-4-il)metil)-1*H*-pirazol-4-il)-1,3,5-triazinan-2,4,6-trionă (112 mg, 93%) sub formă de solid alb. ¹H RMN (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; [M+H]⁺ calculat pentru C₁₉H₁₈N₆O₄; anticipat 395,14; găsit 395,15. Compusul din titlu s-a dovedit a fi inhibitor al receptorului de gust amar hT2R08 și are un IC₅₀ de 1,14 μM.

Exemplul 10. Antagoniști de hT2R8 : Obținerea compușilor invenției

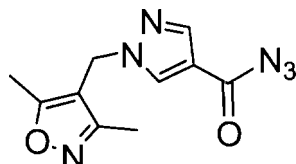
Exemplul 10-1: 3-(1-((3,5-dimetilizoxazol-4-il)metil)-1*H*-pirazol-4-il)imidazolidin-2,4-dionă



[0485] 1-((3,5-dimetilizoxazol-4-il)metil)-1*H*-pirazol-4-carbonil azida (Exemplul 10-1a) (6 g, 25,5 mmol) în toluen (100 mL) a fost refluxată timp de 1 oră și răcită la temperatura ambiantă sub atmosferă de azot. S-a adăugat clorhidrat de ester metilic al glicinei (3,1 g, 26 mmol) și trietilamină (3,2 g, 32 mmol). Amestecul a fost refluxat timp de 16 ore. Reacția a fost răcită și solventul a fost îndepărtat pe evaporator rotativ. Solidul a fost redizolvat în acetat de etil (100 mL) și faza organică a fost spălată cu soluție 1N de HCl (2x, 150 mL). Faza apoasă a fost extrasă din nou cu acetat de etil (2x, 75 mL) și extractele organice combinate au fost uscate pe sulfat de sodiu și concentrate. Solidul care rezultă a fost triturat cu acetat de etil/hexani (1/9) și uscat sub vid înaintat pentru a da 3-(1-((3,5-dimetilizoxazol-4-il)metil)-1*H*-pirazol-4-

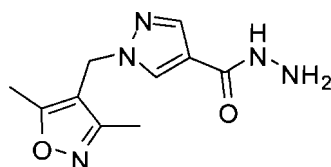
il)imidazolidin-2,4-dionă (5,2 g, 74%) sub formă de solid alb. ^1H RMN (DMSO-d_6 , 400 MHz): δ 2,19 (s, 3H), 2,42 (s, 3H), 4,09 (s, 2H), 5,06 (s, 2H), 5,68 (bs, 1H), 7,90 (s, 1H), 8,05 (1H). Compusul din titlu s-a dovedit a fi inhibitor al receptorului de gust amar hT2R08 și are IC_{50} de 1,7 μM .

Exemplul 10-1a: 1-((3,5-dimetilizoxazol-4-il)metil)-1H-pirazol-4-carbonil azida



[0486] S-a adăugat în picături azotit de sodiu (450 mg, 6,5 mmol, în H_2O) (10 mL) timp de 10 minute, la o suspensie de 1-((3,5-dimetilizoxazol-4-il)metil)-1H-pirazol-4-carbohidrazidă (Exemplul 10-1b) (1g, 4,3 mmol) în acid acetic apos 10% (50 mL) și s-a răcit la 0°C prin intermediul unei băi de gheață cu apă. Reacția a fost agitată pentru încă 15 minute apoi extrasă cu acetat de etil (3x, 75 mL). Extractele organice combinate au fost spălate cu carbonat de sodiu saturat apos (100 mL) urmată de H_2O (100 mL). Extractele organice combinate au fost uscate pe sulfat de sodiu, filtrate și concentrate. Produsul solid a fost triturat cu acetat de etil/hexani (1/9) și uscat *in vid* pentru a da 1-((3,5-dimetilizoxazol-4-il)metil)-1H-pirazol-4-carbonil azidă (1g, 93%) sub formă de solid alb. ^1H RMN (CDCl_3 , 400 MHz): δ 2,20 (s, 3H), 2,44 (s, 3H), 5,07 (s, 2H), 7,81 (s, 1H), 7,93 (s, 1H).

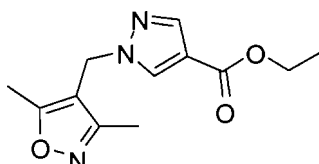
Exemplul 10-1b: 1-((3,5-dimetilizoxazol-4-il)metil)-1H-pirazol-4-carbohidrazidă



[0487] 1-((3,5-dimetilizoxazol-4-il)metil)-1H-pirazol-4-carboxilat de etil (Exemplul 10-1c) (6 g, 24 mmol) și hidrazină (7,5g, 240 mmol) au fost agitate în EtOH (100 mL) la reflux timp de 12 ore. Soluția a fost concentrată pe evaporator rotativ și produsul solid a fost triturat cu acetat de etil/hexani (1/9) și uscat sub vid înaintat pentru a da

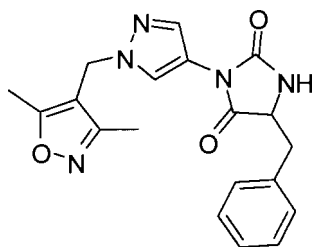
1-((3,5-dimetilizoxazol-4-il)metil)-1H-pirazol-4-carbohidrazidă (5,5 g, 97%) sub formă de solid pur, alb. ^1H RMN (DMSO-d_6 , 400 MHz): δ 2,11 (s, 3H), 2,39 (s, 3H), 5,15 (s, 2H), 7,81 (s, 1H), 8,17 (s, 1H), 9,31 (bs, 1H).

Exemplul 10-1c: 1-((3,5-dimetilizoxazol-4-il)metil)-1H-pirazol-4-carboxilat



[0488] 1H-pirazol-4-carboxilat de etil (4,2g, 30 mmol), 4-(clorometil)-3,5-dimetilizoxazol (5,1 g, 35 mmol) și carbonat de cesiu (9,8 g, 30 mmol) în DMF (50 mL), au fost agitate la 80°C timp de 12 ore. Reacția a fost răcită la temperatură ambiantă, diluată cu 0,1 N HCl (150 mL) și extrasă cu acetat de etil (3x, 75 mL). Extractele organice combinate au fost uscate pe sulfat de sodiu și concentrate pe evaporator rotativ. Produsul solid a fost triturat cu acetat de etil/hexani(1/9) și colectat prin filtrare pentru a da 1-((3,5-dimetilizoxazol-4-il)metil)-1H-pirazol-4-carboxilat de etil (6g, 80%) sub formă de solid alb. ^1H RMN (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).

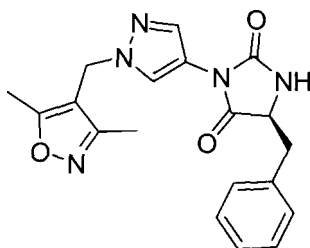
Exemplul 10-2: 3-(1-((3,5-dimetilizoxazol-4-il)metil)-1H-pirazol-4-il)imidazolidin-2,4-dionă



[0489] Preparată ca în Exemplul 10-1 din clorhidrat de ester metilic al (+/-)-fenilalaninei și 1-((3,5-dimetilizoxazol-4-il)metil)-1H-pirazol-4-carbonil azidă. Randament: 58%. ^1H RMN (Acetonă- 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 calculat

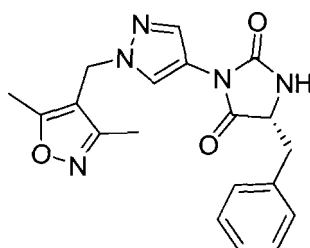
366,15; găsit 366,1. Punct de topire: 169-171°C. Compusul din titlu s-a dovedit a fi inhibitor al receptorului de gust amar hT2R08 și are un IC_{50} de 0,18 μ M.

Exemplul 10-3: (S)-5-benzil-3-(1-((3,5-dimetilizoxazol-4-il)metil)-1H-pirazol-4-il)imida- zolidin-2,4-dionă.



[0490] Preparată ca în Exemplul 10-1 din clorhidratul esterului metilic al (S)-fenilalaninei și 1-((3,5-dimetilizoxazol-4-il)metil)-1H-pirazol-4-carbonil azidă (Exemplul 6a). Randament:13% izolat prin cromatografie chirală. 1H RMN ($CDCl_3$, 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; $[M+H]$ calculat pentru $C_{19}H_{19}N_5O_3$; anticipat 366,15; găsit 366,1. $[\alpha]_D = (-)-136$, $c=0,1$, etanol. Compusul din titlu s-a dovedit a fi inhibitor al receptorului de gust amar hT2R08 și are un IC_{50} de 0,12 μ M.

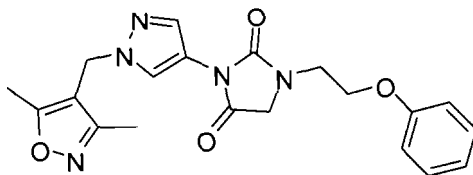
Exemplul 10-4: (R)-5-benzil-3-(1-((3,5-dimetilizoxazol-4-il)metil)-1H-pirazol-4-il)imida- zolidin-2,4-dionă



[0491] Preparată ca în Exemplul 10-1 de la clorhidratul esterului metilic al (R)-fenilalaninei și 1-((3,5-dimetilizoxazol-4-il)metil)-1H-pirazol-4-carbonil azidă. Randament: 9% izolată prin cromatografie chirală. 1H RMN ($CDCl_3$, 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 $M+H$ calculat 366,15; găsit 366,1. $[\alpha]_D = (+)-124$, $c=0,2$, etanol. Compusul

din titlu s-a dovedit a fi inhibitor al receptorului de gust amar hT2R08 și are un IC_{50} de 0,11 μM .

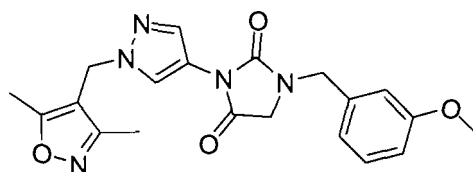
Exemplul 10-5: 3-(1-((3,5-dimetilizoxazol-4-il)metil)-1H-pirazol-4-il)-1-(2-fenoxietil) imidazolidin-2,4-dionă



[0492] 3-(1-((3,5-dimetilizoxazol-4-il)metil)-1H-pirazol-4-il)imidazolidin-2,4-dionă (Exemplul 10-1) (200 mg, 0,7 mmol), (2-bromoetoxi)benzen (200 mg, 1 mmol) și carbonat de cesiu (325 mg, 1 mmol) au fost iradiate într-un reactor cu microunde la 85°C timp de 20 minute. Reacția a fost răcită la temperatura camerei, diluată cu soluție apoasă 1N de HCl (100 mL) și extrasă cu acetat de etil (3x, 75 mL). Extractele organice combinate au fost uscate pe sulfat de sodiu, filtrate și concentrate. Reziduul a fost prelucrat cu metanol (10 mL) și purificat prin HPLC cu fază inversă (gradient 5 la 95% acetonitril în H₂O: 25 minute). Fraakțiile pure au fost adunate, concentrate apoi redizolvate în etanol absolut și concentrate pe evaporator rotativ (4x) pentru a da 3-(1-((3,5-dimetilizoxazol-4-il)metil)-1H-pirazol-4-il)-1-(2-fenoxietil)imidazolidin-2,4-dionă (150 mg, 54%) sub formă de solid alb.¹H RMN (CDCl₃, 400 MHz): δ 2,18 (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 calculat 396,17; găsit 396,1. Punct de topire: 117-118 °C. Compusul din titlu s-a dovedit a fi inhibitor al receptorului de gust amar hT2R08 și are un IC_{50} de 0,06 μM .

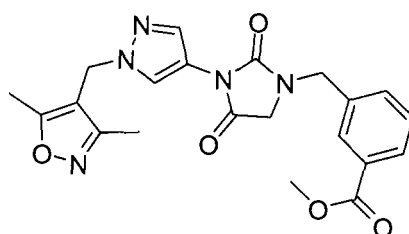
Exemplul 10-6: 3-(1-((3,5-dimetilizoxazol-4-il)metil)-1H-pirazol-4-il)-1-(3-metoxibenzil) imidazolidin-2,4-dionă

245



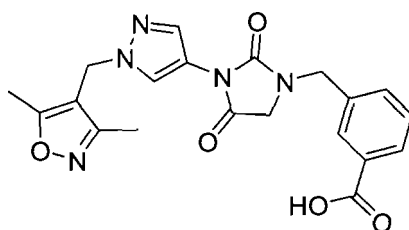
[0493] Preparată ca în Exemplul 10-5 din 3-(1-((3,5-dimetilizoxazol-4-il)metil)-1H-pirazol-4-il)imidazolidin-2,4-dionă (Exemplul 6) și bromură de 3-metoxi-benzil. Randament: 55%. ^1H RMN (CDCl_3 , 400 MHz): δ 2,19 (s, 3H), 2,42 (s, 3H), 3,81 (s, 3H), 3,85 (s, 2H), 4,58 (s, 2H), 5,06 (s, 2H), 6,81-6,88 (m, 3H), 7,26-7,31 (m, 1H), 7,92 (s, 1H), 8,08 (s, 1H). Compusul din titlu s-a dovedit a fi inhibitor al receptorului de gust amar hT2R08 și are un IC_{50} de 0,07 μM .

Exemplul 10-7: 3-((3-(1-((3,5-dimetilizoxazol-4-il)metil)-1H-pirazol-4-il)-2,4-dioxoimida- zolidin-1-il)metil)benzoat de metil



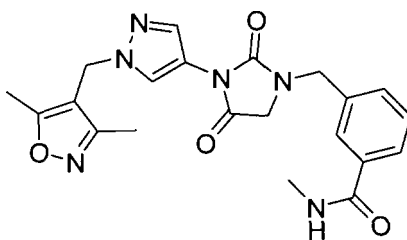
[0494] Preparat ca în Exemplul 10-5 din 3-(1-((3,5-dimetilizoxazol-4-il)metil)-1H-pirazol-4-il)imidazolidin-2,4-dionă și bromură de 3-metoxi-benzil. Randament: 83%. ^1H RMN (CDCl_3 , 400 MHz): δ 2,20 (s, 3H), 2,43 (s, 3H), 3,86 (s, 2H), 3,93 (s, 3H), 4,67 (s, 2H), 5,07 (s, 2H), 7,45-7,52 (m, 2H), 7,93 (s, 1H), 7,95 (s, 1H), 8,03 (dd, $J=7,2, 1,6$ Hz, 1H), 8,08 (s, 1H). Compusul din titlu s-a dovedit a fi inhibitor al receptorului de gust amar hT2R08 și are un IC_{50} of 0.09 μM .

Exemplul 10-8: Acid 3-((3-(1-((3,5-dimetilizoxazol-4-il)metil)-1H-pirazol-4-il)-2,4-dioxo imidazolidin-1-il)metil)benzoic



[0495] 3-(1-((3,5-dimetilizoxazol-4-il)metil)-1H-pirazol-4-il)imidazolidin-2,4-dionă (500 mg, 1,8 mmol) (Exemplul 10-5), 3-(bromometil)benzoat de metil (456 mg, 2 mmol) și carbonat de cesiu (650 mg, 2 mmol) au fost agitați în DMF (4 mL) într-un reactor cu microunde la 85°C timp de 20 minute. Reacția a fost răcită, diluată cu soluție apoasă 1N de HCl (100 mL) și extrasă cu acetat de etil (3x, 75 mL). Extractele organice combinate au fost uscate pe sulfat de sodiu, filtrate și concentrate. Esterul brut a fost dizolvat în metanol (5 mL) și s-a adăugat NaOH apos (50 mL, 10% în greutate) amestecul a fost agitat la temperatură ambiantă timp de 2 ore. Reacția a fost acidulată cu HCl 1N (150 mL) și extrasă cu acetat de etil (3x, 75 mL). Extractele organice combinate au fost uscate pe sulfat de sodiu, filtrate și concentrate pe evaporator rotativ. Acidul liber a fost triturat cu acetat de etil/hexani (1/9) și uscat sub vid înaintat pentru a da acid 3-((3-(1-((3,5-dimetilizoxazol-4-il)metil)-1H-pirazol-4-il)-2,4-dioxoimidazolidin-1-il)metil)benzoic (610. mg, 83%) sub formă de solid alb.¹H RMN (DMSO-d₆, 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). Compusul din titlu s-a dovedit a fi inhibitor al receptorului de gust amar hT2R08 și are un IC₅₀ de 1,8 μM.

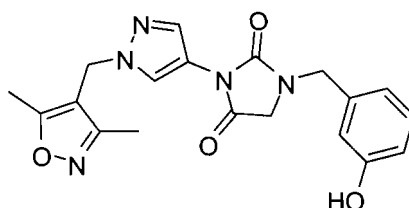
Exemplul 10-9: 3-((3-(1-((3,5-dimetilizoxazol-4-il)metil)-1H-pirazol-4-il)-2,4-dioxoimidazolidin-1-il)metil)-N-metilbenzamidă



[0496] Acid 3-((3-(1-((3,5-dimetilizoxazol-4-il)metil)-1H-pirazol-4-il)-2,4-dioxoimidazolidin-1-il)metil)benzoic (100 mg, 0,24 mmol) (Exemplul 10-8), clorhidrat de metilamină (67 mg, 1 mmol), trietilamină (155 mg, 1,5 mmol) și EDC (57 mg, 0,3 mmol) în acetonitril (3 mL) au fost iradiate într-un reactor cu microunde la 80°C timp de 10 minute. Reacția a fost răcită, diluată cu soluție apoasă 1N de HCl (100 mL) și extrasă cu acetat de etil (3x, 75 mL). Extractele organice combinate au fost uscate pe sulfat de sodiu, filtrate și concentrate. Produsul brut a fost dizolvat în MeOH (3 mL) și

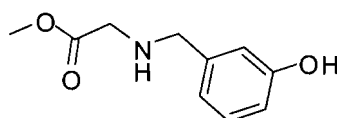
purificat prin HPLC cu fază inversă (gradient 5 la 95% acetonitril în H₂O: 25 minute) pentru a da 3-((3-(1-((3,5-dimetilizoxazol-4-il)metil)-1H-pirazol-4-il)-2,4-dioxoimidazolidin-1-il)metil)-N-metilbenzamidă (25 mg, 25%) ca un solid alb. MS M+H calculat 423,17; găsit 423,2. Compusul din titlu s-a dovedit a fi inhibitor al receptorului de gust amar hT2R08 și are un IC₅₀ de 0,14 μM.

Exemplul 10-10: 3-(1-((3,5-dimetilizoxazol-4-il)metil)-1H-pirazol-4-il)-1-(3-hidroxi-benzil) imidazolidin-2,4-dionă:



[0497] Preparată ca în Exemplul 10-1 din 1-((3,5-dimetilizoxazol-4-il)metil)-1H-pirazol-4-carbonil azidă (Exemplul 10-1a) și 2-(3-hidroxi-benzilamino)acetat de metil (Exemplul 10-10a). Randament: 24%. ¹H RMN (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, H), 7,80 (s, 1H), 8,19 (s, H), 9,44 (s, H). LC/MS; [M+H] calculat 382,1; găsit 382,1. Punct de topire: 35-136°C. Compusul din titlu a arătat că inhibă receptorul gustului amar hT2R08 și are un IC₅₀ de 0,035 μM.

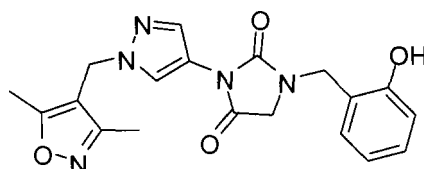
Exemplul 10-10a: 2-(3-hidroxi-benzilamino)acetat de metil:



[0498] Esterul metilic al glicinei (500mg, 4mmol) și 3-hidroxi-benzaldehida (480mg, 4mmol) au fost dizolvate în 5mL THF/Metanol (1:1). S-au adăugat lent la reacție acid acetic (240mg, 4mmol) și cianoborohidruță de sodiu 1M în THF (4,8mL, 4,8 mmol). Reacția a fost iradiată într-un reactor cu microunde la 85°C timp de 15 minute, răcită la temperatura camerei și sărurile au fost îndepărtate prin filtrare. Soluția limpede a fost concentrată și reziduul a fost purificat prin HPLC cu fază inversă (gradient 10 la

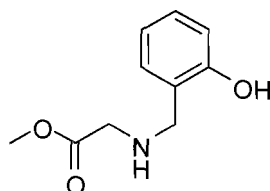
95% Acetonitril în H₂O:25 minute) pentru a da compusul din titlu sub formă de gel limpede. Randament 45%. MS M+H calculat 196,1; găsit 196,1.

Exemplul 10-11: 3-(1-((3,5-dimetilizoxazol-4-il)metil)-1H-pirazol-4-il)-1-(2-hidroxi-benzil) imidazolidin-2,4-dionă:



[0499] Preparată ca în Exemplul 10-1 din 1-((3,5-dimetilizoxazol-4-il)metil)-1H-pirazol-4-carbonil azidă (Exemplul 10-1a) și 2-(2-hidroxi-benzilamino)acetat de metil (Exemplul 10-11a). Randament: 28%. ¹H RMN (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, H), 9,66 (s, H). LC/MS; [M+H] anticipat 382,1; găsit 382,2. Compusul din titlu s-a dovedit a fi inhibitor al receptorului de gust amar hT2R08 și are un IC₅₀ de 0,07μM.

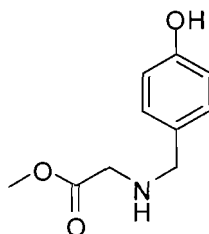
Exemplul 10-11a: 2-(2-hidroxi-benzilamino)acetat de metil:



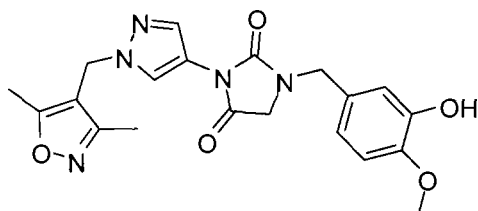
[0500] Preparată ca în Exemplul 10-10a din esterul metilic al glicinei și 2-hidroxi-benzaldehidă. Randament 40%. MS M+H calculat 196,1; găsit 196,1

Exemplul 10-12: 3-(1-((3,5-dimetilizoxazol-4-il)metil)-1H-pirazol-4-il)-1-(4-hidroxi-benzil) imidazolidin-2,4-dionă:

Exemplul 10-12a: 2-(4-hidroxibenzilamino)acetat de metil:



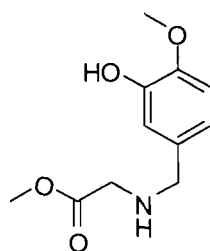
Exemplul 10-13: 3-(1-((3,5-dimetilizoxazol-4-il)metil)-1H-pirazol-4-il)-1-(3-hidroxi-4-metoxi benzil)imidazolidin-2,4-dionă:



[0503] Preparată ca în Exemplul 10-1 din 1-((3,5-dimetilizoxazol-4-il)metil)-1H-pirazol-4-carbonil azidă (Exemplul 10-1a) și 2-(3-hidroxi-4-metoxibenzilamino)acetat

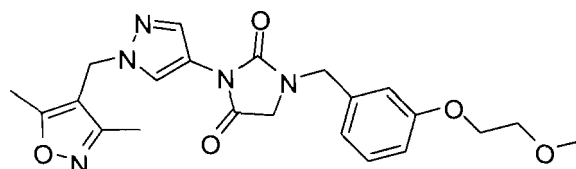
de metil (Exemplul 10-13a). Randament 22%. ^1H RMN (DMSO, 400 MHz): δ 2,119 (s, 3H), 2,383 (s, 3H), 3,716 (s, 3H), 3,923 (s, 2H), 4,361 (s, 2H), 5,117 (s, 2H), 6,667 (m, 2H), 6,863 (J=8,4, d, 1H), 7,766 (s, H), 8,159 (s, H). MS M+H calculat 412,1; găsit 412,1. Compusul din titlu s-a dovedit a fi inhibitor al receptorului de gust amar hT2R08 și are un IC_{50} de 0,1 μM .

Exemplul 10-13a: 2-(3-hidroxi-4-metoxibenzilamino)acetat de metil:



[0504] Preparată ca în Exemplul 10-10a din esterul metilic al glicinei și 3-hidroxi-4-metoxibenzaldehidă. Randament 47%. MS M+H calculat 226,1; găsit 226,1

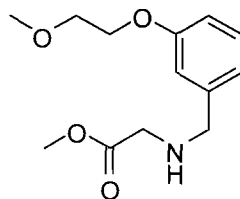
Exemplul 10-14: 3-(1-((3,5-dimetilizoxazol-4-il)metil)-1H-pirazol-4-il)-1-(3-(2-metoxietoxi) benzil)imidazolidin-2,4-dionă:



[0504] Preparată ca în Exemplul 10-1 din 1-((3,5-dimetilizoxazol-4-il)metil)-1H-pirazol-4-carbonil azida (Exemplul 10-1a) și 2-(3-(2-metoxietoxi)benzilamino)acetat de metil (Exemplul 10-14a). Randament 27%. ^1H RMN (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 calculat 440,2; găsit 440,2. Compusul din titlu s-a dovedit a fi inhibitor al receptorului de gust amar hT2R08 și are un IC_{50} de 0,07 μM .

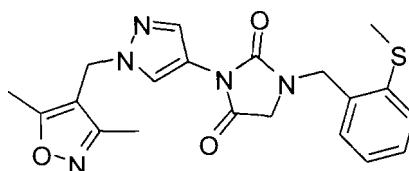
Exemplul 10-14a: 2-(3-(2-metoxietoxi)benzilamino)acetat de metil:

251



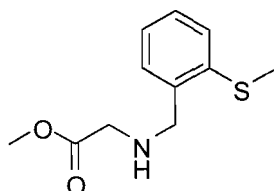
[0505] Preparată ca în Exemplul 10-10a din esterul metilic al glicinei și 3-(2-metoxietoxi) benzaldehidă. Randament 55%. MS M+H calculat 254,1; găsit 254,1

Exemplul 10-15: 3-(1-((3,5-dimetilizoxazol-4-il)metil)-1H-pirazol-4-il)-1-(2-(metiltio) benzil) imidazolidin-2,4-dionă:



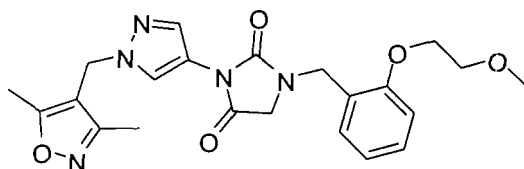
[0506] Preparată ca în Exemplul 10-1 din 1-((3,5-dimetilizoxazol-4-il)metil)-1H-pirazol-4-carbonil azidă (Exemplul 10-1a) și 2-(2-(metiltio)benzilamino)acetat de metil (Exemplul 10-15a). Randament 67%. ¹H RMN (DMSO, 400 MHz): δ 2,12 (s, 3H), 2,39 (s, 3H), 2,48 (s, 3H), 3,98 (s, 2H), 4,54 (s, 2H), 5,19 (s, 2H), 7,18 (m, 1H), 7,30 (m, 3H), 7,79 (s, 1H), 8,18 (s, 1H). LC/MS; [M+H] anticipat 412,1; găsit 412,1. Compusul din titlu s-a dovedit a fi inhibitor al receptorului de gust amar hT2R08 și are un IC₅₀ de 0,03uM.

Exemplul 10-15a: 2-(2-(metiltio)benzilamino)acetat de metil:



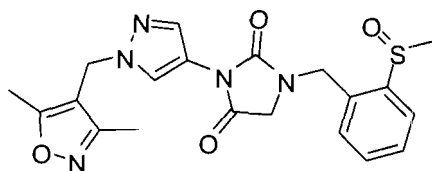
[0507] Preparată ca în Exemplul 10-10a de la esterul metilic al glicinei și 2-(metiltio)benzaldehydă. Randament 50%. MS M+H calculat 226,1; găsit 226,1

Exemplul 10-16: 3-(1-((3,5-dimetilizoxazol-4-il)metil)-1H-pirazol-4-il)-1-(2-(2-metoxietoxi) benzil)imidazolidin-2,4-dionă:



[0508] Preparată ca în Exemplul 10-5 din 3-(1-((3,5-dimetilizoxazol-4-il)metil)-1H-pirazol-4-il)-1-(2-hidroxibenzil)imidazolidin-2,4-dionă (Exemplul 10-11) și 2-bromoetil metil eter. Randament 19%. ^1H RMN (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). Compusul din titlu s-a dovedit a fi inhibitor al receptorului de gust amar hT2R08 și are un IC_{50} de 0,1 μM .

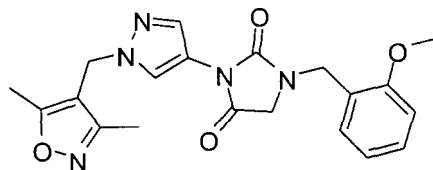
Exemplul 10-17: 3-(1-((3,5-dimetilizoxazol-4-il)metil)-1H-pirazol-4-il)-1-(2-(metilsulfinil) benzil)imidazolidin-2,4-dionă:



[0509] Într-un flacon de 20mL pentru microunde, s-au dizolvat 3-(1-((3,5-dimetilizoxazol-4-il)metil)-1H-pirazol-4-il)-1-(2-(metiltio)benzil)imidazolidin-2,4-dionă (Exemplul 10-15) (70 mg, 0,17 mmol) și m-CPBA (58 mg, 0,34 mmol) în diclormetan la 0°C. Reacția a fost agitată la 0°C și lăsată să se încălzească la temperatura camerei timp de 4 ore. Solventul reacției a fost îndepărtat sub vid și produsul brut a fost dizolvat în 1 mL etanol și a fost purificat prin HPLC în sistem varian (10 la 95% acetonitril/apă; 25 minute). Frația purificată a fost evaporată sub vid pentru a da compusul din titlu. MS M+H calculat 428,1; găsit 428,1. Compusul din titlu s-a dovedit

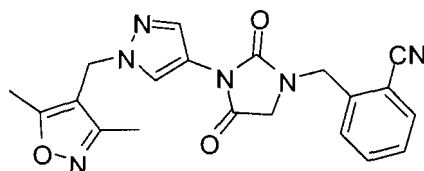
a fi inhibitor al receptorului de gust amar hT2R08 și are un IC_{50} de 0,4 μ M.
Randament: 12mg, 17%.

Exemplul 10-18: 3-(1-((3,5-dimetilizoxazol-4-il)metil)-1H-pirazol-4-il)-1-(2-metoxibenzil) midazolidin-2,4-dionă:



[0510] Preparată ca în Exemplul 10-5 din 3,5-dimetilizoxazol-4-il)metil)-1H-pirazol-4-il) midazolidin-2,4-dionă (Exemplul 10-1) și 1-(bromometil)-2-metoxibenzen (199 mg, 1 mmol). Randament: 33%. MS M+H calculat 396,1; găsit 396,1. Compusul din titlu s-a dovedit a fi inhibitor al receptorului de gust amar hT2R08 și are un IC_{50} de 0,06 μ M.

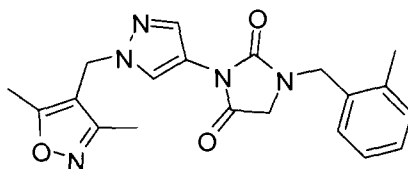
Exemplul 10-19: 2-((3-(1-((3,5-dimetilizoxazol-4-il)metil)-1H-pirazol-4-il)-2,4-dioxoimida- zolidin-1-il)metil)benzonitril:



[0511] Preparată ca în Exemplul 10-5 din 3-(1-((3,5-dimetilizoxazol-4-il)metil)-1H-pirazol-4-il)imidazolidin-2,4-dionă (Exemplul 10-1) și 2-(bromometil)benzonitril. Randament: 27%. MS M+H calculat 391,1; găsit 391,1. Compusul din titlu s-a dovedit a fi inhibitor al receptorului de gust amar hT2R08 și are un IC_{50} de 0,5 μ M.

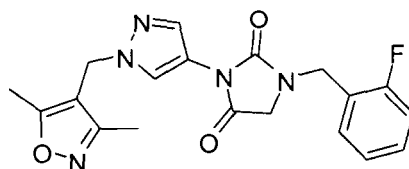
Exemplul 10-20: 3-(1-((3,5-dimetilizoxazol-4-il)metil)-1H-pirazol-4-il)-1-(2-metilbenzil) imidazolidin-2,4-dionă:

254



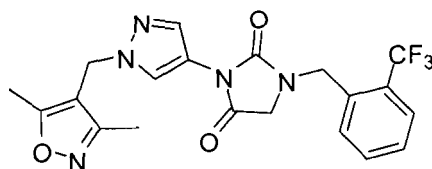
[0512] Preparată ca în Exemplul 10-5 din 3-(1-((3,5-dimetilizoxazol-4-il)metil)-1H-pirazol-4-il)imidazolidin-2,4-dionă (Exemplul 10-1) și 1-(bromometil)-2-metilbenzen. Randament: 21%. MS M+H calculat 380,1; găsit 380,1. Compusul din titlu s-a dovedit a fi inhibitor al receptorului de gust amar hT2R08 și are un IC₅₀ de 0,1 uM.

Exemplul 10-21: 3-(1-((3,5-dimetilizoxazol-4-il)metil)-1H-pirazol-4-il)-1-(2-fluorobenzil) imidazolidin-2,4-dionă:



[0513] Preparată ca în Exemplul 10-5 din 3-(1-((3,5-dimetilizoxazol-4-il)metil)-1H-pirazol-4-il)imidazolidin-2,4-dionă (Exemplul 10-1) și 1-(bromometil)-2-fluorobenzen. Randament 42%. MS M+H calculat 384,1; găsit 384,1. Compusul din titlu s-a dovedit a fi inhibitor al receptorului de gust amar hT2R08 și are un IC₅₀ de 0,08 uM.

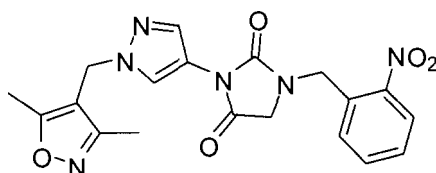
Exemplul 10-22: 3-(1-((3,5-dimetilizoxazol-4-il)metil)-1H-pirazol-4-il)-1-(2-(trifluorometil) benzil)imidazolidin-2,4-dionă:



[0514] Preparată ca în Exemplul 10-5 din 3-(1-((3,5-dimetilizoxazol-4-il)metil)-1H-pirazol-4-il)imidazolidin-2,4-dionă (Exemplul 10-1) și 1-(bromometil)-2-(trifluorometil)benzen. Randament: 37%. MS M+H calculat 434,1; găsit 434,1.

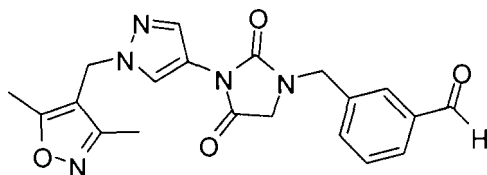
Compusul din titlu s-a dovedit a fi inhibitor al receptorului de gust amar hT2R08 și are un IC_{50} de 0,2uM.

Exemplul 10-23: 3-(1-((3,5-dimetilizoxazol-4-il)metil)-1H-pirazol-4-il)-1-(2-nitrobenzil) imidazolidin-2,4-dionă:



[0515] Preparată ca în Exemplul 10-5 din 3-(1-((3,5-dimetilizoxazol-4-il)metil)-1H-pirazol-4-il)imidazolidin-2,4-dionă (Exemplul 10-1) și 1-(bromometil)-2-nitrobenzen. Randament 22%. MS M+H calculat 411,1; găsit 411,1. Compusul din titlu s-a dovedit a fi inhibitor al receptorului de gust amar hT2R08 și are un IC_{50} de 0,07 uM.

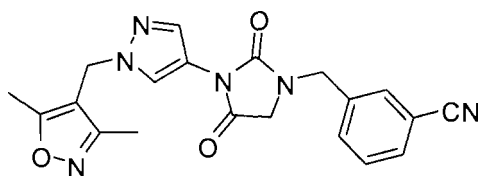
Exemplul 10-24: 3-((3-(1-((3,5-dimetilizoxazol-4-il)metil)-1H-pirazol-4-il)-2,4-dioxo imidazolidin-1-il)metil)benzaldehydă:



[0516] Preparată ca în Exemplul 10-5 din 3-(1-((3,5-dimetilizoxazol-4-il)metil)-1H-pirazol-4-il)imidazolidin-2,4-dionă (Exemplul 10-1) și 3-(bromometil)benzaldehydă. Randament: 35%. 1H RMN (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). Compusul din titlu s-a dovedit a fi inhibitor al receptorului de gust amar hT2R08 și are un IC_{50} de 0,2uM.

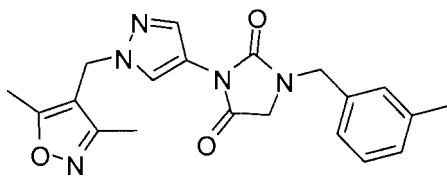
Exemplul 10-25: 3-((3-(1-((3,5-dimetilizoxazol-4-il)metil)-1H-pirazol-4-il)-2,4-dioxoimida- zolidin-1-il) metil)benzonitril:

256



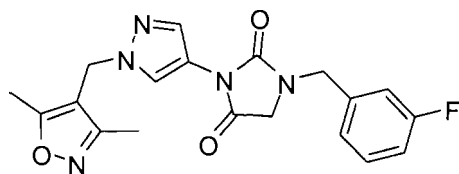
[0517] Preparat ca Exemplul 10-5 din 3-(1-((3,5-dimetilizoxazol-4-il)metil)-1H-pirazol-4-il)imidazolidin-2,4-dionă (Exemplul 10-1) și 3-(bromometil)benzonitril. Randament 21%. MS M+H calculat 411,1; găsit 411,1. Compusul din titlu s-a dovedit a fi inhibitor al receptorului de gust amar hT2R08 și are un IC₅₀ de 1μM.

Exemplul 10-26: 3-(1-((3,5-dimetilizoxazol-4-il)metil)-1H-pirazol-4-il)-1-(3-metilbenzil) imidazolidin-2,4-dionă:



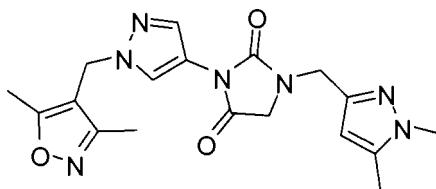
[0518] Preparată ca în Exemplul 10-5 din 3-(1-((3,5-dimetilizoxazol-4-il)metil)-1H-pirazol-4-il)imidazolidin-2,4-dionă (Exemplul 10-1) și 1-(bromometil)-3-metilbenzen. Randament 25%. MS M+H calculat 380,1; găsit 380,1. Compusul din titlu s-a dovedit a fi inhibitor al receptorului de gust amar hT2R08 și are un IC₅₀ de 0,02μM.

Exemplul 10-27: 3-(1-((3,5-dimetilizoxazol-4-il)metil)-1H-pirazol-4-il)-1-(3-fluorobenzil) imidazolidin-2,4-dionă:



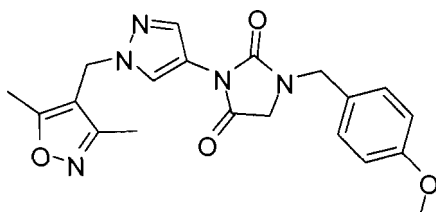
[0519] Preparată ca în Exemplul 10-5 din 3-(1-((3,5-dimetilizoxazol-4-il)metil)-1H-pirazol-4-il)imidazolidin-2,4-dionă (Exemplul 10-1) și 1-(bromometil)-3-fluorobenzen. Randament 27%. MS M+H calculat 384,1; găsit 384,1. Compusul din titlu s-a dovedit a fi inhibitor al receptorului de gust amar hT2R08 și are un IC₅₀ de 0,06μM.

Exemplul 10-28: 1-((1,5-dimetil-1H-pirazol-3-il)metil)-3-(1-((3,5-dimetilizoxazol-4-il)metil)-1H-pirazol-4-il)imidazolidin-2,4-dionă:



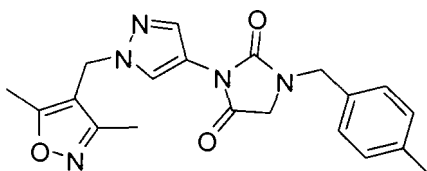
[0520] Preparată ca în Exemplul 10-5 din 3-(1-((3,5-dimetilizoxazol-4-il)metil)-1H-pirazol-4-il)imidazolidin-2,4-dionă (Exemplul 10-1) și 3-(bromometil)-1,5-dimetil-1H-pirazol. Randament: 22%. MS M+H calculat 384,1; găsit 384,1. Compusul din titlu s-a dovedit a fi inhibitor al receptorului de gust amar hT2R08 și are un IC₅₀ de 0,3μM.

Exemplul 10-29: 3-(1-((3,5-dimetilizoxazol-4-il)metil)-1H-pirazol-4-il)-1-(4-metoxibenzil)imidazolidin-2,4-dionă:



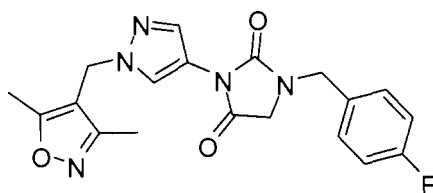
[0521] Preparată ca în Exemplul 10-5 din 3-(1-((3,5-dimetilizoxazol-4-il)metil)-1H-pirazol-4-il)imidazolidin-2,4-dionă (Exemplul 10-1) și 1-(bromometil)-4-metoxibenzen. Randament 19%. MS M+H calculat 396,1; găsit 396,1. Compusul din titlu s-a dovedit a fi inhibitor al receptorului de gust amar hT2R08 și are un IC₅₀ de 0,07μM.

Exemplul 10-30: 3-(1-((3,5-dimetilizoxazol-4-il)metil)-1H-pirazol-4-il)-1-(4-metilbenzil)imidazolidin-2,4-dionă:



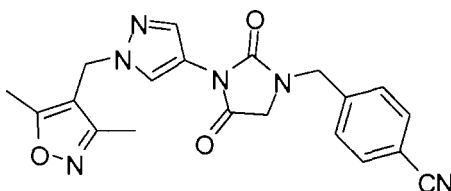
[0522] Preparată ca în Exemplul 10-5 din 3-(1-((3,5-dimetilizoxazol-4-il)metil)-1H-pirazol-4-il)imidazolidin-2,4-dionă (Exemplul 10-1) și 1-(bromometil)-4-metilbenzen. Randament 25%. MS M+H calculat 380,1; găsit 380,1. Compusul din titlu s-a dovedit a fi inhibitor al receptorului de gust amar hT2R08 și are un IC_{50} de 0,06uM.

Exemplul 10-31: 3-(1-((3,5-dimetilizoxazol-4-il)metil)-1H-pirazol-4-il)-1-(4-fluorobenzil)imidazolidin-2,4-dionă:



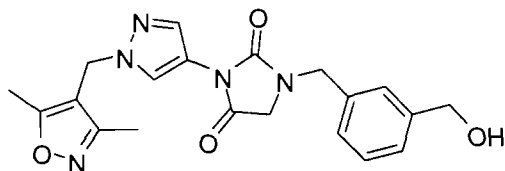
[0523] Preparată ca în Exemplul 10-5 din 3-(1-((3,5-dimetilizoxazol-4-il)metil)-1H-pirazol-4-il)imidazolidin-2,4-dionă (Exemplul 10-1) și 1-(bromometil)-4-fluorobenzen. Randament 33%. MS M+H calculat 384,1; găsit 384,1. Compusul din titlu s-a dovedit a fi inhibitor al receptorului de gust amar hT2R08 și are un IC_{50} de 0,05uM.

Exemplul 10-32: 4-((3-(1-((3,5-dimetilizoxazol-4-il)metil)-1H-pirazol-4-il)-2,4-dioxoimida-zolidin-1-il)metil)benzonitril:



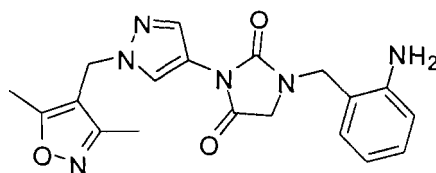
[0524] Preparat ca Exemplul 10-5 din 3-(1-((3,5-dimetilizoxazol-4-il)metil)-1H-pirazol-4-il)imidazolidin-2,4-dionă (Exemplul 10-1) și 4-(bromometil)benzonitril. Randament 21%. MS M+H calculat 391,1; găsit 391,2. Compusul din titlu s-a dovedit a fi inhibitor al receptorului de gust amar hT2R08 și are un IC_{50} de 0,05uM.

Exemplul 10-33: 3-(1-((3,5-dimetilizoxazol-4-il)metil)-1H-pirazol-4-il)-1-(3-(hidroximetil)benzil)imidazolidin-2,4-dionă:



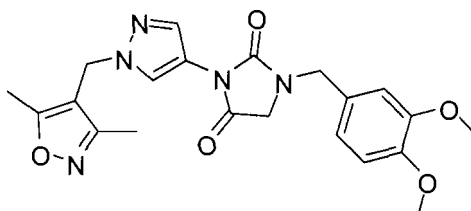
[0525] 3-((3-(1-((3,5-dimetilizoxazol-4-il)metil)-1H-pirazol-4-il)-2,4-dioxoimidazolidin-1-il) metil)benzaldehydă (Exemplul 10-24) (131mg, 0,3 mmol) a fost dizolvată în 2 mL etanol. Soluția a fost trecută printr-un aparat H-Cube la temperatura camerei utilizând catalizator Pd/C 10% la o viteză de curgere de 1ml/ minut. Frația colectată a fost concentrată, redizolvată în 2 mL etanol și purificată prin HPLC (10-95% acetonitril/Apă, 25 minute). Frațiile purificate au fost combinate și concentrate pentru a da compusul din titlu. ^1H RMN (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 calculat 396,1; găsit 396,1. Compusul din titlu s-a dovedit a fi inhibitor al receptorului de gust amar hT2R08 și are un IC_{50} de 0,3uM. Randament: 24mg, 18%.

Exemplul 10-34: 1-(2-aminobenzil)-3-(1-((3,5-dimetilizoxazol-4-il)metil)-1H-pirazol-4-il)imidazolidin-2,4-dionă:



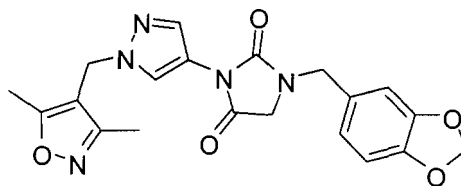
[0526] 3-(1-((3,5-dimetilizoxazol-4-il)metil)-1H-pirazol-4-il)-1-(2-nitrobenzil)imidazolidin-2,4-diona (Exemplul 10-23) (126mg, 0,3 mmol) a fost dizolvată în 2 mL etanol. Soluția a fost trecută printr-un aparat H-Cube la temperatura camerei utilizând catalizator 10% Pd/C la o viteză de curgere de 1ml/minut. Frația colectată a fost concentrată, redizolvată în 2mL etanol și purificată prin HPLC (10-95% acetonitril/apă, 25 minute). Frațiile purificate au fost combinate și concentrate pentru a da compusul din titlu. Randament 26%. MS M+H calculat 381,1; găsit 381,1. Compusul din titlu s-a dovedit a fi inhibitor al receptorului de gust amar hT2R08 și are un IC_{50} de 0,02uM.

Exemplul 10-35: 1-(3,4-dimetoxibenzil)-3-(1-((3,5-dimetilizoxazol-4-il)metil)-1H-pirazol-4-il)imidazolidin-2,4-dionă:

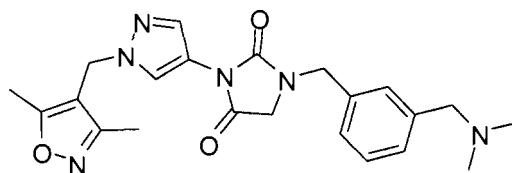


[0527] 3-(1-((3,5-dimetilizoxazol-4-il)metil)-1H-pirazol-4-il)imidazolidin-2,4-dionă (Exemplul 10-1) (275 mg, 1 mmol), (3,4-dimetoxifenil)metanol (201 mg, 1,2 mmol), N,N,N,N-tetrametilazodicarboxamida (344 mg, 2 mmol) au fost dizolvate în 2 mL THF anhidru. S-a adăugat tributilfosfină (404 mg, 2 mmol) și amestecul de reacție a fost introdus într-un reactor cu microunde timp de 5 minute la 90°C. Reacția s-a filtrat, s-a concentrat și s-a purificat prin HPLC (10-95% acetonitril/apă, 25 minute) pentru a da compusul din titlu. Randament: 25mg, 6%. ¹H RMN (DMSO, 400 MHz): δ 2,119 (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 calculat 426,1; găsit 426,1. Compusul din titlu s-a dovedit a fi inhibitor al receptorului de gust amar hT2R08 și are un IC₅₀ de 0,06uM.

Exemplul 10-36: 1-(benzo[d][1,3]dioxol-5-ilmetil)-3-(1-((3,5-dimetilizoxazol-4-il)metil)-1H-pirazol-4-il)imidazolidin-2,4-dionă:

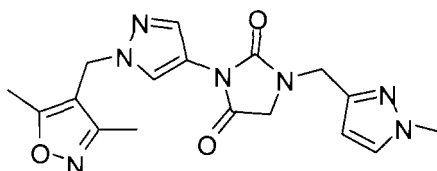


[0528] Preparată ca în Exemplul 10-35 din 3-(1-((3,5-dimetilizoxazol-4-il)metil)-1H-pirazol-4-il)imidazolidin-2,4-dionă (Exemplul 10-1) și benzo[d][1,3]dioxol-5-ilmetanol. Randament: 19%. ¹H RMN (DMSO, 400 MHz): δ 2,143 (s, 3H), 2,408 (s, 3H), 3,977 (s, 2H), 4,440 (s, 2H), 5,202 (s, 2H), 6,003 (s, 2H), 6,897 (m, 3H), 7,788 (s, 1H), 8,181 (s, 1H). MS M+H calculat 410,1; găsit 410,1. Compusul din titlu s-a dovedit a fi inhibitor al receptorului de gust amar hT2R08 și are un IC₅₀ de 0,07uM.

Exemplul 10-37: 1-(3-((dimetilamino)metil)benzil)-3-(1-((3,5-dimetilizoxazol-4-il)metil)-1H-pirazol-4-il)imidazolidin-2,4-dionă:

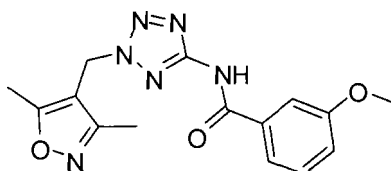
[0529] S-au dizolvat 3-(1-((3,5-dimetilizoxazol-4-il)metil)-1H-pirazol-4-il)imidazolidin-2,4-dionă (Exemplul 10-1) (275 mg, 1 mmol), 1,3-bis(bromometil)benzen (263 mg, 1 mmol) și carbonat de cesiu (325mg, 1 mmol) în 2 mL DMF și s-au iradiat într-un reactor cu microunde la 165 °C timp de 5 minute. Reacția a fost răcită la temperatura camerei și sarea precipitată a fost îndepărtată prin filtrare. Soluția limpede conținând produsul brut a fost concentrată și redizolvată în acetat de etil. Soluția organică a fost spălată cu apă de două ori, urmată de spălare cu saramură. Stratul organic a fost uscat pe sulfat de sodiu și evaporat pentru a da produsul brut care a fost trimis la etapa următoare fără purificare suplimentară sau caracterizare. S-au dizolvat 1-(3-(bromometil)benzil)-3-(1-((3,5-dimetilizoxazol-4-il)metil)-1H-pirazol-4-il)imidazolidin-2,4-dionă (Exemplul 42a) (152 mg, 0,3 mmol), dimetilamină (soluție 2 M în THF) (1,5 mL, 3 mmol), și hidruură de sodiu (9 mg, 0,36 mmol) în 1 mL THF anhidru. Reacția a fost introdusă într-un reactor cu microunde timp de 5 minute la 120°C. Produsul brut a fost redizolvat în 2 mL etanol și a fost purificat prin HPLC (10-95% acetonitril/apă, 25 minutes) pentru a da 1-(3-((dimetilamino)metil)benzil)-3-(1-((3,5-dimetilizoxazol-4-il)metil)-1H-pirazol-4-il)imidazolidin-2,4-dionă (16 mg, 13%). MS M+H calculat 423,1; găsit 423,1. Compusul din titlu s-a dovedit a fi inhibitor al receptorului de gust amar hT2R08 și are un IC₅₀ de 1,2μM.

Exemplul 10-38: 3-(1-((3,5-dimetilizoxazol-4-il)metil)-1H-pirazol-4-il)-1-((1-metil-1H-pirazol-3-il)metil)imidazolidin-2,4-dionă:



[0530] Preparată ca în Exemplul 10-5 din 3-(1-((3,5-dimetilizoxazol-4-il)metil)-1H-pirazol-4-il)imidazolidin-2,4-dionă (Exemplul 10-1) și 3-(bromometil)-1-metil-1H-pirazol. Randament 19%. MS M+H calculat 370,1; găsit 370. Compusul din titlu s-a dovedit a fi inhibitor al receptorului de gust amar hT2R08 și are un IC₅₀ de 0,4μM.

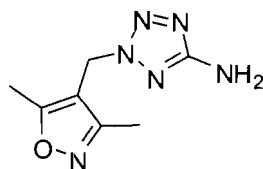
Exemplul 10-39: N-(2-((3,5-dimetilizoxazol-4-il)metil)-2H-tetrazol-5-il)-3-metoxibenzamidă



[0531] S-au supus agitării 2-((3,5-dimetilizoxazol-4-il)metil)-2H-tetrazol-5-amină (Exemplul 10-39a) (102 mg, 0,528 mmol), clorură de 3-metoxibenzoil (0,065 mL, 0,528 mmol) și piridină (0,043 mL, 0,528 mmol) în acetonitril (3 mL), la 100°C timp de o oră. Reacția a fost diluată cu diclormetan (30 mL) și spălată cu saramură (30 mL). Fazele organice au fost uscate pe sulfat de sodiu, concentrate și purificate prin HPLC cu fază inversă (Sistem de solvenți: gradient acetonitril/apă 10% la 100%), funcționare 25 minute) pentru a da N-(2-((3,5-dimetilizoxazol-4-il)metil)-2H-tetrazol-5-il)-3-metoxibenzamidă sub formă de solid cristalin alb (60 mg, 35 % Randament) MS M+H calculat 329,1, găsit 329. ¹H RMN (400MHz, DMSO-d₆): 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). Compusul are un IC₅₀ pe receptorul gustului amar hT2R8 de 1,87 μM.

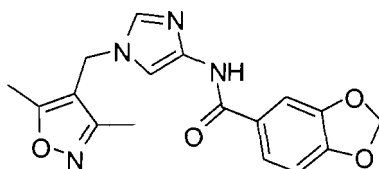
Exemplul 10-39a:2-((3,5-dimetilizoxazol-4-il)metil)-2H-tetrazol-5-amină

263



[0532] 2H-tetrazol-5-amina (1,29 g, 12,5 mmol), 4-(clorometil)-3,5-dimetilizoxazol (1,56 mL, 12,5 mmol) și carbonat de potasiu (1,73 g, 15,5 mmol) în DMF (20 mL) au fost încălzite la 80°C cu agitare timp de 16 ore. Reacția a fost răcită la temperatura camerei, diluată cu diclormetan (100 mL) și spălată consecutiv cu saramură și apă. Organicele au fost uscate pe sulfat de sodiu și concentrate într-un evaporator rotativ. Produsul brut a fost purificat prin cromatografie pe silicagel (0-10 % gradient acetat de etil/diclormetan) rezultând 2-((3,5-dimetilizoxazol-4-il)metil)-2H-tetrazol-5-amina sub formă de solid cristalin alb (970 mg, 40% Randament) MS M+H calculat 195,1, găsit 195.

Exemplul 10-40: N-(1-((3,5-dimetilizoxazol-4-il)metil)-1H-imidazol-4-il)benzo[d][1,3] dioxol-5-carboxamida



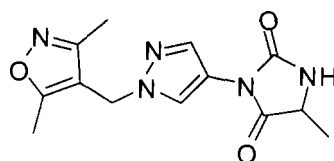
[0533] S-au agitat timp de 16 ore, 1-((3,5-dimetilizoxazol-4-il)metil)-1H-imidazol-4-amină (Exemplul 10-40a) (110 mg, 0,57 mmol), clorură de benzo[d][1,3]dioxol-5-carbonil (105 mg, 0,57 mmol) și trietilamină (90 μ L, 0,69 mmol) în diclormetan au fost agitate . Reacția a fost diluată cu diclormetan (30 mL) și spălată consecutiv cu saramură și apă. Fazele organice au fost uscate pe sulfat de sodiu și concentrate prin evaporare pe rotavapor. Produsul brut a fost purificat prin HPLC cu fază inversă (Sistem de solvenți: gradient acetonitril/apă, 10% la 100%, funcționare 25 minute) pentru a da N-(1-((3,5-dimetilizoxazol-4-il)metil)-1H-imidazol-4-il)benzo[d][1,3]dioxol-5-carboxamida sub formă de solid cristalin alb (32 mg, 15 % Randament). MS M+H calculat 341,3, găsit 341,3. ^1H RMN (400MHz, DMSO- d_6): 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). Compusul are un IC_{50} pe receptorul amar hT2R8 de 12,1 μM .

Exemplul 10-40a: 1-((3,5-dimetilizoxazol-4-il)metil)-1H-imidazol-4-amină

[0534] S-au supus agitării 3,5-dimetil-4-((4-nitro-1H-imidazol-1-il)metil)izoxazol (Exemplul 10-40b) (1,0 g, 4,5 mmol) și paladiu pe cărbune 10% (200 mg) în metanol (40 mL), prin oscilare pe un agitator oscilant de tip Parr sub presiune de 2,5 bar de hidrogen timp de 2 ore. Filtrarea printr-un strat de celită urmată de evaporarea pe evaporator rotativ au dat 1-((3,5-dimetilizoxazol-4-il)metil)-1H-imidazol-4-amină sub formă de solid roșu-gălbui (800 mg, 93 % Randament). MS M+H calculat 193, găsit 193.

Exemplul 10-40b: 3,5-dimetil-4-((4-nitro-1H-imidazol-1-il)metil)izoxazol

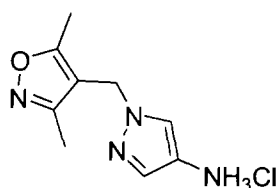
[0535] În mod similar Exemplului 10-41c a fost preparat 3,5-dimetil-4-((4-nitro-1H-imidazol-1-il)metil)izoxazol prin alchilarea 4-nitro-1H-imidazolului, rezultând 3,5-dimetil-4-((4-nitro-1H-imidazol-1-il)metil)izoxazol sub formă de solid cristalin alb. (5,0 g, 80% Randament). MS M+H calculat 223, găsit 223. ¹H RMN (400MHz, DMSO-d₆): 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).

Exemplul 10-41: 3-(1-((3,5-dimetilizoxazol-4-il)metil)-1H-pirazol-4-il)-5-metilimidazolidin-2,4-dionă

[0536] Clorhidrat de 1-((3,5-dimetilizoxazol-4-il)metil)-1H-pirazol-4-amină (Exemplul 10-41a) (1,0 g, 5,20 mmol), etil-2-izocinat-propionat (0,745 g, 5,20 mmol) și trietilamină (1,5 mL, 10,4 mmol) au fost amestecate în EtOH (20 mL). Reacția a fost refluxată timp de 12 ore și apoi lăsată să se răcească la temperatura camerei. Solventul a fost îndepărtat sub vid și în repaus s-au format cristale. Cristalele au fost colectate și spălate cu hexani pentru a da 3-(1-((3,5-dimetilizoxazol-4-il)metil)-1H-pirazol-4-il)-5-metilimidazolidin-2,4-dionă cu randament de 80% sub formă de solid

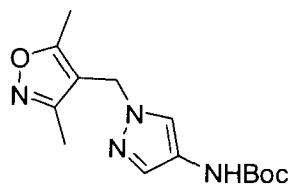
alb. ^1H RMN (DMSO-d_6 , 400 MHz): δ 1,53-1,51 (d, 3H), 2,19 (s, 3H), 2,42 (s, 3H), 4,21-4,19 (m, 1H), 5,06 (s, 2H), 6,00 (bs, 1H), 7,90 (s, 1H), 8,05 (s, 1H). Compusul din titlu s-a dovedit a fi inhibitor al receptorului de gust amar hT2R08 și are un IC_{50} de 1,3 μM .

Exemplul 10-41a: Clorhidrat de 1-((3,5-dimetilizoxazol-4-il)metil)-1H-pirazol-4-amină



[0537] S-au supus agitării 1-((3,5-dimetilizoxazol-4-il)metil)-1H-pirazol-4-ilcarbamate de terț-butil (Exemplul 10-41b) (592 mg, 2 mmol), într-o soluție 4N de HCl în dioxan (20 mL) la temperatură ambiantă timp de 2 ore. Solventul a fost îndepărtat și reziduul a fost dizolvat într-un amestec 1/1 de acetat de etil/hexani (30 mL) și concentrat de două ori. Solidul a fost triturat cu hexani și colectat prin filtrare furnizând clorhidrat de 1-((3,5-dimetilizoxazol-4-il)metil)-1H-pirazol-4-amină (500 mg, 99%) sub formă de solid alb. ^1H RMN (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).

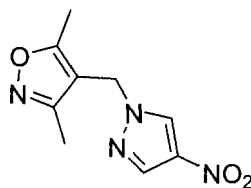
Exemplul 10-41b: 1-((3,5-dimetilizoxazol-4-il)metil)-1H-pirazol-4-ilcarbamate de terț-butil



[0538] S-au dizolvat 3,5-dimetil-4-((4-nitro-1H-pirazol-1-il)metil)izoxazol (Exemplul 10-41c) (12 g, 53,8 mmol) și anhidridă BOC (12,8 g, 64 mmol) într-un amestec 3/1/1 de MeOH/EtOH/THF (300 mL) într-un flacon de reacție Parr, urmată de adăugare de Pd/C 10% (1,5 g). Amestecul a fost agitat prin oscilare pe un hidrogenator Parr sub 2 atmosfere de hidrogen timp de 3 ore. Amestecul a fost filtrat printr-un strat de celită

de 3 inch și concentrat pe evaporator rotativ. Uleiul roz a fost purificat prin cromatografie pe silicagel (25% acetat de etil în hexani) pentru a da 1-((3,5-dimetilizoxazol-4-il)metil)-1H-pirazol-4-ilcarbamate de terț-butil (12,6 g, 80%) ca un ulei roz/roșu care solidifică în repaus la un solid roz deschis. ^1H RMN (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).

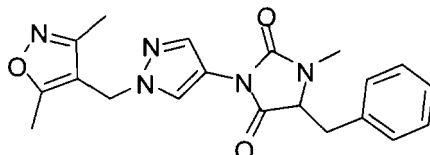
Exemplul 10-41c: 3,5-dimetil-4-((4-nitro-1H-pirazol-1-il)metil)izoxazol



[0539] 1H-pirazol (10 g, 147 mmol) s-a adăugat în porții mici la H_2SO_4 concentrat (100 mL), răcit la 0°C pe o baie de apă cu gheață, menținând temperatura internă de reacție sub 40°C . La amestecul de reacție s-a adăugat cu atenție, în picătură, HNO_3 concentrat (10 mL) menținând temperatura internă de reacție sub 55°C . Reacția a fost apoi încălzită la 55°C și agitată timp de 5 ore. Amestecul a fost răcit la 0°C și alcalinizat cu atenție (pH~8) cu soluție apoasă de NaOH (110 g NaOH în 150 mL H_2O) până când s-a format un precipitat alb controlând cu atenție ca temperatură internă a soluției să rămână sub 40°C . Solidul alb a fost colectat prin filtrare și spălat cu acetat de etil/hexani (1/3) apoi uscat *in vacuo* pentru a da 4-nitro-1H-pirazol (7g, 42%, Randament, izolat). ^{13}C RMN ($\text{DMSO}-d_6$, 100 MHz) δ 137,0, 126,4. La 4-nitro-1H-pirazol (9 g, 80 mmol) în DMF (100 mL) s-a adăugat carbonat de cesiu (26 g, 80 mmol) urmat de adăugare de 4-(clorometil)-3,5-dimetilizoxazol (12,3 g, 85 mmol). Amestecul de reacție a fost agitat în DMF (100 mL) la 80°C timp de 30 minute, apoi a fost răcit, diluat cu H_2O (150 mL) și extras cu acetat de etil (3x, 75 mL). Straturile organice combinate au fost uscate pe sulfat de sodiu, filtrate și concentrate. Reziduul a fost prelucrat în acetat de etil (200 mL) și spălat cu H_2O (2x, 100 mL). Stratul organic a fost uscat pe sulfat de sodiu, filtrat și concentrat. Produsul solid a fost triturat cu acetat de etil/hexani(1/9) și colectat prin filtrare. Produsul a fost uscat sub vid înaintat pentru a da 3,5-dimetil-4-((4-nitro-1H-pirazol-1-il)metil)izoxazol (12g,

67%) sub formă de solid galben deschis. ^1H RMN (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).

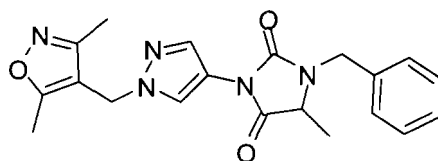
Exemplul 10-42: 5-benzil-3-(1-((3,5-dimetilizoxazol-4-il)metil)-1H-pirazol-4-il)-1-metilimidazolidin-2,4-dionă



[0540] Preparată ca în Exemplul 10-5 din 5-benzil-3-(1-((3,5-dimetilizoxazol-4-il)metil)-1H-pirazol-4-il)imidazolidin-2,4-dionă (Exemplul 10-2) și iodmetan. Randament: 95%. ^1H RMN (CDCl_3 , 400 MHz): δ 2,04 (s, 3H), 2,15 (s, 3H), 2,96 (s, 3H), 3,24-3,23 (m, 2 H, $J = 4,0$ 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).

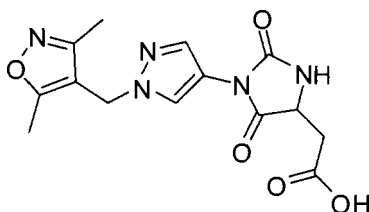
[0541] Compusul din titlu s-a dovedit a fi inhibitor al receptorului de gust amar hT2R08 și are un IC_{50} de 0,15 μM .

Exemplul 10-43: 1-benzil-3-(1-((3,5-dimetilizoxazol-4-il)metil)-1H-pirazol-4-il)-5-metilimidazolidin-2,4-dionă



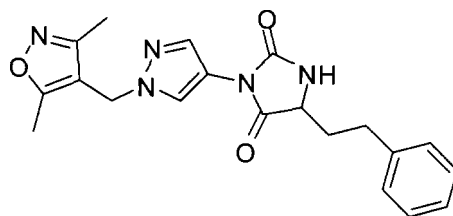
[0542] Preparată ca în Exemplul 10-5 din 3-(1-((3,5-dimetilizoxazol-4-il)metil)-1H-pirazol-4-il)-5-metilimidazolidin-2,4-dionă (Exemplul 10-41) și bromură de benzil. Randament: 50%. ^1H RMN (CDCl_3 , 400 MHz): δ 1,44 (s, 3H), 2,19 (s, 3H), 3,88 (s, 3H), 4,18 (d, $J = 8$ Hz, 2H), 4,22 (t, 1H, $J = 4$ Hz), 5,06 (s, 2H), 7,39 – 7,29 (m, 5H), 7,94 (s, 1H), 8,10 (s, 1H). Compusul din titlu s-a dovedit a fi inhibitor al receptorului de gust amar hT2R08 și are un IC_{50} de 0,02 μM .

Exemplul 10-44: Acid 2-(1-(1-((3,5-dimetilizoxazol-4-il)metil)-1H-pirazol-4-il)-2,5-dioxoimidazolidin-4-il)acetic



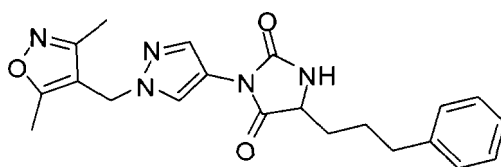
[0543] Preparat ca Exemplul 10-1 din 1-((3,5-dimetilizoxazol-4-il)metil)-1H-pirazol-4-carbonil azidă (Exemplul 10-1a) și H-Asp-OMe. Randament: 85%. MS M+H calculat 334,1; găsit 334,1

Exemplul 10-45: 3-(1-(1-((3,5-dimetilizoxazol-4-il)metil)-1H-pirazol-4-il)-5-fenetilimidazoli- din-2,4-dionă



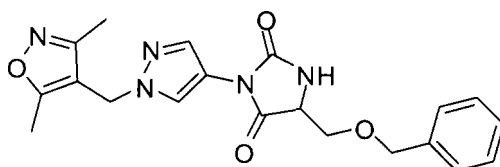
[0544] Preparată ca în Exemplul 10-1 din 1-((3,5-dimetilizoxazol-4-il)metil)-1H-pirazol-4-carbonil azidă (Exemplul 10-1a) și 2-amino-4-fenilbutanoat de metil. Randament: 15%. ^1H RMN (CDCl_3 , 400 MHz): δ 2,09-2,02 (m, 2H), 2,19 (s, 3H), 2,41 (s, 3H), 2,83-2,78 (m, 2H), 4,13-4,09 (t, 1H, $J = 8$ Hz), 5,05 (s, 2H), 5,95 (bs, 1H), 7,30-7,19 (m, 5H), 7,95 (s, 1H), 8,03 (s, 1H). Compusul din titlu s-a dovedit a fi inhibitor al receptorului de gust amar hT2R08 și are un IC_{50} de 0,22 μM .

Exemplul 10-46: 3-(1-(1-((3,5-dimetilizoxazol-4-il)metil)-1H-pirazol-4-il)-5-(3-fenilpropil)imidazolidin-2,4-dionă



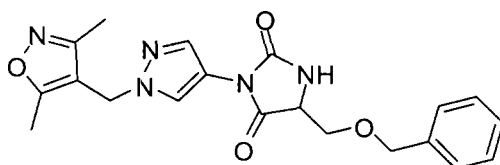
[0545] Preparată ca în Exemplul 10-1 din 1-((3,5-dimetilizoxazol-4-il)metil)-1H-pirazol-4-carbonil azidă (Exemplul 10-1a) și 2-amino-5-fenilpentanoat de metil. Randament: 20%. ^1H RMN (CDCl_3 , 400 MHz): δ 1,72-1,68 (m, 1H), 1,85-1,78 (m, 2H), 1,99-1,91 (m, 1H), 2,19 (s, 3H), 2,41 (s, 3H), 2,69-2,63 (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). Compusul din titlu s-a dovedit a fi inhibitor al receptorului de gust amar hT2R08 și are un IC_{50} de 0,17 μM .

Exemplul 10-47: 5-(benziloximetil)-3-(1-((3,5-dimetilizoxazol-4-il)metil)-1H-pirazol-4-il)imidazolidin-2,4-dionă



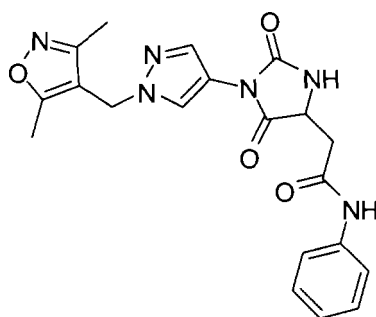
[0546] Preparată ca în Exemplul 10-1 din 1-((3,5-dimetilizoxazol-4-il)metil)-1H-pirazol-4-carbonil azidă (Exemplul 10-1a) și 2-amino-3-(benziloxi)propanoat de metil. Randament: 32%. ^1H RMN (CDCl_3 , 400 MHz): δ 2,19 (s, 3H), 2,43 (s, 3H), 3,70-3,67 (m, 1H), 3,89-3,86 (m, 1H), 4,31-4,30 (m, 1H), 4,56-4,32 (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). Compusul din titlu s-a dovedit a fi inhibitor al receptorului de gust amar hT2R08 și are un IC_{50} de 0,76 μM .

Exemplul 10-47: 5-(benziloximetil)-3-(1-((3,5-dimetilisoxazol-4-il)metil)-1H-pirazol-4-il)imidazolidin-2,4-dionă



[00547] Se prepară ca în Exemplul 10-1 din 1-((3,5-dimetilisoxazol-4-il)metil)-1H-pirazol-4-carbonil azidă (exemplul 10-1a) și metil 2-amino-3-(benziloxi)propanoat. Randament: 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). Compusul din titlu s-a dovedit a fi inhibitor al receptorului pentru amar hT2R08 și a avut un IC_{50} de 0.76 μM .

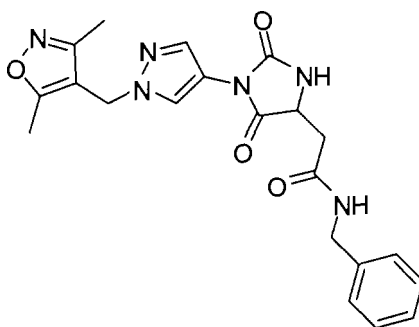
Exemplul 10-48: 2-(1-(1-((3,5-dimetilizoxazol-4-il)metil)-1H-pirazol-4-il)-2,5-dioxoimidazolidin-4-il)-N-fenilacetamidă



[00548] Acid 3-(1-(1-((3,5-dimetilizoxazol-4-il)metil)-1H-pirazol-4-il)-2,5-dioxoimidazolidin-4-il)acetic (exemplul 10-44) (100 mg, 0,3 mmol), anilină (33 mg, 0,36 mmol), Pybop (187 mg, 0,36 mmol) și trietilamină (0,05 mL, 0,36 mmol) s-au amestecat în DMF (1 mL). Masa de reacție s-a agitat la 65 °C timp de 4 ore. Reacția s-a lăsat să se răcească la temperatura camerei și apoi s-a diluat cu acetat de etil (2 mL). Faza organică a fost spălată cu soluție saturată de bicarbonat de sodiu (2x, 2 mL) și apoi cu soluție NaCl saturată (1 mL). Faza organică a fost extrasă, uscată pe Na_2SO_4 anhidru și filtrată. Produsul brut a fost resuspendat în MeOH (1 mL) și purificat prin HPLC în fază inversă (5-95% acetonitril în H_2O ; gradient 16 minute). Frațiunile pure s-au combinat și solventul a fost îndepărtat pe un evaporator rotativ obținându-se 2-(1-(1-((3,5-dimetilizoxazol-4-il)metil)-1H-pirazol-4-il)-2,5-dioxoimidazolidin-4-il)-N-fenilacetamidă sub formă de solid alb (50%). ^1H RMN (CDCl_3 , 400 MHz): δ 2,18 (s, 3H), 2,40 (s, 3H), 2,72 (m, 1H), 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).

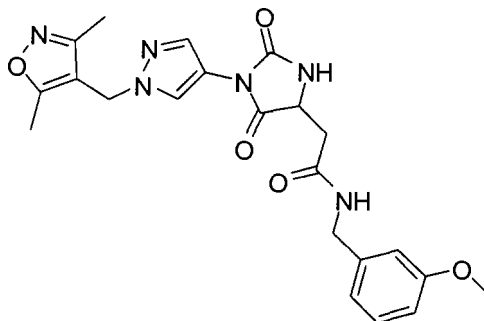
Compusul din titlu s-a dovedit a fi inhibitor pentru receptorul de gust amar hT2R08 și a avut o valoare a IC_{50} de 0,75 μ M.

Exemplul 10-49: N-benzil-2-(1-(1-((3,5-dimetilizoxazol-4-il)metil)-1H-pirazol-4-il)-2,5-dioxoimidazolidin-4-il)acetamidă



[00549] Preparată ca în Exemplul 10-48 din acid 3-(1-(1-((3,5-dimetilizoxazol-4-il)metil)-1H-pirazol-4-il)-2,5-dioxoimidazolidin-4-il)acetic (exemplul 10-44) și benzilamină. Randament: 30%. 1H RMN ($CDCl_3$, 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). Compusul din titlu s-a dovedit a fi inhibitor pentru receptorul de gust amar hT2R08 și a avut IC_{50} de 1,3 μ M.

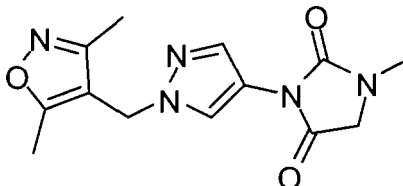
Exemplul 10-50: 2-(1-(1-((3,5-dimetilizoxazol-4-il)metil)-1H-pirazol-4-il)-2,5-dioxoimidazolidin-4-il)-N-(3-metoxibenzil)acetamidă



[00550] Preparat ca în Exemplul 10-48 din acid 3-(1-(1-((3,5-dimetilizoxazol-4-il)metil)-1H-pirazol-4-il)-2,5-dioxoimidazolidin-4-il)acetic (exemplul 10-44) și (3-metoxifenil)metanamină. Randament: 50%. LC/MS; teoretic 453; găsit 453,1

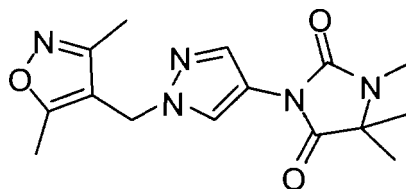
Compusul din titlu s-a dovedit a fi inhibitor pentru receptorul de gust amar hT2R08 și a avut IC_{50} de 1,7 μ M.

Exemplul 10-51: 3-(1-((3,5-dimetilizoxazol-4-il)metil)-1H-pirazol-4-il)-1-metilimidazolidin-2,4-dionă



[00551] 3-(1-((3,5-Dimetilizoxazol-4-il)metil)-1H-pirazol-4-il)imidazolidin-2,4-dionă (exemplul 10-1) (50 mg, 0,182 mmol) și carbonat de cesiu (60 mg, 0,185 mmol) s-au amestecat în DMF (1 mL) timp de 15 minute în atmosferă de azot la temperatura camerei. Apoi, a fost adăugat iodmetan (14 mg, 0,185 mmol) și reacția a continuat cu agitare, încă 2 ore. S-a adăugat H_2O (2 mL) și produsul a fost extras cu acetat de etil (1mL, 2x). Faza organică a fost colectată și spălată cu soluție saturată de bicarbonat de sodiu (2ml, 2x), uscată și filtrată. Solventul a fost îndepărtat cu un curent de azot și apoi s-a uscat suplimentar în vid avansat obținându-se 3-(1-((3,5-dimetilizoxazol-4-il)metil)-1H-pirazol-4-il)-1-metilimidazolidin-2,4-dionă sub formă de solid alb (42 mg, 80%). Randament: 80%. 1H RMN ($CDCl_3$, 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). Compusul din titlu s-a dovedit a fi inhibitor pentru receptorul de gust amar hT2R08 și a avut IC_{50} de 0,58 μ M.

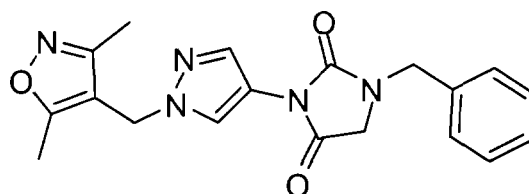
Exemplul 10-52: 3-(1-((3,5-dimetilizoxazol-4-il)metil)-1H-pirazol-4-il)-1,5,5-trimetilimidazolidin-2,4-dionă



[00552] 3-(1-((3,5-Dimetilizoxazol-4-il)metil)-1H-pirazol-4-il)-5-metilimidazolidin-2,4-dionă (exemplul 10-41) (50 mg, 0,173 mmol) și NaH 60% (8 mg, 0,190 mmol) s-au

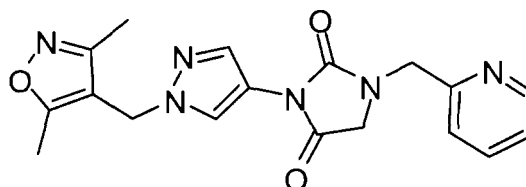
amestecat în DMF (1 mL) timp de 30 minute. A fost adăugat MeI (0,04mL, 0,190 mmol) și reacția a fost agitată încă 4 ore. Reacția a fost acidulată cu HCl 1N și s-a diluat cu acetat de etil (2 mL). Faza organică a fost uscată, filtrată și solventul a fost îndepărtat cu un curent de azot. Produsul brut a fost re-suspendat în MeOH (1 mL) și purificat prin HPLC în fază inversă (5 până la 95% acetonitril în H₂O: gradient 16 minute). Frațiunile pure s-au combinat și solventul s-a îndepărtat în vid obținându-se 3-(1-((3,5-dimetilizoxazol-4-il)metil)-1H-pirazol-4-il)-1,5,5-trimetilimidazolidin-2,4-dionă sub formă de solid alb (25 mg, 50%). ¹H RMN (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). Compusul din titlu s-a dovedit a fi inhibitor pentru receptorul de gust amar hT2R08 și a avut IC₅₀ de 0,80 μM.

Exemplul 10-53: 1-benzil-3-(1-((3,5-dimetilizoxazol-4-il)metil)-1H-pirazol-4-il)imidazolidin-2,4-dionă



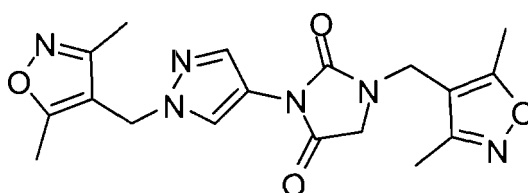
[00553] Preparat ca în exemplul 10-5 din 3-(1-((3,5-dimetilizoxazol-4-il)metil)-1H-pirazol-4-il)imidazolidin-2,4-dionă (exemplul 10-1) și bromură de benzil. Randament: 40%. ¹H RMN (CDCl₃, 400 MHz): δ 2,18 (s, 3H), 2,42 (s, 3H), 3,84 (s, 2H), 4,61 (s, 2 H), 5,06 (s, 2H), 7,40 – 7,27 (m, 5H), 7,92 (s, 1 H), 8,08 (s, 1H). Compusul din titlu s-a dovedit a fi inhibitor pentru receptorul de gust amar hT2R08 și a avut IC₅₀ de 0,09 μM.

Exemplul 10-54: 3-(1-((3,5-dimetilizoxazol-4-il)metil)-1H-pirazol-4-il)-1-(piridin-2-ilmetil)imidazolidin-2,4-dionă



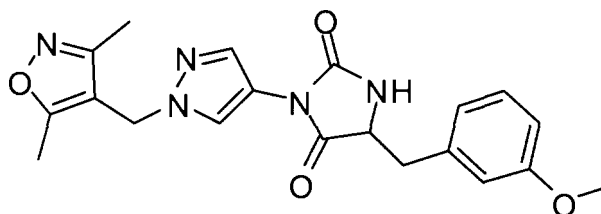
[00554] Preparat ca în Exemplul 10-5 din 3-(1-((3,5-dimetilizoxazol-4-il)metil)-1H-pirazol-4-il)imidazolidin-2,4-dionă și 2-(bromometil)piridină. Randament: 50%. ^1H RMN (CDCl_3 , 400 MHz): δ 2,19 (s, 3H), 2,41 (s, 3H), 4,12 (s, 2H), 4,71 (s, 2H), 5,05 (s, 2H), 7,72-7,23 (m, 4H), 7,92 (s, 1H) 8,08 (s, 1H). Compusul din titlu s-a dovedit a fi inhibitor pentru receptorul de gust amar hT2R08 și a avut IC_{50} de 0,68 μM .

Exemplul 10-55: 1-((3,5-dimetilizoxazol-4-il)metil)-3-(1-((3,5-dimetilizoxazol-4-il)metil)-1H-pirazol-4-il)imidazolidin-2,4-dionă



[00555] Preparat ca în Exemplul 10-5 din 3-(1-((3,5-dimetilizoxazol-4-il)metil)-1H-pirazol-4-il)imidazolidin-2,4-dionă și 4-(clorometil)-3,5-dimetilizoxazol. Randament: 50%. ^1H RMN (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). Compusul din titlu s-a dovedit a fi inhibitor pentru receptorul prezentat ca inhibitor pentru receptorul de gust amar hT2R08 și a avut IC_{50} of 0,04 μM .

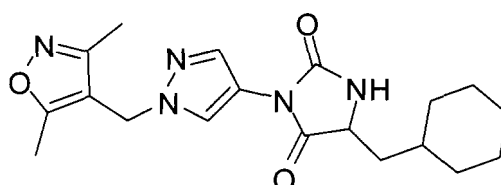
Exemplul 10-56: 3-(1-((3,5-dimetilizoxazol-4-il)metil)-1H-pirazol-4-il)-5-(3-metoxibenzil)imidazolidin-2,4-dionă



[00556] 1-((3,5-Dimetilizoxazol-4-il)metil)-1H-pirazol-4-amină clorhidrat (400 mg, 2,08 mmol), carbonat de dipiridin-2-il (450 mg, 2,08 mmol) și trietilamină (0,290 mL, 2,08 mmol) s-au agitat în diclorometan (7 mL) timp de 12 ore la temperatura camerei. Reacția a fost concentrată în vid obținându-se 4-((4-isocianato-1H-pirazol-1-il)metil)-3,5-dimetilizoxazol sub formă de solid aproape alb cu randament cantitativ. A fost

adăugat etanol (1 mL) împreună cu 2-amino-3-(3-metoxifenil)propanoat de metil (68 mg, 0,327 mmol) și trietilamină (0,064 mL, 0,461 mmol). Reacția a fost agitată la reflux timp de 12 ore, apoi s-a lăsat să se răcească la temperatura camerei. Solventul a fost îndepărtat cu un curent de azot. Produsul brut a fost resuspendat în MeOH (1 mL) și purificat prin HPLC cu fază inversă (5 până la 95% acetonitril în H₂O: gradient 16 minute). Frațiunile pure s-au combinat și solventul s-a îndepărtat în vid obținându-se 3-(1-((3,5-dimetilizoxazol-4-il)metil)-1H-pirazol-4-il)-5-(3-metoxibenzil)imidazolidin-2,4-dionă sub formă de solid alb randament: 50% ¹H RMN (CDCl₃, 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). Compusul din titlu s-a dovedit a fi inhibitor pentru receptorul de gust amar hT2R08 și a avut IC₅₀ de 0,13 μM.

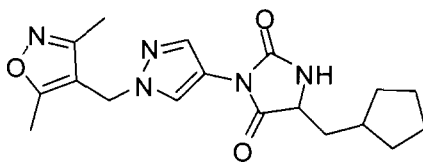
Exemplul 10-57: 5-(ciclohexilmetil)-3-(1-((3,5-dimetilizoxazol-4-il)metil)-1H-pirazol-4-il)imidazolidin-2,4-dionă



[00557] Preparată ca în Exemplul 10-56 din 1-((3,5-dimetilizoxazol-4-il)metil)-1H-pirazol-4-amină clorhidrat (exemplul 10-41a) și 2-amino-3-ciclohexilpropanoat de metil. Randament: 30%. ¹H RMN (CDCl₃, 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), 4,19-4,15 (m, 1H), 5,05 (s, 2H), 6,01 (bs, 1H), 7,91 (s, 1H), 8,05 (s, 1H). Compusul din titlu s-a dovedit a fi inhibitor pentru receptorul de gust amar hT2R08 și a avut IC₅₀ de 0,96 μM.

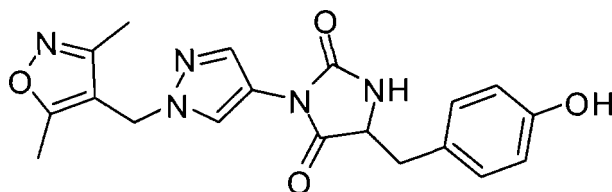
Exemplul 10-58: 5-(ciclopentilmetil)-3-(1-((3,5-dimetilizoxazol-4-il)metil)-1H-pirazol-4-il)imidazolidin-2,4-dionă

276



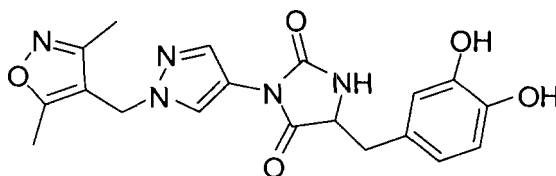
[00558] Preparată ca în Exemplul 10-56 din 1-((3,5-dimetilizoxazol-4-il)metil)-1H-pirazol-4-amină clorhidrat (exemplul 10-41a) și 2-amino-3-ciclopentilpropanoat de metil. Randament: 50%. ^1H RMN (CDCl_3 , 400 MHz): δ 1,20-1,14 (m, 3H), 1,68-1,55 (m, 6H), 2,04-1,92 (m, 2H), 2,19 (s, 3H), 2,42 (s, 3H), 4,14-4,11 (m, 1H), 5,05 (s, 2H), 5,52 (bs, 1H), 7,90 (s, 1H), 8,06 (s, 1H). Compusul din titlu s-a dovedit a fi inhibitor pentru receptorul de gust amar hT2R08 și a avut IC_{50} de 0,31 μM .

Exemplul 10-59: 3-(1-((3,5-dimetilizoxazol-4-il)metil)-1H-pirazol-4-il)-5-(4-hidroxibenzil)imidazolidin-2,4-dionă



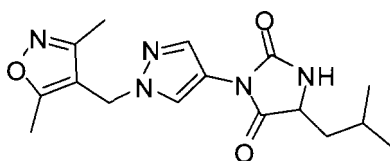
[00559] Preparat ca în Exemplul 10-56 din 1-((3,5-dimetilizoxazol-4-il)metil)-1H-pirazol-4-amină clorhidrat (exemplul 10-41a) și 2-amino-3-(4-hidroxifenil)propanoat de metil. Randament: 50%. ^1H RMN (CDCl_3 , 400 MHz): δ 2,41 (s, 3H), 2,85 (s, 3H), 3,26-3,25 (d, 1H, $J = 4$ Hz), 3,23-3,22 (d, $J = 4$ 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). Compusul din titlu s-a dovedit a fi inhibitor pentru receptorul de gust amar hT2R08 și a avut IC_{50} de 0,33 μM .

Exemplul 10-60: 5-(3,4-dihidroxibenzil)-3-(1-((3,5-dimetilizoxazol-4-il)metil)-1H-pirazol-4-il)imidazolidin-2,4-dionă



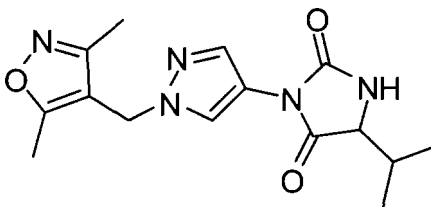
[00560] Preparată ca în Exemplul 10-56 din 1-((3,5-dimetilizoxazol-4-il)metil)-1H-pirazol-4-amină clorhidrat (exemplul 10-41a) și 2-amino-3-(3,4-dihidroxifenil)propanoat de metil. Randament: 50%. MS M+H calculat 398,1; găsit 398,1, Compusul din titlu s-a dovedit a fi inhibitor pentru receptorul de gust amar hT2R08 și a avut IC₅₀ de 0,51 μM.

Exemplul 10-61: 3-(1-((3,5-dimetilizoxazol-4-il)metil)-1H-pirazol-4-il)-5-isobutilimidazolidin-2,4-dionă



[00561] Preparată ca în Exemplul 10-41 din 1-((3,5-dimetilizoxazol-4-il)metil)-1H-pirazol-4-amină clorhidrat (exemplul 10-41a) și 2-isocyanato-4-metilpentanoat de etil. Randament: 50%. ¹H RMN (CDCl₃, 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). Compusul din titlu s-a dovedit a fi inhibitor pentru receptorul de gust amar hT2R08 și a avut IC₅₀ de 1,0 μM.

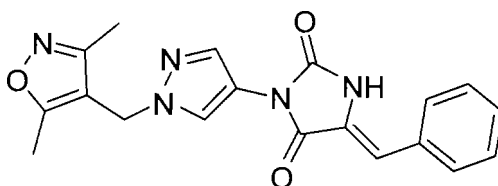
Exemplul 10-62: 3-(1-((3,5-dimetilizoxazol-4-il)metil)-1H-pirazol-4-il)-5-izopropilimidazolidin-2,4-dionă



[00562] Preparată ca în Exemplul 10-41 din 1-((3,5-dimetilizoxazol-4-il)metil)-1H-pirazol-4-amină clorhidrat (exemplul 10-41a) și 2-isocianato-3-metilbutanoat de etil. Randament: 30%. ¹H RMN (CDCl₃, 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

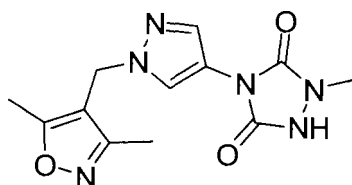
(s, 2H), 5,53 (bs, 1H), 7,90 (s, 1H), 8,05 (s, 1H). Compusul din titlu s-a dovedit a fi inhibitor pentru receptorul de gust amar hT2R08 și a avut IC_{50} de 1,1 μ M.

Exemplul 10-63: (Z)-5-benziliden-3-(1-((3,5-dimetilizoxazol-4-il)metil)-1H-pirazol-4-il)imidazolidin-2,4-dionă



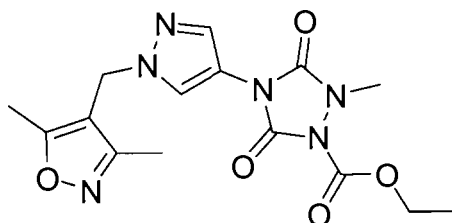
[00563] 3-(1-((3,5-Dimetilizoxazol-4-il)metil)-1H-pirazol-4-il)imidazolidin-2,4-dionă (exemplul 10-1) (275 mg, 1 mmol), benzaldehidă (140 mg, 1,3 mmol) și acetat de sodiu (205 mg, 2,5 mmol), în acetic acid glacial (3 mL) s-au iradiat într-un reactor cu microunde timp de 7 ore la 185 °C. După răcire, amestecul a fost diluat cu H₂O (100 mL) și s-a extras cu acetat de etil (3x, 50 mL). Extractele organice combinate au fost spălate cu soluție apoasă saturată de carbonat de sodiu, s-au uscat pe sulfat de sodiu, s-au filtrat și s-au concentrat. Produsul solid a fost triturat cu acetat de etil/hexani (1/1) și uscat în vid avansat obținându-se (Z)-5-benziliden-3-(1-((3,5-dimetilizoxazol-4-il)metil)-1H-pirazol-4-il)imidazolidin-2,4-dionă (173 mg, 48%) sub formă de solid galben deschis. ¹H RMN (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). Compusul din titlu s-a dovedit a fi inhibitor pentru receptorul de gust amar hT2R08 și a avut IC_{50} de 0,34 μ M.

Exemplul 10-64: 4-(1-((3,5-dimetilizoxazol-4-il)metil)-1H-pirazol-4-il)-1-metil-1,2,4-triazolidin-3,5-dionă



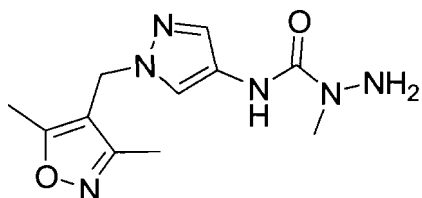
[00564] 4-(1-((3,5-Dimetilizoxazol-4-il)metil)-1H-pirazol-4-il)-2-metil-3,5-dioxo-1,2,4-triazolidin-1-carboxilat de etil (3,2 g, 8,8 mmol) a fost supus agitării într-un amestec (1/1) de MeOH/ NaOH 1N apos (100 mL) la temperatura ambiantă timp de 30 minute. Amestecul a fost acidulat cu HCl 1N apos (150 mL), extras cu acetat de etil (3x, 100 mL), uscat pe sulfat de sodiu, filtrat și concentrat obținându-se 4-(1-((3,5-dimetilizoxazol-4-il)metil)-1H-pirazol-4-il)-1-metil-1,2,4-triazolidin-3,5-dionă (2,3 g, 89%) sub formă de solid galben. ¹H RMN (DMSO-d₆, 400 MHz): δ2,18 (s, 3H), 2,44 (s, 3H), 3,05 (s, 3H), 5,17 (s, 2H), 7,94 (s, 1H), 8,13 (s, 1H).

Exemplul 10-64a: 4-(1-((3,5-Dimetilizoxazol-4-il)metil)-1H-pirazol-4-il)-2-metil-3,5-dioxo-1,2,4-triazolidin-1-carboxilat de etil



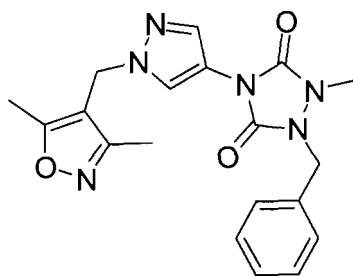
[00565] S-a adăugat cloroformiat de etil (1,3 g, 12 mmol) la un amestec de N-(1-((3,5-dimetilizoxazol-4-il)metil)-1H-pirazol-4-il)-1-metilhidrazincarboxamidă (exemplul 10-64b) (2,5 g, 9 mmol) și trietilamină (1,2 g, 12 mmol) în acetonitril (100 ml). Amestecul a fost refluxat timp de 1 oră, s-a răcit, apoi s-a diluat cu HCl apos 1N (150 mL) și s-a extras cu acetat de etil (3x, 75 mL). Extractele organice combinate s-au uscat pe sulfat de sodiu, s-au filtrat și s-au concentrat pe un rotovap. Solidul a fost triturat cu acetat de etil/hexani (1/3) și uscat în vid avansat obținându-se 4-(1-((3,5-dimetilizoxazol-4-il)metil)-1H-pirazol-4-il)-2-metil-3,5-dioxo-1,2,4-triazolidin-1-carboxilat de etil (3,2 g, 94%) sub formă de solid alb. ¹H RMN (DMSO-d₆, 400 MHz): δ1,28 (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).

Exemplul 10-64b: N-(1-((3,5-dimetilizoxazol-4-il)metil)-1H-pirazol-4-il)-1-metilhidrazin-carboxamidă



[00566] 1-((3,5-Dimetilizoxazol-4-il)metil)-1H-pirazol-4-carbonil azidă (exemplul 10-1a) (1,25 g, 5,3 mmol) a fost agitat în toluen (30 mL) la temperatura de reflux timp de 40 minute. Amestecul a fost s-a răcit la temperatura ambiantă și s-a adăugat metilhidrazină (0,3 mL, 260 mg, 5,6 mmol) și amestecul a fost refluxat timp de 30 minute. După răcirea reacției la temperatura camerei, solventul a fost îndepărtat pe un evaporator rotativ și produsul solid a fost triturat cu acetat de etil/hexani (2/5) și uscat în vid înalt obținându-se N-(1-((3,5-dimetilizoxazol-4-il)metil)-1H-pirazol-4-il)-1-metilhidrazincarboxamidă (1,1 g, 79%) sub formă de solid alb. ^1H RMN (DMSO- d_6 , 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).

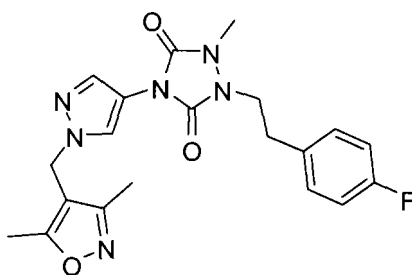
Exemplul 10-65: 1-Benzil-4-(1-((3,5-dimetilizoxazol-4-il)metil)-1H-pirazol-4-il)-2-metil-1,2,4-triazolidin-3,5-dionă



[00567] 4-(1-((3,5-Dimetilizoxazol-4-il)metil)-1H-pirazol-4-il)-1-metil-1,2,4-triazolidin-3,5-dionă (exemplul 10-64) (785 mg, 2,7 mmol) a fost dizolvat în acetonitril (50 mL). S-au adăugat trietilamină (1 g, 10 mmol) și bromură de benzil (510 mg, 3 mmol) și reacția a fost agitată la temperatura ambiantă timp de 12 ore. Amestecul a fost apoi concentrat pe un rotovap, dizolvat în metanol (5 mL) și purificat prin HPLC cu fază inversă (5-95% acetonitril în H_2O : gradient 25 minute). Frațiunile pure s-au adunat și s-au concentrat și produsul a fost recristalizat din etanol obținându-se 1-benzil-4-(1-((3,5-dimetilizoxazol-4-il)metil)-1H-pirazol-4-il)-2-metil-1,2,4-triazolidin-3,5-dionă (210 mg, 20%) sub formă de solid alb. ^1H RMN (DMSO- d_6 , 400 MHz): δ 2,13 (s, 3H), 2,39

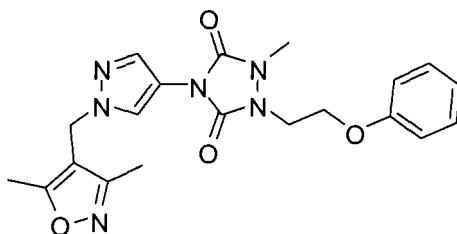
(s, 3H), 3,09 (s, 3H), 4,81 (s, 2H), 5,18 (s, 2H), 7,30-7,35 (m, 5H), 7,76 (s, 1H), 8,18 (s, 1H). MS M+H calculat 381,1; găsit 381,1. Punct topire: 124-126 °C. Compusul din titlu s-a dovedit a fi inhibitor pentru receptorul de gust amar hT2R08 și a avut IC₅₀ de 0,02 μM.

Exemplul 10-66: 1-Benzil-4-(1-((3,5-dimetilizoxazol-4-il)metil)-1H-pirazol-4-il)-2-metil-1,2,4-triazolidin-3,5-dionă



[00568] Preparat ca în Exemplul 10-65 din 4-(1-((3,5-dimetilizoxazol-4-il)metil)-1H-pirazol-4-il)-1-metil-1,2,4-triazolidin-3,5-dionă (exemplul 10-64) și 1-(2-bromoetil)-4-fluorobenzen. Randament: 14%. ¹H RMN (CDCl₃, 400 MHz): δ2,18 (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).. Compusul din titlu s-a dovedit a fi inhibitor pentru receptorul de gust amar hT2R08 și a avut IC₅₀ de 0,01 μM.

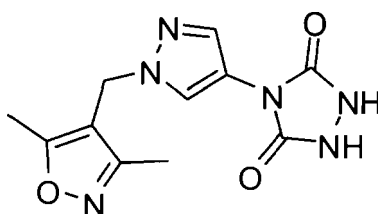
Exemplul 10-67: 4-(1-((3,5-dimetilizoxazol-4-il)metil)-1H-pirazol-4-il)-1-metil-2-(2-fenoxietil)-1,2,4-triazolidin-3,5-dionă



[00569] Preparat ca în Exemplul 10-65 din 4-(1-((3,5-dimetilizoxazol-4-il)metil)-1H-pirazol-4-il)-1-metil-1,2,4-triazolidin-3,5-dionă (exemplul 10-64) și (2-

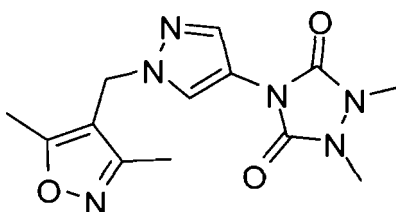
bromoetoxi)benzen. Randament: 20%. ^1H RMN (DMSO-d_6 , 400 MHz): δ 2,13 (s, 3H), 2,40 (s, 3H), 3,15 (s, 3H), 3,99 (t, $J=4,4$ Hz, 2H), 4,13 (t, $J=4,8$ Hz, 2H), 5,20 (s, 2H), 6,80 (d, $J=8$ Hz, 2H), 6,90 (t, $J=7,1$ Hz, 1H), 7,22 (t, $J=8$ Hz, 2H), 7,75 (s, 1H), 8,17 (s, 1H). Compusul din titlu s-a dovedit a fi inhibitor pentru receptorul de gust amar hT2R08 și a avut IC_{50} de 0,031 μM .

Exemplul 10-68: 4-(1-((3,5-dimetilizoxazol-4-il)metil)-1H-pirazol-4-il)-1,2,4-triazolidin-3,5-dionă



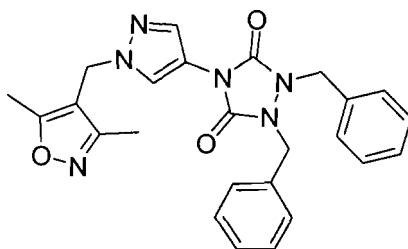
[00570] 1-((3,5-Dimetilizoxazol-4-il)metil)-1H-pirazol-4-carbonil azida (exemplul 10-1a) (1g, 4,1 mmol) s-a refluxat în toluen (100 mL) timp de o oră. Reacția s-a răcit la temperatura camerei și s-a adăugat hidrazincarboxilat de etil (0,45g, 43 mmol). Reacția a fost încălzită la reflux și s-a agitat timp de 1 oră, apoi s-a răcit și s-a concentrat pe un evaporator rotativ. Reziduul a fost preluat în etanol (100 ml) și a fost adăugat carbonat de potasiu (100 mg). Amestecul a fost refluxat timp de 12 ore, apoi s-a filtrat, s-a răcit la temperatura ambiantă și s-a neutralizat cu acid acetic (circa 7 picături). Solventul a fost îndepărtat pe un evaporator rotativ și solidul rezultat a fost triturat cu acetat de etil/hexani (1/9) obținându-se 4-(1-((3,5-dimetilizoxazol-4-il)metil)-1H-pirazol-4-il)-1,2,4-triazolidin-3,5-dionă (0,98 g, 85%) sub formă de solid aproape alb. ^1H RMN (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).

Exemplul 10-69: 4-(1-((3,5-dimetilizoxazol-4-il)metil)-1H-pirazol-4-il)-1,2-dimetil-1,2,4-triazolidin-3,5-dionă



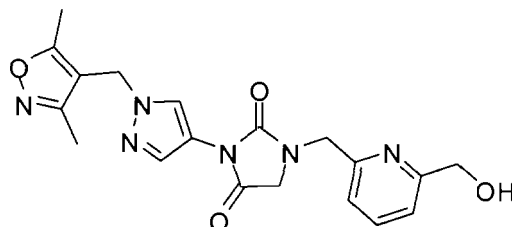
[00571] S-au supus agitării 4-(1-((3,5-dimetilizoxazol-4-il)metil)-1H-pirazol-4-il)-1,2,4-triazolidin-3,5-dionă (exemplul 10-68) (100 mg, 0,36 mmol), iodură de metil (141 mg, 1 mmol) și carbonat de cesiu (325 mg, 1 mmol), într-un amestec 2/1 de acetonitril/DMF (5 mL), la temperatura ambiantă timp de 2 ore. Amestecul a fost diluat cu HCl 1N apos (100 mL) și s-a extras cu acetat de etil (3x, 50 mL). Extractele organice combinate s-au uscat pe sulfat de sodiu, s-au concentrat și reziduul brut s-a preluat în MeOH și purificat prin HPLC cu fază inversă (5 până la 95% acetonitril în H₂O: gradient 25 minute). Frațiunile pure s-au adunat și s-au concentrat obținându-se 4-(1-((3,5-dimetilizoxazol-4-il)metil)-1H-pirazol-4-il)-1,2-dimetil-1,2,4-triazolidin-3,5-dionă (89 mg, 80%) sub formă de semisolid limpede. ¹H RMN (CDCl₃, 400 MHz): δ2,18 (s, 3H), 2,41 (s, 3H), 3,22 (s, 6H), 5,04 (s, 2H), 7,88 (s, 1H), 8,03 (s, 1H). Compusul din titlu s-a dovedit a fi inhibitor pentru receptorul de gust amar hT2R08 și a avut IC₅₀ de 0,6 μM.

Exemplul 10-70: 1,2-dibenzil-4-(1-((3,5-dimetilizoxazol-4-il)metil)-1H-pirazol-4-il)-1,2,4-triazolidin-3,5-dionă



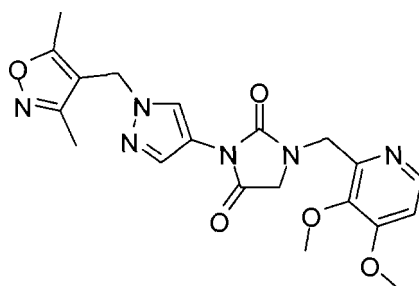
[00572] Preparată ca în Exemplul 10-65 din 4-(1-((3,5-dimetilizoxazol-4-il)metil)-1H-pirazol-4-il)-1,2-dimetil-1,2,4-triazolidin-3,5-dionă (exemplul 10-69) și bromură de benzil. Randament: 69%. ¹H RMN (CDCl₃, 400 MHz): δ2,14 (s, 3H), 2,36 (s, 3H), 4,65 (s, 4H), 4,99 (s, 2H), 7,06-7,08 (m, 4H), 7,19-7,25 (m, 6H), 7,86 (s, 1H), 8,02 (s, 1H). Compusul din titlu s-a dovedit a fi inhibitor pentru receptorul de gust amar hT2R08 și a avut IC₅₀ de 0,8 μM.

Exemplul 10-71: 3-(1-((3,5-dimetilizoxazol-4-il)metil)-1*H*-pirazol-4-il)-1-((6-(hidroximetil) piridin-2-il)metil)imidazolidin-2,4-dionă



[00573] Preparată ca în exemplul 10-5 din 3-(1-((3,5-dimetilizoxazol-4-il)metil)-1*H*-pirazol-4-il)imidazolidin-2,4-dionă și 6-bromometil-2-piridinmetanol. Randament: 35%. MS M+H calculat 397,2; găsit 397,2, Compusul din titlu s-a dovedit a fi inhibitor pentru receptorul de gust amar hT2R08 și a avut IC₅₀ de 0,72 μM.

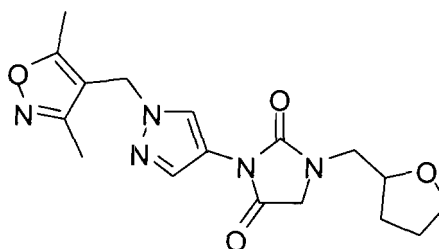
Exemplul 10-72: 1-((3,4-dimetoxipiridin-2-il)metil)-3-(1-((3,5-dimetilizoxazol-4-il)metil)-1*H*-pirazol-4-il)imidazolidin-2,4-dionă



[00574] Preparată ca în exemplul 10-5 din 3-(1-((3,5-dimetilizoxazol-4-il)metil)-1*H*-pirazol-4-il)imidazolidin-2,4-dionă și 3,4-dimetoxi-2-clorometil piridină clorhidrat. Randament: 26%. MS M+H calculat 360,2; găsit 360,2. Compusul din titlu s-a dovedit a fi inhibitor pentru receptorul de gust amar hT2R08 și a avut IC₅₀ de 1,0 μM.

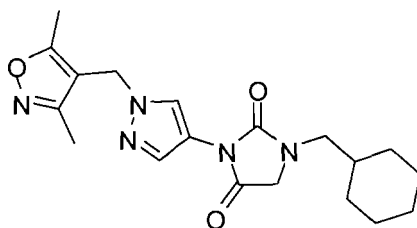
Exemplul 10-73: 3-(1-((3,5-dimetilizoxazol-4-il)metil)-1*H*-pirazol-4-il)-1-((6-(tetrahidro-furan-2-il)metil)imidazolidin-2,4-dionă

285



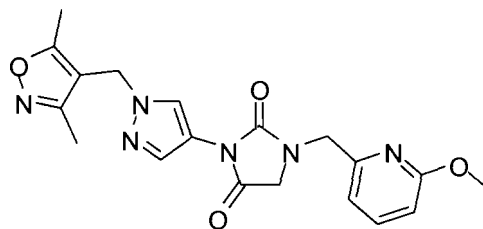
[00575] Preparată ca în exemplul 10-52 din 3-(1-((3,5-dimetilizoxazol-4-il)metil)-1*H*-pirazol-4-il)imidazolidin-2,4-dionă și bromură de tetrahidrofurfuril. Randament: 28%. MS $M+H$ calculat 427,2; găsit 427,2. Compusul din titlu s-a dovedit a fi inhibitor pentru receptorul de gust amar hT2R08 și a avut IC_{50} de 1,4 μM .

Exemplul 10-74: 1-(ciclohexilmetil)-3-(1-((3,5-dimetilizoxazol-4-il)metil)-1*H*-pirazol-4-il)imidazolidin-2,4-dionă



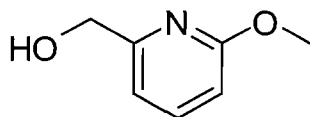
[00576] Preparată ca în exemplul 10-52 din 3-(1-((3,5-dimetilizoxazol-4-il)metil)-1*H*-pirazol-4-il)imidazolidin-2,4-dionă (exemplul 10-1) și bromometilciclohexan. Randament: 20%. 1H RMN (DMSO- d_6 , 400 MHz): δ 0,88 (q, $J = 10,4$ Hz, 2H), 1,09-1,19 (m, 3H), 1,58-1,65 (m, 6H), 2,12 (s, 3H), 2,38 (s, 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 $M+H$ calculated 372,2; găsit 372,1. Compusul din titlu s-a dovedit a fi inhibitor pentru receptorul de gust amar hT2R08 și a avut IC_{50} de 0,28 μM .

Exemplul 10-75: 3-(1-((3,5-dimetilizoxazol-4-il)metil)-1*H*-pirazol-4-il)-1-((6-metoxipiridin-2-il)metil)imidazolidin-2,4-dionă



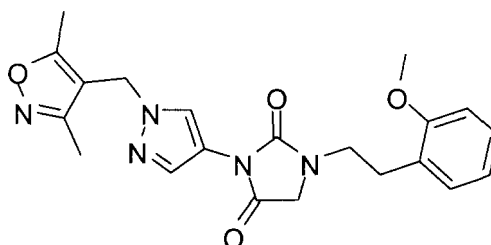
[00577] 3-(1-((3,5-Dimetilizoxazol-4-il)metil)-1H-pirazol-4-il)imidazolidin-2,4-dionă (100 mg, 0,4 mmol), (6-metoxi-piridin-2-il)-metanol (exemplul 10-75a) (101 mg, 0,7 mmol), tributilfosfină (147 mg, 0,7 mmol), și 1,1'-azobis(N,N-dimetilformamidă) (125 mg, 0,7 mmol) s-au dizolvat în THF (5 mL) și s-au agitat la temperatura camerei timp de 15 ore. Reacția a fost diluată cu soluție salină (100 mL) și s-a extras cu acetat de etil (2x, 100 mL). Extractele organice combinate s-au uscat pe sulfat de magneziu, s-au filtrat și s-au concentrat pe un rotovap. Reziduul a fost preluat în metanol (5 mL) și purificat prin HPLC cu fază inversă (5 până la 95% acetonitril în H₂O: gradient 25 minute). Frațiunile pure s-au combinat, s-au concentrat apoi s-au redizolvat în acetat de etil/hexan (1:9). Soluția a fost răcită la 5 °C timp de 15 ore, formându-se un solid alb. Precipitatul a fost colectat obținându-se 3-(1-((3,5-dimetilizoxazol-4-il)metil)-1H-pirazol-4-il)-1-((6-metoxipiridin-2-il)metil)imidazolidin-2,4-dionă (5 mg, 4%) sub formă de solid alb. ¹H RMN (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 calculat 397,2; găsit 397,2. Compusul din titlu s-a dovedit a fi inhibitor pentru receptorul de gust amar hT2R08 și a avut IC₅₀ de 0,23 μM.

Exemplul 10-75a: (6-metoxipiridin-2-il)metanol



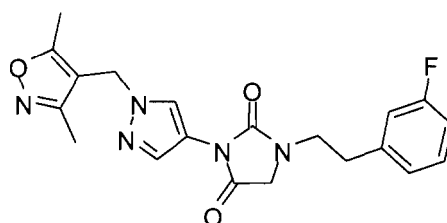
[00578] 6-Metoxipiridin-2-carboxilat de metil (2g, 11,96 mmol) în metanol anhidru (20 mL) s-a răcit la 0 °C în azot și la soluție s-a adăugat lent borohidru de sodiu (1,36g, 35,89 mmol). Reacția a fost lăsată sub agitare la 0 °C timp de 30 minute, apoi s-a lăsat să se încălzească la temperatura camerei timp de 1 oră. Reacția a fost stinsă cu apă și s-a concentrat pe un evaporator rotativ. Reacția a fost diluată cu soluție salină (100 mL) și s-a extras cu diclorometan/ soluție 2-propanol (2:1) (3x, 150 mL). Extractele organice combinate s-au uscat pe sulfat de magneziu, s-au filtrat și s-au concentrat pe un evaporator rotativ obținându-se (6-metoxipiridin-2-il)metanol (500 mg, 30%) sub formă de ulei. MS M+H calculat 140,1; găsit 140,1.

Exemplul 10-76: 3-(1-((3,5-dimetilizoxazol-4-il)metil)-1H-pirazol-4-il)-1-(2-metoxifenetil) imidazolidin-2,4-dionă



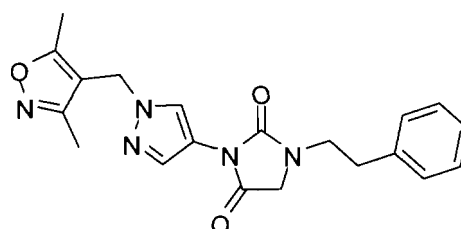
[00579] Preparată ca în exemplul 10-52 din 3-(1-((3,5-dimetilizoxazol-4-il)metil)-1H-pirazol-4-il)imidazolidin-2,4-dionă (exemplul 6) și bromură de 2-metoxifenetil. Randament: 52%. ¹H RMN (DMSO-*d*₆, 400 MHz): δ 2,11 (s, 3H), 2,38 (s, 3H), 2,80 (t, *J* = 7,2 Hz, 2H), 3,51 (t, *J* = 7,2 Hz, 2H), 3,75 (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 calculat 410,2; găsit 410,1. Punct topire: 97-98 °C. Compusul din titlu s-a dovedit a fi inhibitor pentru receptorul de gust amar hT2R08 și a avut IC₅₀ de 0,14 μM.

Exemplul 10-77: 3-(1-((3,5-dimetilizoxazol-4-il)metil)-1H-pirazol-4-il)-1-(3-fluorofenetil) imidazolidin-2,4-dionă



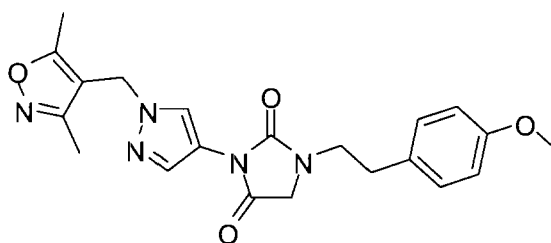
[00580] Preparat ca în exemplul 10-52 din 3-(1-((3,5-dimetilizoxazol-4-il)metil)-1*H*-pirazol-4-il)imidazolidin-2,4-dionă (exemplul 10-1) și bromură de 3-fluorofenetil. Randament: 22%. ¹H RMN (DMSO-*d*₆, 400 MHz): δ2,11 (s, 3H), 2,38 (s, 3H), 2,80 (t, *J* = 7,2 Hz, 2H), 3,57 (t, *J* = 7,2 Hz, 2H), 4,06 (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 calculat 398,2; găsit 398,1, Punct topire: 110-111 °C. Compusul din titlu s-a dovedit a fi inhibitor pentru receptorul de gust amar hT2R08 și a avut IC₅₀ de 0,06 μM.

Exemplul 10-78: 3-(1-((3,5-dimetilizoxazol-4-il)metil)-1*H*-pirazol-4-il)-1-fenetilimidazolidin-2,4-dionă



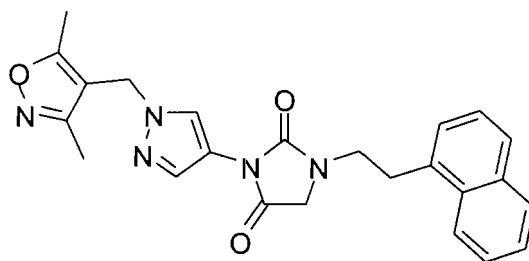
[00581] Preparat ca în exemplul 10-52 din 3-(1-((3,5-dimetilizoxazol-4-il)metil)-1*H*-pirazol-4-il)imidazolidin-2,4-dionă (exemplul 10-1) și bromură de fenetil. Randament: 37%. ¹H RMN (DMSO-*d*₆, 400 MHz): δ2,11 (s, 3H), 2,38 (s, 3H), 2,83 (t, *J* = 6,4 Hz, 2H), 3,55 (t, *J* = 7,4 Hz, 2H), 4,03 (s, 2H), 5,17 (s, 2H), 7,18-7,30 (m, 5H), 7,73 (s, 1H), 8,13 (s, 1H). MS M+H calculated 380,2; găsit 380,1. Punct topire: 95-96 °C. Compusul din titlu s-a dovedit a fi inhibitor pentru receptorul de gust amar hT2R08 și a avut IC₅₀ de 0,14 μM.

Exemplul 10-79: 3-(1-((3,5-dimetilizoxazol-4-il)metil)-1*H*-pirazol-4-il)-1-(4-metoxifenetil)imidazolidin-2,4-dionă



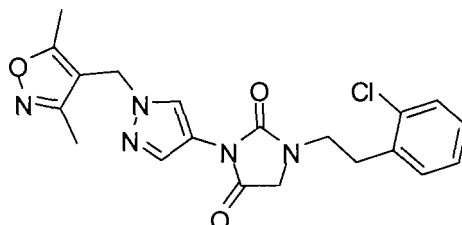
[00582] Preparată ca în exemplul 10-52 din 3-(1-((3,5-dimetilizoxazol-4-il)metil)-1*H*-pirazol-4-il)imidazolidin-2,4-dionă (exemplul 10-1) și bromură de 4-metoxifenetil. Randament: 32%. ^1H RMN ($\text{DMSO}-d_6$, 400 MHz): δ 2,11 (s, 3H), 2,38 (s, 3H), 2,78 (t, $J = 7,4$ Hz, 2H), 3,50 (t, $J = 7,4$ 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 $\text{M}+\text{H}$ calculat 410,18; găsit 410,2. Compusul din titlu s-a dovedit a fi inhibitor pentru receptorul de gust amar hT2R08 și a avut IC_{50} de 0,04 μM .

Exemplul 10-80: 3-(1-((3,5-dimetilizoxazol-4-il)metil)-1*H*-pirazol-4-il)-1-(2-naftalen-1-il)etil)imidazolidin-2,4-dionă



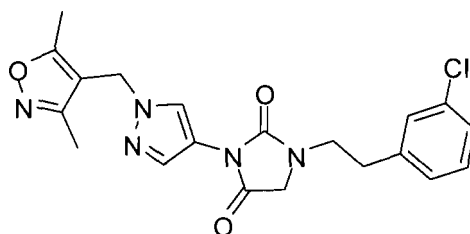
[00583] Preparată ca în exemplul 10-52 din 3-(1-((3,5-dimetilizoxazol-4-il)metil)-1*H*-pirazol-4-il)imidazolidin-2,4-dionă (exemplul 10-1) și 1-(2-bromoetil)naftalină. Randament: 20%. MS $\text{M}+\text{H}$ calculat 430,18; găsit 430,2. Compusul din titlu s-a dovedit a fi inhibitor pentru receptorul de gust amar hT2R08 și a avut IC_{50} de 1,27 μM .

Exemplul 10-81: 1-(2-clorofenetil)-3-(1-((3,5-dimetilizoxazol-4-il)metil)-1H-pirazol-4-il) imidazolidin-2,4-dionă



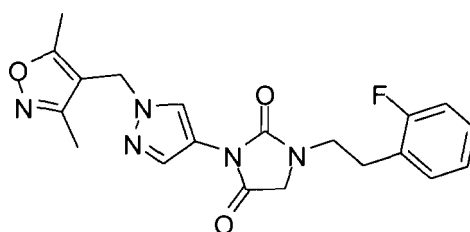
[00584] Preparată ca în exemplul 10-52 din 3-(1-((3,5-dimetilizoxazol-4-il)metil)-1H-pirazol-4-il) imidazolidin-2,4-dionă (exemplul 10-1) și bromură de 2-clorofenetil. Randament: 25%. MS M+H calculat 414,13; găsit 414,2. Compusul din titlu s-a dovedit a fi inhibitor pentru receptorul de gust amar hT2R08 și a avut IC_{50} de 0,25 μ M.

Exemplul 10-82: 1-(3-clorofenetil)-3-(1-((3,5-dimetilizoxazol-4-il)metil)-1H-pirazol-4-il) imidazolidin-2,4-dionă



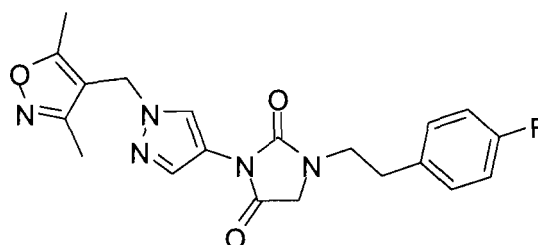
[00585] Preparată ca în exemplul 10-52 din 3-(1-((3,5-dimetilizoxazol-4-il)metil)-1H-pirazol-4-il) imidazolidin-2,4-dionă (exemplul 10-1) și bromură de 3-clorofenetil. Randament: 27%. MS M+H calculat 414,13; găsit 414,2. Compusul din titlu s-a dovedit a fi inhibitor pentru receptorul de gust amar hT2R08 și a avut IC_{50} 0,20 μ M.

Exemplul 10-83: 3-(1-((3,5-dimetilizoxazol-4-il)metil)-1H-pirazol-4-il)-1-(2-fluorofenetil) imidazolidin-2,4-dionă



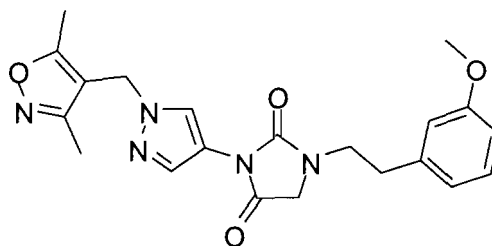
[00586] Preparat ca în exemplul 10-52 din 3-(1-((3,5-dimetilizoxazol-4-il)metil)-1*H*-pirazol-4-il)imidazolidin-2,4-dionă (exemplul 10-1) și bromură de 2-fluorofenetil. Randament: 24%. MS M+H calculat 398,16; găsit 398,1. Compusul din titlu s-a dovedit a fi inhibitor pentru receptorul de gust amar hT2R08 și a avut IC₅₀ de 0,13 μM.

Exemplul 10-84: 3-(1-((3,5-dimetilizoxazol-4-il)metil)-1*H*-pirazol-4-il)-1-(4-fluorofenetil)imidazolidin-2,4-dionă



[00587] Preparată ca în exemplul 10-52 din 3-(1-((3,5-dimetilizoxazol-4-il)metil)-1*H*-pirazol-4-il)imidazolidin-2,4-dionă (exemplul 10-1) și bromură de 4-fluorofenetil. Randament: 34%. MS M+H calculat 398,16; găsit 398,1. Compusul din titlu s-a dovedit a fi inhibitor pentru receptorul de gust amar hT2R08 și a avut IC₅₀ de 0,01 μM.

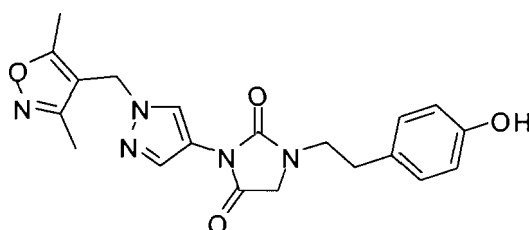
Exemplul 10-85: 3-(1-((3,5-dimetilizoxazol-4-il)metil)-1*H*-pirazol-4-il)-1-(3-metoxifenetil)imidazolidin-2,4-dionă



[00588] Preparată ca în exemplul 10-52 din 3-(1-((3,5-dimetilizoxazol-4-il)metil)-1*H*-pirazol-4-il)imidazolidin-2,4-dionă (exemplul 10-1) și bromură de 3-metoxifenetil. Randament: 34%. MS M+H calculat 410,18; găsit 410,1. Compusul din titlu s-a

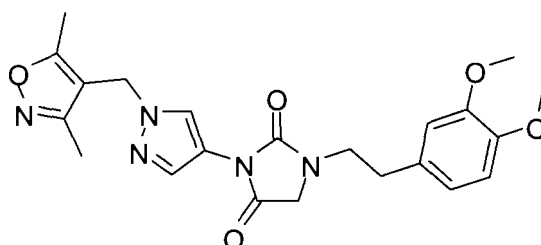
dovedit a fi inhibitor pentru receptorul de gust amar hT2R08 și a avut IC_{50} de 0,16 μ M.

Exemplul 10-86: 3-(1-((3,5-dimetilizoxazol-4-il)metil)-1H-pirazol-4-il)-1-(4-hidroxifenetil)imidazolidin-2,4-dionă



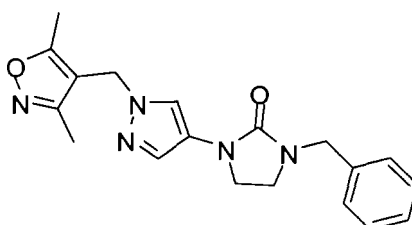
[00589] Preparată ca în exemplul 10-52 din 3-(1-((3,5-dimetilizoxazol-4-il)metil)-1H-pirazol-4-il)imidazolidin-2,4-dionă (exemplul 10-1) și bromură de 4-hidroxifenetil. Randament: 31%. MS M+H calculat 396,16; găsit 396,1. Compusul din titlu s-a dovedit a fi inhibitor pentru receptorul de gust amar hT2R08 și a avut IC_{50} de 0,41 μ M.

Exemplul 10-87: 1-(3,4-dimetoxifenetil)-3-(1-((3,5-dimetilizoxazol-4-il)metil)-1H-pirazol-4-il)imidazolidin-2,4-dionă



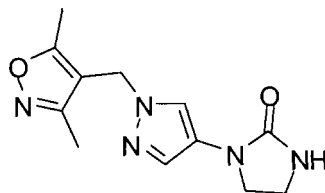
[00590] Preparată ca în exemplul 10-52 din 3-(1-((3,5-dimetilizoxazol-4-il)metil)-1H-pirazol-4-il)imidazolidin-2,4-dionă (exemplul 10-1) și bromură de 3,4-dimetoxifenetil. Randament: 36%. MS M+H calculat 440,19; găsit 440,2. Compusul din titlu s-a dovedit a fi inhibitor pentru receptorul de gust amar hT2R08 și a avut IC_{50} de 0,26 μ M.

Exemplul 10-88: 1-benzil-3-(1-((3,5-dimetilizoxazol-4-il)metil)-1H-pirazol-4-il)imidazolidin-2-onă



[00591] 1-(1-((3,5-dimetilizoxazol-4-il)metil)-1H-pirazol-4-il)imidazolidin-2-onă (exemplul 10-88a) (50 mg, 0,19 mmol) și 60% hidrură de sodiu (8 mg, 0,21 mmol) în DMF (3 mL) s-au agitat la temperatura camerei timp de 15 minute apoi s-au răcit la 0 °C. S-a adăugat bromură de benzil (33 mg, 0,19 mmol) la amestec și s-a lăsat să se încălzească până la temperatura camerei timp de 2 ore. Reacția a fost stinsă cu metanol și s-a concentrat pe un evaporator rotativ. Reacția a fost diluată cu soluție salină (50 mL) și s-a extras cu diclormetan (2x, 50 mL). Extractele organice combinate s-au uscat pe sulfat de magneziu, s-au filtrat și s-au concentrat pe un evaporator rotativ. Reziduul a fost purificat prin cromatografie pe coloană cu silice (100% până la 90% diclormetan în metanol: gradient 30 minute) obținându-se 1-benzil-3-(1-((3,5-dimetilizoxazol-4-il)metil)-1H-pirazol-4-il)imidazolidin-2-onă (21 mg, 31%) sub formă de solid alb. MS M+H calculat 352,17; găsit 352,2. Compusul din titlu s-a dovedit a fi inhibitor pentru receptorul de gust amar hT2R08 și a avut IC₅₀ de 0,71 μM.

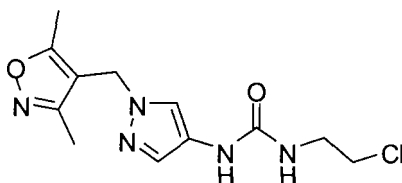
Exemplul 10-88a: 1-(1-((3,5-dimetilizoxazol-4-il)metil)-1H-pirazol-4-il)imidazolidin-2-onă



[00592] 1-(2-cloroetil)-3-(1-((3,5-dimetilizoxazol-4-il)metil)-1H-pirazol-4-il)uree (exemplul 10-88b) (115 mg, 0,39 mmol) și hidrură de sodiu 60% (17mg, 0,42 mmol) în DMF (2 mL) s-au agitat la 0 °C timp de 15 minute, apoi s-au lăsat să se încălzească până la temperatura camerei sub agitare, timp de 2 ore. Reacția a fost stinsă cu metanol și s-a concentrat pe un evaporator rotativ. Reacția a fost diluată cu soluție salină (50 mL) și s-a extras cu diclormetan (2x, 50 mL). Extractele organice combinate s-au uscat pe sulfat de magneziu, s-au filtrat și s-au concentrat pe un evaporator rotativ. Reziduul a fost purificat prin cromatografie pe coloană cu silice (100% până la 90% diclormetan în metanol: gradient 30 minute) obținându-se 1-(1-((3,5-dimetilizoxazol-4-il)metil)-1H-pirazol-4-il)imidazolidin-2-onă (98 mg, 97%) sub

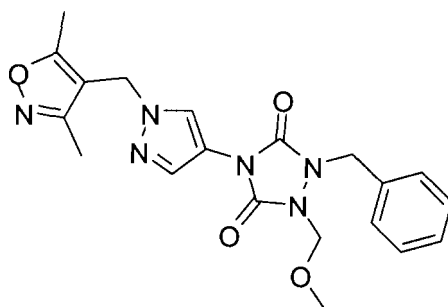
formă de solid alb. ^1H RMN ($\text{DMSO}-d_6$, 400 MHz): δ 2,10 (s, 3H), 2,37 (s, 3H), 3,35-3,39 (m, 2H), 3,61 (d, $J = 8,8$ Hz, 1H), 3,63 (d, $J = 10,4$ Hz, 1H), 5,07 (s, 2H), 6,71 (s, 1H), 7,42 (s, 1H), 7,74 (s, 1H). MS $M+H$ calculat 262,12; găsit 262,1.

Exemplul 10-88b: 1-(2-cloroetil)-3-(1-((3,5-dimetilizoxazol-4-il)metil)-1H-pirazol-4-il)uree



[00593] 1-((3,5-dimetilizoxazol-4-il)metil)-1H-pirazol-4-amină (419mg, 2,18 mmol) și 2- izocianat de cloroetil (230mg, 2,18 mmol) în acetonitril (5 mL) s-au încălzit la 65 °C timp de 16 ore. Reacția s-a răcit la temperatura camerei și s-a concentrat pe un evaporator rotativ. Reziduul a fost purificat prin cromatografie pe coloană cu silice (100% până la 90% diclormetan în metanol: gradient 30 minute), s-a uscat și s-a triturat cu acetat de etil/hexani (1/9) obținându-se 1-(2-cloroetil)-3-(1-((3,5-dimetilizoxazol-4-il)metil)-1H-pirazol-4-il)uree (258 mg, 40%) sub formă de solid galben. MS $M+H$ calculat 298,10; găsit 298,1.

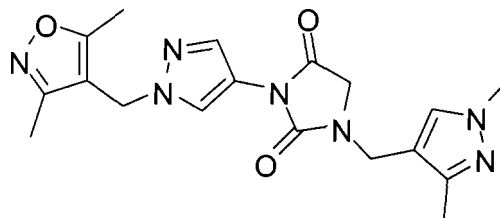
Exemplul 10-89: 1-benzil-4-(1-((3,5-dimetilizoxazol-4-il)metil)-1H-pirazol-4-il)-2-(metoximetil)-1,2,4-triazolidin-3,5-dionă



[00594] Preparată ca în exemplul 10-91 din 1-benzil-4-(1-((3,5-dimetilizoxazol-4-il)metil)-1H-pirazol-4-il)-1,2,4-triazolidin-3,5-dionă (exemplul 10-91a) și bromometil metil eter. Randament: 18%. MS $M+H$ calculat 411,17; găsit 411,2. Compusul din

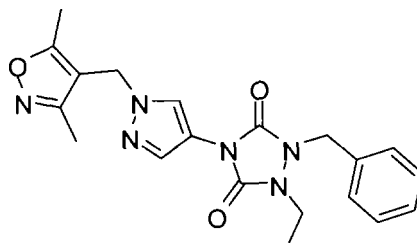
titlu s-a dovedit a fi inhibitor pentru receptorul de gust amar hT2R08 și a avut IC_{50} de 0,02 μ M.

Exemplul 10-90: 1-((1,3-dimetil-1H-pirazol-4-il)metil)-3-(1-((3,5-dimetilizoxazol-4-il)metil)-1H-pirazol-4-il)imidazolidin-2,4-dionă



[00595] 3-(1-((3,5-dimetilizoxazol-4-il)metil)-1H-pirazol-4-il)imidazolidin-2,4-dionă (10a)(200 mg, 0,7 mmol), 4-(clorometil)-1,3-dimetil-1H-pirazol (144 mg, 1 mmol) și carbonat de cesiu (325 mg, 1 mmol) s-au dizolvat în 2 mL DMF și s-au iradiat într-un reactor cu microunde la 165°C timp de 5 minute. Reacția s-a răcit la temperatura camerei și precipitatul sub formă de sare a fost îndepărtat prin filtrare. A fost obținută o soluție limpede conținând produsul brut care s-a purificat prin HPLC (10 până la 95% acetonitril/apă; 25 minute) obținându-se 1-((1,3-dimetil-1H-pirazol-5-il)metil)-3-(1-((3,5-dimetilizoxazol-4-il)metil)-1H-pirazol-4-il)imidazolidin-2,4-dionă (150 mg, 53%) sub formă de solid maro.¹2,09H RMN (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 calculat 384,2; găsit 384,2, Punct topire: 145-146 °C.

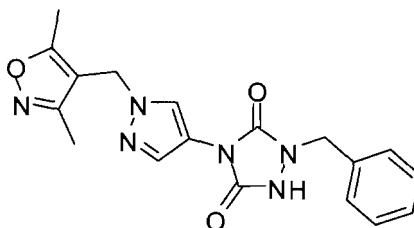
Exemplul 10-91: 1-benzil-4-(1-((3,5-dimetilizoxazol-4-il)metil)-1H-pirazol-4-il)-2-etil-1,2,4-triazolidin-3,5-dionă



[00596] 1-Benzil-4-(1-((3,5-dimetilizoxazol-4-il)metil)-1H-pirazol-4-il)-1,2,4-triazolidin-3,5-dionă (100 mg, 0,27 mmol), brometan (149 mg, 1,36 mmol) și carbonat de cesiu

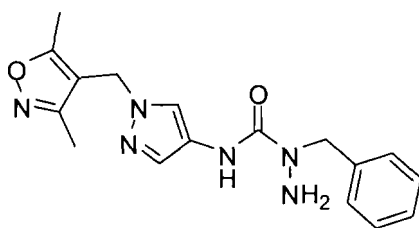
(355 mg, 1,1 mmol) în DMF (5 mL) s-au încălzit la 80 °C timp de 15 ore. Reacția s-a răcit la temperatura camerei, s-a diluat cu soluție salină (50 mL) și s-a extras cu acetat de etil (2x, 50 mL). Extractele organice combinate s-au uscat pe sulfat de magneziu, s-au filtrat și s-au concentrat pe un evaporator rotativ. Reziduul a fost purificat prin HPLC (5 până la 95% acetonitril în H₂O: gradient 25 minute), obținându-se 1-benzil-4-(1-((3,5-dimetilizoxazol-4-il)metil)-1H-pirazol-4-il)-2-etil-1,2,4-triazolidin-3,5-dionă (40 mg, 37%) sub formă de ulei. ¹H RMN (DMSO-*d*₆, 400 MHz): δ0,97 (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 calculat 395,18; găsit 395,2. Compusul din titlu s-a dovedit a fi inhibitor pentru receptorul de gust amar hT2R08 și a avut IC₅₀ de 0,04 μM.

Exemplul 10-91a: 1-benzil-4-(1-((3,5-dimetilizoxazol-4-il)metil)-1H-pirazol-4-il)-1,2,4-triazolidin-3,5-dionă



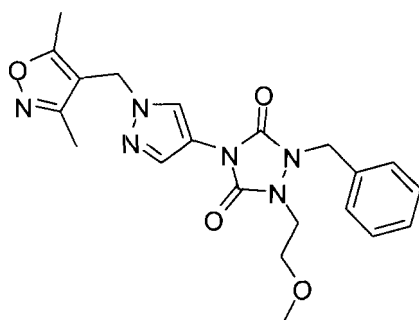
[00597] Un amestec de 1-benzil-N-(1-((3,5-dimetilizoxazol-4-il)metil)-1H-pirazol-4-il)hidrazin carboxamidă (2,00g, 5,88 mmol), cloroformiat de etil (6,38g, 58,77 mmol) și trietilamină (1,78g, 17,63 mmol) în acetonitril (50 mL) s-a încălzit la 100 °C timp de 48 ore. Amestecul a fost răcit la 80 °C, s-a adăugat NaOH 1 M (apos) (5 mL) și amestecul de reacție a fost agitat timp de 1 oră. Reacția s-a răcit la temperatura camerei și s-a concentrat pe rotavap. Reziduul a fost dizolvat în diclormetan și s-a filtrat pentru a îndepărta sărurile și soluția a fost concentrată, obținându-se 1-benzil-4-(1-((3,5-dimetilizoxazol-4-il)metil)-1H-pirazol-4-il)-1,2,4-triazolidin-3,5-dionă (1,28 g, 60%) sub formă de ulei galben. MS M+H calculat 367,14; găsit 367,2.

Exemplul 10-91b: 1-benzil-N-(1-((3,5-dimetilizoxazol-4-il)metil)-1H-pirazol-4-il)hidrazin carboxamidă



[00598] 1-((3,5-dimetilizoxazol-4-il)metil)-1H-pirazol-4-carbonil azidă (2,79g, 11,33 mmol) în toluen (70 mL) a fost încălzită la reflux timp de 4 ore obținându-se 4-((4-izocianato-1H-pirazol-1-il)metil)-3,5-dimetilizoxazol *in situ*. S-au adăugat la amestec benzilhidrazină diclorhidrat (2,44 g, 12,45 mmol) și trietilamină (2,29 g, 22,64 mmol). Amestecul a fost încălzit la 100 °C timp de încă 4 ore. Reacția a fost răcită la temperatura camerei, s-a diluat cu acetat de etil (150 mL) și s-a filtrat prin celită. Lichidul mamă a fost apoi spălat cu soluție salină (150 mL) și stratul organic s-a uscat pe sulfat de magneziu, s-a filtrat și s-a concentrat. Reziduul a fost purificat prin cromatografie pe coloană cu silice (100% până la 90% diclormetan în metanol: gradient 30 minute) obținându-se 1-benzil-N-(1-((3,5-dimetilizoxazol-4-il)metil)-1H-pirazol-4-il)hidrazin carboxamidă (2,00g, 52%) sub formă de ulei. MS M+H calculat 341,16; găsit 341,2.

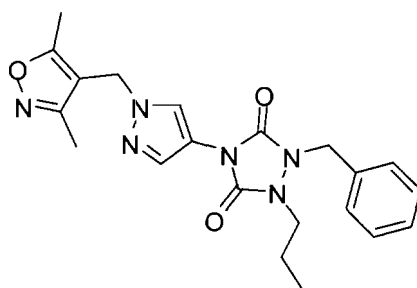
Exemplul 10-92: 1-benzil-4-(1-((3,5-dimetilizoxazol-4-il)metil)-1H-pirazol-4-il)-2-(2-metoxietil)-1,2,4-triazolidin-3,5-dionă



[00599] Preparată ca în exemplul 10-91 din 1-benzil-4-(1-((3,5-dimetilizoxazol-4-il)metil)-1H-pirazol-4-il)-1,2,4-triazolidin-3,5-dionă (exemplul 10-91a) și 2-bromoetil metil eter. Randament: 20%. MS M+H calculat 425,19; găsit 425,2. Compusul din

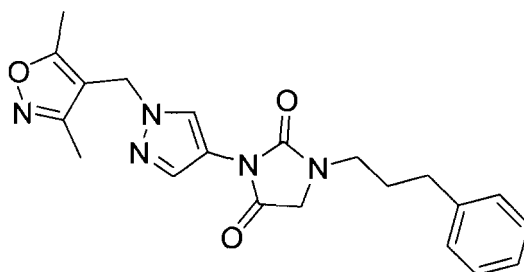
titlu s-a dovedit a fi inhibitor pentru receptorul de gust amar hT2R08 și a avut IC_{50} de 0,06 μ M.

Exemplul 10-93: 1-benzil-4-(1-((3,5-dimetilizoxazol-4-il)metil)-1H-pirazol-4-il)-2-propil-1,2,4-triazolidin-3,5-dionă



[00600] Preparată ca în exemplul 10-91 din 1-benzil-4-(1-((3,5-dimetilizoxazol-4-il)metil)-1H-pirazol-4-il)-1,2,4-triazolidin-3,5-dionă (exemplul 10-91a) și 1-bromopropan. Randament: 38%. MS M+H calculat 409,19; găsit 409,2. Compusul din titlu s-a dovedit a fi inhibitor pentru receptorul de gust amar hT2R08 și a avut IC_{50} de 0,06 μ M.

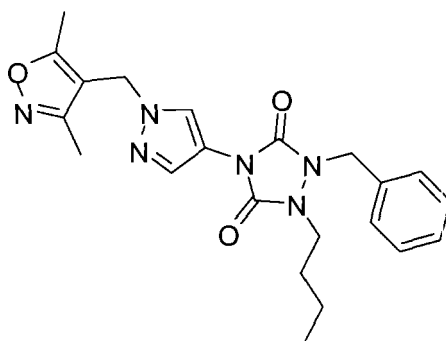
Exemplul 10-94: 3-(1-((3,5-dimetilizoxazol-4-il)metil)-1H-pirazol-4-il)-1-(3-fenilpropil)imidazolidin-2,4-dionă.



[00601] Preparată ca în exemplul 10-52 din 3-(1-((3,5-dimetilizoxazol-4-il)metil)-1H-pirazol-4-il)imidazolidin-2,4-dionă (exemplul 10-1) și (3-bromopropil)benzen. Randament: 36%. MS M+H calculat 394,2; găsit 394,2. Compusul din titlu s-a

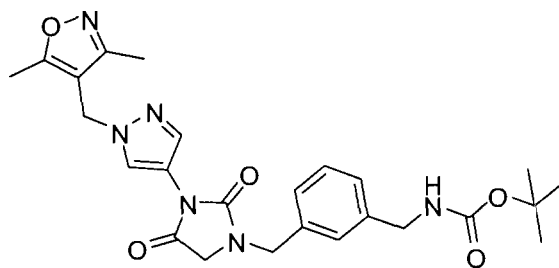
dovedit a fi inhibitor pentru receptorul de gust amar hT2R08 și a avut IC_{50} de 0,26 μ M.

Exemplul 10-95: 1-benzil-2-butil-4-(1-((3,5-dimetilizoxazol-4-il)metil)-1H-pirazol-4-il)-1,2,4-triazolidin-3,5-dionă



[00602] Preparată ca în exemplul 10-91 din 1-benzil-4-(1-((3,5-dimetilizoxazol-4-il)metil)-1H-pirazol-4-il)-1,2,4-triazolidin-3,5-dionă (exemplul 10-91a) și 1-bromobutan. Randament: 22%. MS M+H calculat 423,21; găsit 423,15. Compusul din titlu s-a dovedit a fi inhibitor pentru receptorul de gust amar hT2R08 și a avut IC_{50} de 0,41 μ M.

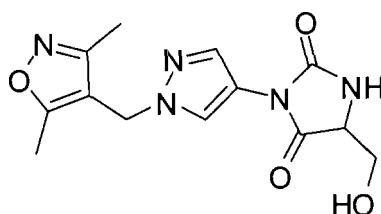
Exemplul 10-96: 3-((3-(1-((3,5-dimetilizoxazol-4-il)metil)-1H-pirazol-4-il)-2,4-dioxoimidazolidin-1-il)metil)benzilcarbamat de terț-butil



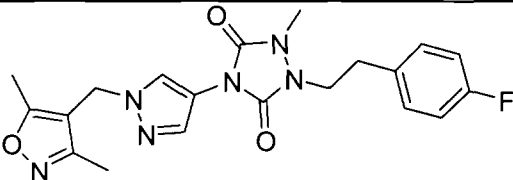
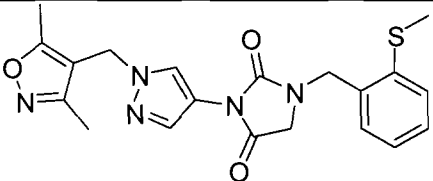
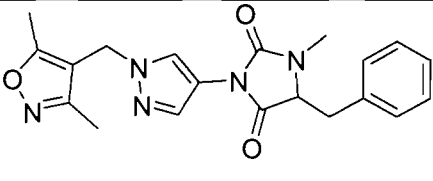
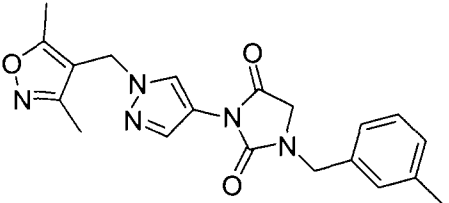
[00603] Un amestec de 3-(1-((3,5-dimetilizoxazol-4-il)metil)-1H-pirazol-4-il)imidazolidin-2,4-dionă (exemplul 10-1) (070 mg, 0,254 mmol), 3-(hidroximetil)benzilcarbamat de terț-butil (0,254 mmol, 60 mg), azodicarboxilat de

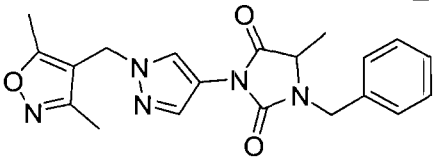
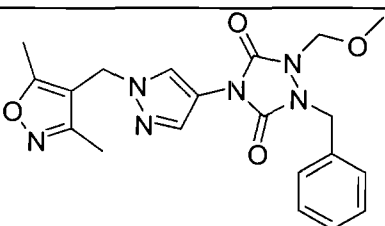
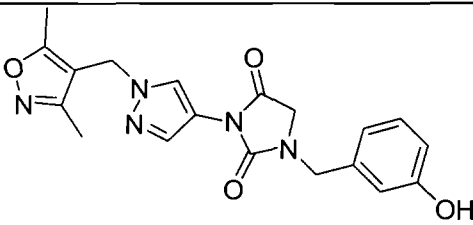
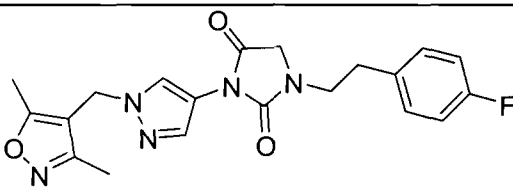
dietil (0,50 mmol, 86 mg) și P-tBu₃ (125 mL, 0,50 mmol) s-a agitat în THF (1 mL) timp de 4 ore. Reacția a fost diluată cu acetat de etil (1,5 mL) și s-a spălat cu soluție saturată de bicarbonat de sodiu (2x, 1,5 mL). Faza organică a fost colectată și amestecul a fost concentrat în curent de azot. Produsul brut a fost purificat prin cromatografie pe coloană cu silica gel utilizând acetat de etil ca eluent. Frațiunile pure s-au combinat și solvenții s-au îndepărtat pe un evaporator rotativ obținându-se 3-((3-(1-((3,5-dimetilizoxazol-4-il)metil)-1H-pirazol-4-il)-2,4-dioximidazolidin-1-il)metil)benzilcarbamate de terț-butil sub formă de solid alb (112 mg, 90%). ¹H RMN (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). Compusul din titlu s-a dovedit a fi inhibitor pentru receptorul de gust amar hT2R08 și a avut IC₅₀ de 0,90 μM.

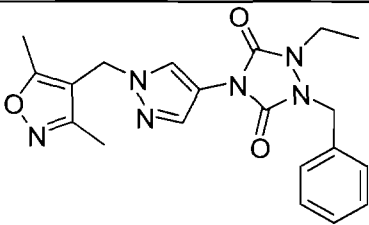
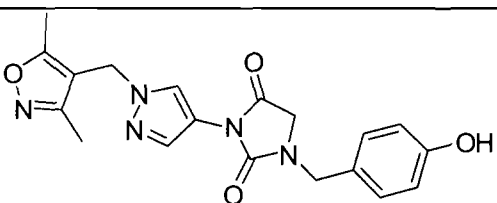
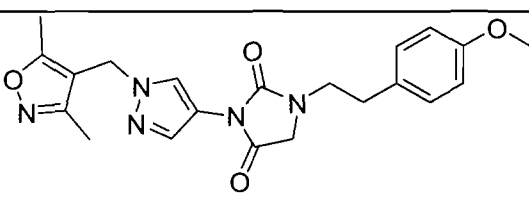
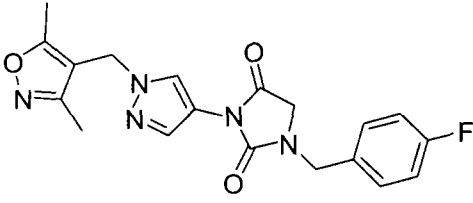
Exemplul 10-97: 3-(1-((3,5-dimetilizoxazol-4-il)metil)-1H-pirazol-4-il)-5-(hidroximetil)imidazolidin-2,4-dionă

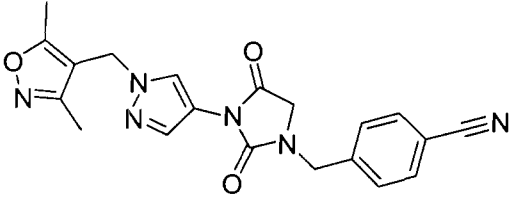
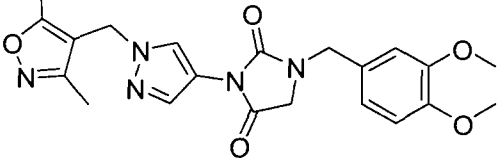
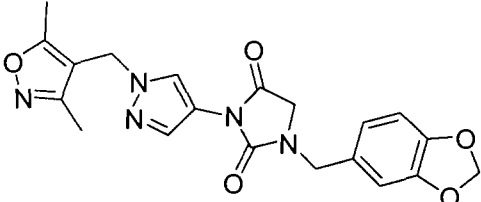
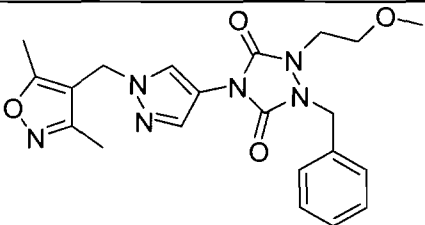


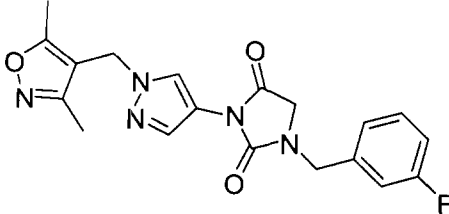
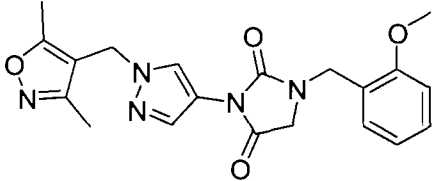
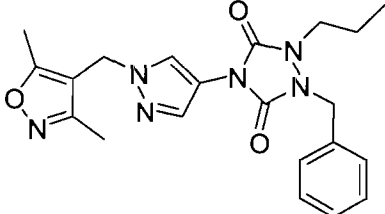
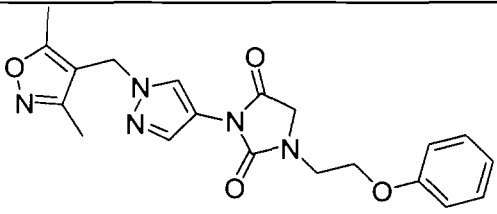
[00604] Un amestec de 4-((4-izocianato-1H-pirazol-1-il)metil)-3,5-dimetilizoxazol (exemplul 10-1) (784 mg, 3,6 mmol), ester metilic al serinei sub formă de clorhidrat (672 mg, 4,32 mmol) și trietilamină (1 mL, 7,2 mmol) s-a refluxat în toluen (16 mL) timp de 8 ore. Reacția s-a lăsat să se răcească la temperatura camerei și apoi soluția a fost concentrată pe un evaporator rotativ. Produsul a fost purificat prin HPLC cu fază inversă (5 până la 95% acetonitril în H₂O: gradient 16 minute) obținându-se 3-(1-((3,5-dimetilizoxazol-4-il)metil)-1H-pirazol-4-il)-5-(hidroximetil)imidazolidin-2,4-dionă sub formă de solid alb (60 mg, 25%). ¹H RMN (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). Compusul din titlu s-a dovedit a fi inhibitor pentru receptorul de gust amar hT2R08 și a avut IC₅₀ de 3 μM.

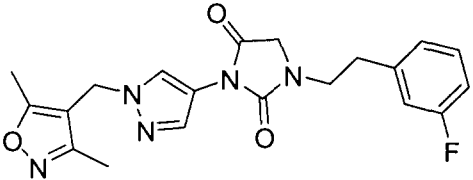
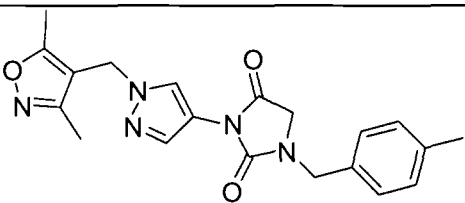
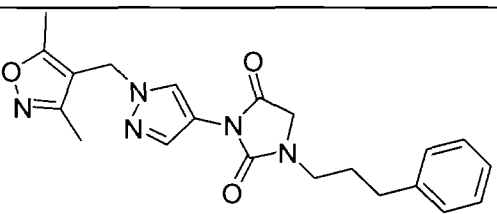
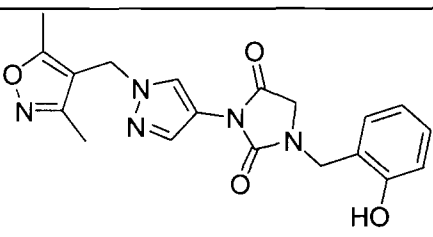
Compus nr.	Compus	IC ₅₀ al hT2R8 (μM)
10-66	 4-(1-((3,5-dimetilizoxazol-4-il)metil)-1H-pirazol-4-il)-1-(4-fluorofenil)-2-metil-1,2,4-triazolidin-3,5-dionă	0,012
10-15	 3-(1-((3,5-dimetilizoxazol-4-il)metil)-1H-pirazol-4-il)-1-(2-(metiltio)benzil)imidazolidin-2,4-dionă	0,016
10-42	 5-benzil-3-(1-((3,5-dimetilizoxazol-4-il)metil)-1H-pirazol-4-il)-1-metilimidazolidin-2,4-dionă	0,017
10-26	 3-(1-((3,5-dimetilizoxazol-4-il)metil)-1H-pirazol-4-il)-1-(3-metilbenzil)imidazolidin-2,4-dionă	0,019

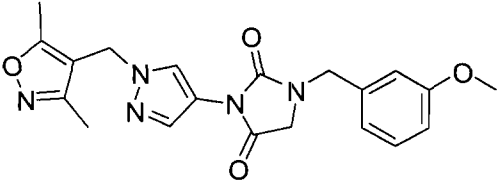
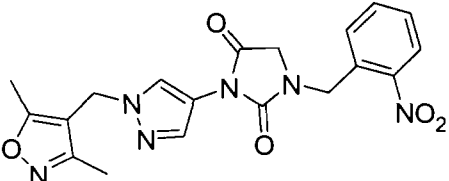
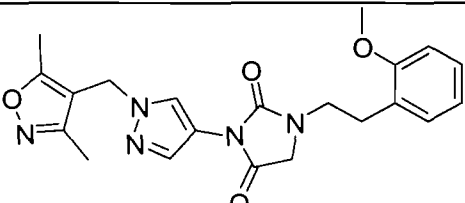
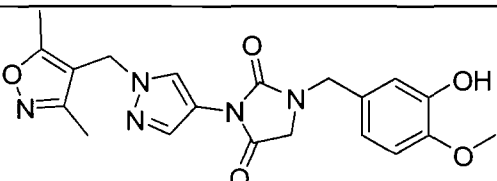
Compus nr.	Compus	IC ₅₀ al hT2R8 (μM)
10-43	 1-benzil-3-(1-((3,5-dimetilizoxazol-4-il)metil)-1H-pirazol-4-il)-5-metilimidazolidin-2,4-dionă	0,020
10-89	 1-benzil-4-(1-((3,5-dimetilizoxazol-4-il)metil)-1H-pirazol-4-il)-2-(metoximetil)-1,2,4-triazolidin-3,5-dionă	0,024
10-10	 3-(1-((3,5-dimetilizoxazol-4-il)metil)-1H-pirazol-4-il)-1-(3-hidroxibenzil)imidazolidin-2,4-dionă	0,026
10-84	 3-(1-((3,5-dimetilizoxazol-4-il)metil)-1H-pirazol-4-il)-1-(4-fluorofenetil)imidazolidin-2,4-dionă	0,027

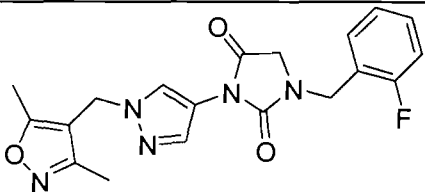
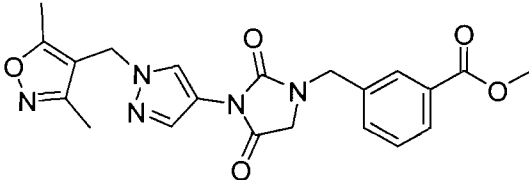
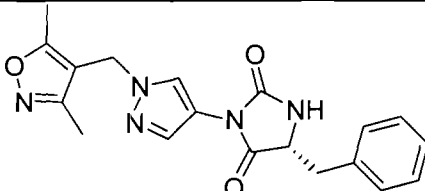
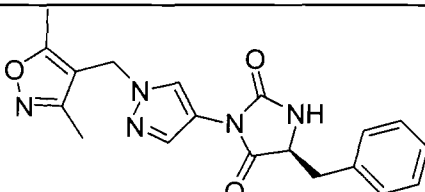
Compus nr.	Compus	IC ₅₀ al hT2R8 (μM)
10-91	 1-benzil-4-(1-((3,5-dimetilizoxazol-4-il)metil)-1H-pirazol-4-il)-2-etil-1,2,4-triazolidin-3,5-dionă	0,041
10-12	 3-(1-((3,5-dimetilizoxazol-4-il)metil)-1H-pirazol-4-il)-1-(4-hidroxi benzil)imidazolidin-2,4-dionă	0,043
10-79	 3-(1-((3,5-dimetilizoxazol-4-il)metil)-1H-pirazol-4-il)-1-(4-metoxifenetil)imidazolidin-2,4-dionă	0,044
10-31	 3-(1-((3,5-dimetilizoxazol-4-il)metil)-1H-pirazol-4-il)-1-(4-fluorobenzil)imidazolidin-2,4-dionă	0,045

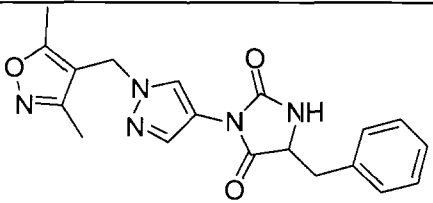
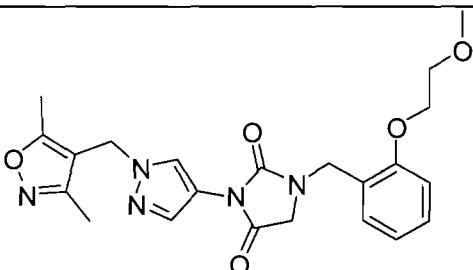
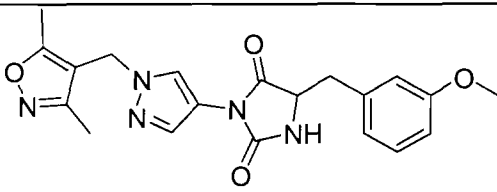
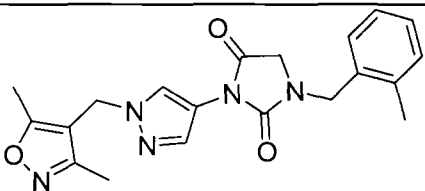
Compus nr.	Compus	IC ₅₀ al hT2R8 (μM)
10-32	 4-((3-(1-((3,5-dimetilizoxazol-4-il)metil)-1H-pirazol-4-il)-2,4-dioxoimidazolidin-1-il)metil)benzonitril	0,048
10-35	 1-(3,4-dimetoxibenzil)-3-(1-((3,5-dimetilizoxazol-4-il)metil)-1H-pirazol-4-il)imidazolidin-2,4-dionă	0,051
10-36	 1-(benzo[d][1,3]dioxol-5-ilmetil)-3-(1-((3,5-dimetilizoxazol-4-il)metil)-1H-pirazol-4-il)imidazolidin-2,4-dionă	0,053
10-92	 1-benzil-4-(1-((3,5-dimetilizoxazol-4-il)metil)-1H-pirazol-4-il)-2-(2-metoxietil)-1,2,4-triazolidin-3,5-dionă	0,057

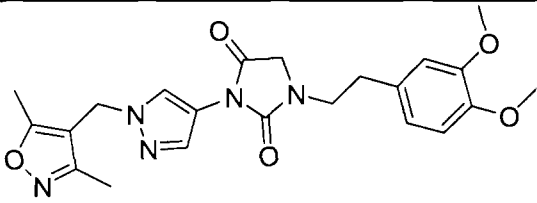
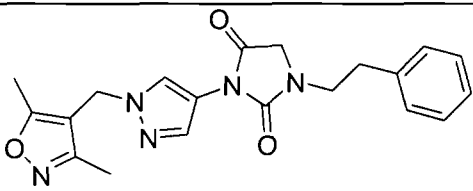
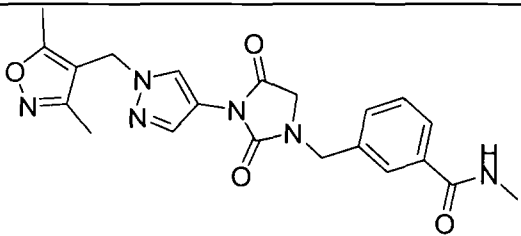
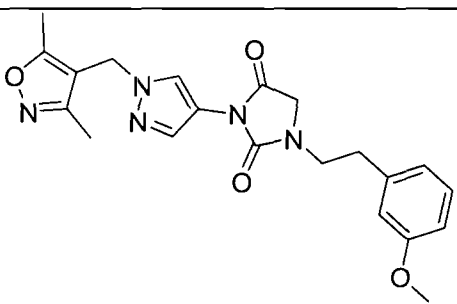
Compus nr.	Compus	IC ₅₀ al hT2R8 (μM)
10-27	 3-(1-((3,5-dimetilizoxazol-4-il)metil)-1H-pirazol-4-il)-1-(3-fluorobenzil)imidazolidin-2,4-dionă	0,058
10-18	 3-(1-((3,5-dimetilizoxazol-4-il)metil)-1H-pirazol-4-il)-1-(2-metoxibenzil)imidazolidin-2,4-dionă	0,060
10-93	 1-benzil-4-(1-((3,5-dimetilizoxazol-4-il)metil)-1H-pirazol-4-il)-2-propil-1,2,4-triazolidin-3,5-dionă	0,062
10-5	 3-(1-((3,5-dimetilizoxazol-4-il)metil)-1H-pirazol-4-il)-1-(2-fenoxietil)imidazolidin-2,4-dionă	0,063

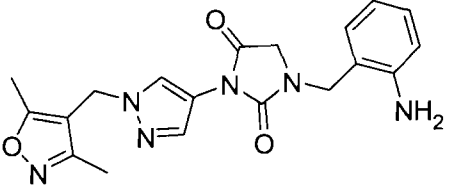
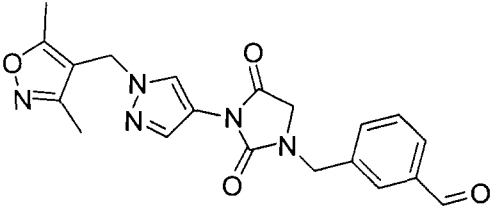
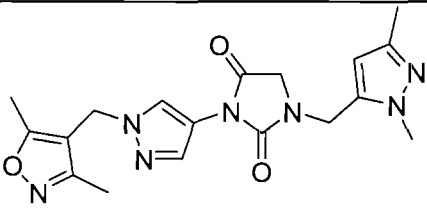
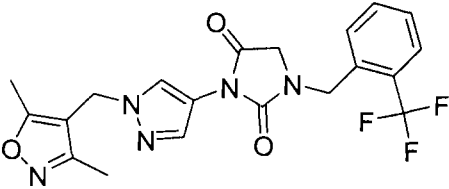
Compus nr.	Compus	IC ₅₀ al hT2R8 (μM)
10-77	 3-(1-((3,5-dimetilizoxazol-4-il)metil)-1H-pirazol-4-il)-1-(3-fluorofenetil)imidazolidin-2,4-dionă	0,064
10-30	 3-(1-((3,5-dimetilizoxazol-4-il)metil)-1H-pirazol-4-il)-1-(4-metilbenzil)imidazolidin-2,4-dionă	0,065
10-94	 3-(1-((3,5-dimetilizoxazol-4-il)metil)-1H-pirazol-4-il)-1-(3-fenilpropil)imidazolidin-2,4-dionă	0,068
10-11	 3-(1-((3,5-dimetilizoxazol-4-il)metil)-1H-pirazol-4-il)-1-(2-hidroxibenzil)imidazolidin-2,4-dionă	0,069

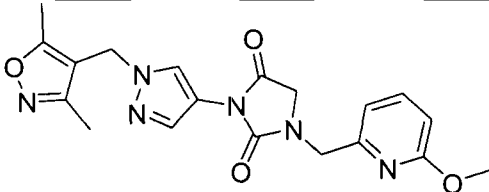
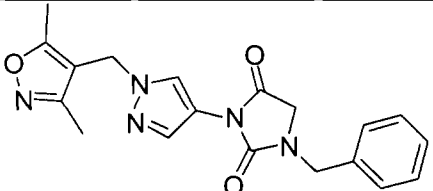
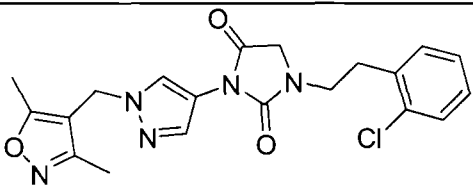
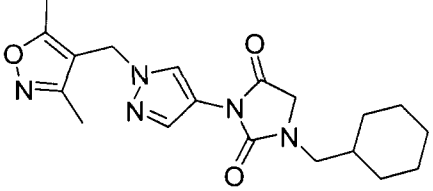
Compus nr.	Compus	IC ₅₀ al hT2R8 (μ M)
10-6	 3-(1-((3,5-dimetilizoxazol-4-il)metil)-1H-pirazol-4-il)-1-(3-metoxibenzil)imidazolidin-2,4-dionă	0,073
10-23	 3-(1-((3,5-dimetilizoxazol-4-il)metil)-1H-pirazol-4-il)-1-(2-nitrobenzil)imidazolidin-2,4-dionă	0,081
10-76	 3-(1-((3,5-dimetilizoxazol-4-il)metil)-1H-pirazol-4-il)-1-(2-metoxifenetil)imidazolidin-2,4-dionă	0,097
10-13	 3-(1-((3,5-dimetilizoxazol-4-il)metil)-1H-pirazol-4-il)-1-(3-hidroxi-4-metoxibenzil)imidazolidin-2,4-dionă	0,087

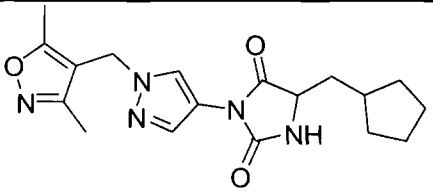
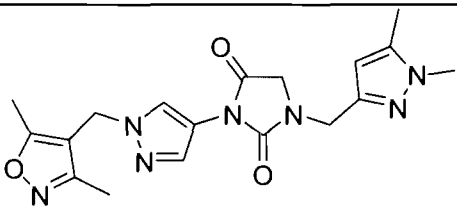
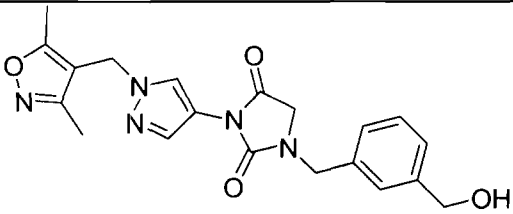
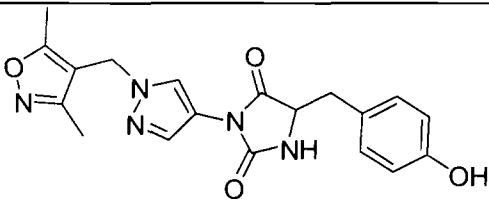
Compus nr.	Compus	IC ₅₀ al hT2R8 (μM)
10-21	 3-(1-((3,5-dimetilizoxazol-4-il)metil)-1H-pirazol-4-il)-1-(2-fluorobenzil)imidazolidin-2,4-dionă	0,090
10-7	 3-((3-(1-((3,5-dimetilizoxazol-4-il)metil)-1H-pirazol-4-il)-2,4-dioxoimidazolidin-1-il)metil)benzoat de metil	0,102
10-4	 (R)-5-benzil-3-(1-((3,5-dimetilizoxazol-4-il)metil)-1H-pirazol-4-il)imidazolidin-2,4-dionă	0,112
10-3	 (S)-5-benzil-3-(1-((3,5-dimetilizoxazol-4-il)metil)-1H-pirazol-4-il)imidazolidin-2,4-dionă	0,113

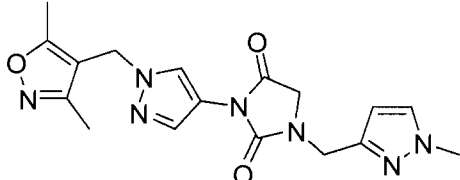
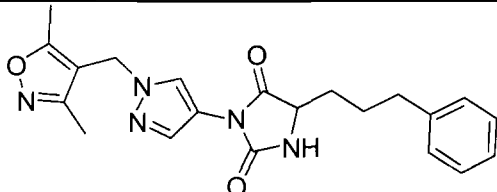
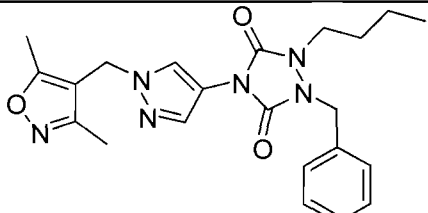
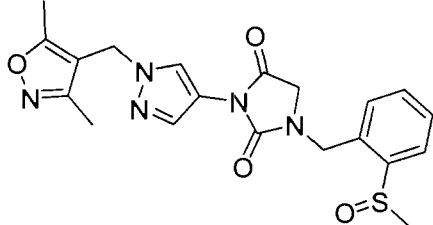
Compus nr.	Compus	IC ₅₀ al hT2R8 (μM)
10-2	 5-benzil-3-(1-((3,5-dimetilizoxazol-4-il)metil)-1H-pirazol-4-il)imidazolidin-2,4-dionă	0,117
10-16	 3-(1-((3,5-dimetilizoxazol-4-il)metil)-1H-pirazol-4-il)-1-(2-(2-metoxietoxi)benzil)imidazolidin-2,4-dionă	0,131
10-56	 3-(1-((3,5-dimetilizoxazol-4-il)metil)-1H-pirazol-4-il)-5-(3-metoxibenzil)imidazolidin-2,4-dionă	0,131
10-20	 3-(1-((3,5-dimetilizoxazol-4-il)metil)-1H-pirazol-4-il)-1-(2-metilbenzil)imidazolidin-2,4-dionă	0,133

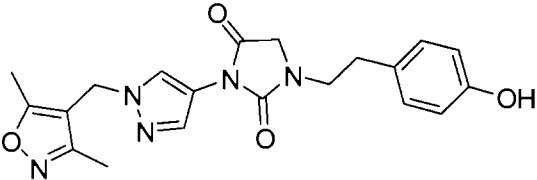
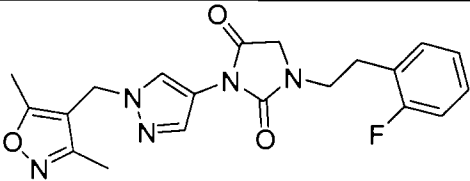
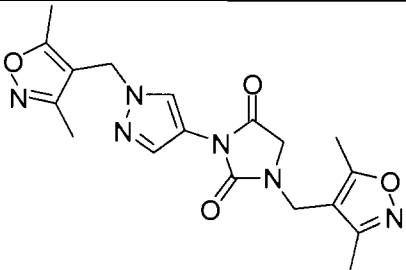
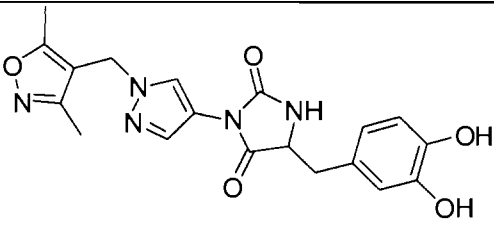
Compus nr.	Compus	IC ₅₀ al hT2R8 (μM)
10-87	 1-(3,4-dimetoxifenetil)-3-(1-((3,5-dimetilizoxazol-4-il)metil)-1H-pirazol-4-il)imidazolidin-2,4-dionă	0,137
10-78	 3-(1-((3,5-dimetilizoxazol-4-il)metil)-1H-pirazol-4-il)-1-fenetilimidazolidin-2,4-dionă	0,139
10-9	 3-((3-(1-((3,5-dimetilizoxazol-4-il)metil)-1H-pirazol-4-il)-2,4-dioxoimidazolidin-1-il)metil)-N-metilbenzamidă	0,141
10-85	 3-(1-((3,5-dimetilizoxazol-4-il)metil)-1H-pirazol-4-il)-1-(3-metoxifenetil)imidazolidin-2,4-dionă	0,158

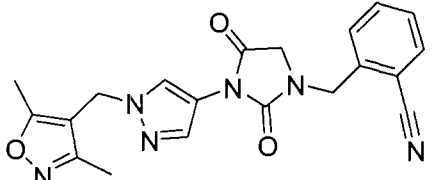
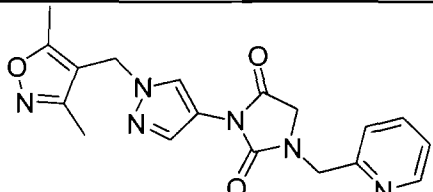
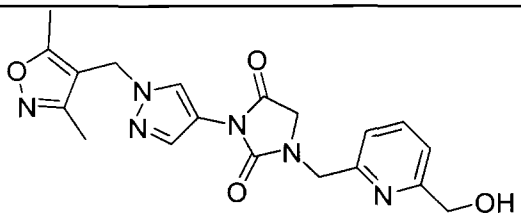
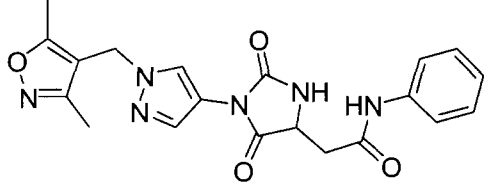
Compus nr.	Compus	IC ₅₀ al hT2R8 (μM)
10-34	 1-(2-aminobenzil)-3-(1-((3,5-dimetilizoxazol-4-il)metil)-1H-pirazol-4-il)imidazolidin-2,4-dionă	0,163
10-24	 3-((3-(1-((3,5-dimetilizoxazol-4-il)metil)-1H-pirazol-4-il)-2,4-dioxoimidazolidin-1-il)metil)benzaldehydă	0,201
10-90	 1-((1,3-dimetil-1H-pirazol-5-il)metil)-3-(1-((3,5-dimetilizoxazol-4-il)metil)-1H-pirazol-4-il)imidazolidin-2,4-dionă	0,215
10-22	 3-(1-((3,5-dimetilizoxazol-4-il)metil)-1H-pirazol-4-il)-1-(2-(trifluorometil)benzil)imidazolidin-2,4-dionă	0,221

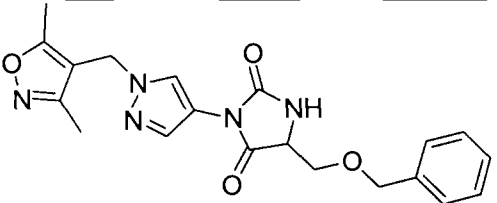
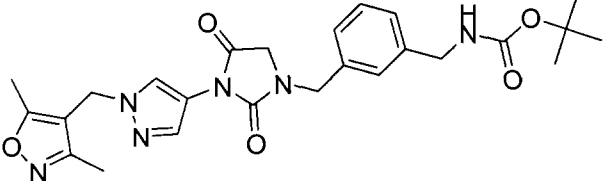
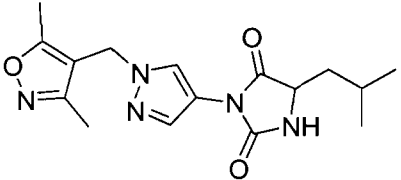
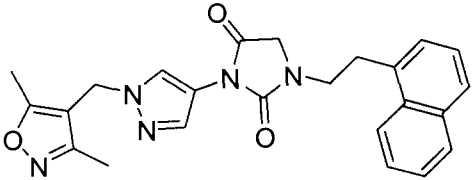
Compus nr.	Compus	IC ₅₀ al hT2R8 (μM)
10-75	 3-(1-((3,5-dimetilizoxazol-4-il)metil)-1H-pirazol-4-il)-1-((6-metoxipiridin-2-il)metil)imidazolidin-2,4-dionă	0,229
10-53	 1-benzil-3-(1-((3,5-dimetilizoxazol-4-il)metil)-1H-pirazol-4-il)imidazolidin-2,4-dionă	0,257
10-81	 1-(2-clorofenetil)-3-(1-((3,5-dimetilizoxazol-4-il)metil)-1H-pirazol-4-il)imidazolidin-2,4-dionă	0,248
10-74	 1-(ciclohexilmetil)-3-(1-((3,5-dimetilizoxazol-4-il)metil)-1H-pirazol-4-il)imidazolidin-2,4-dionă	0,276

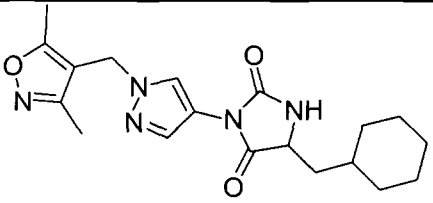
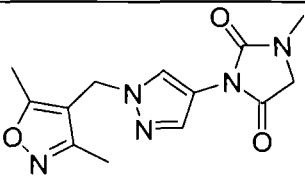
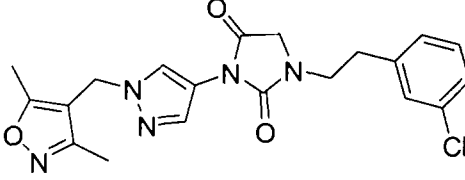
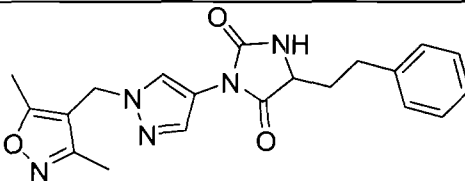
Compus nr.	Compus	IC ₅₀ al hT2R8 (μM)
10-58	 5-(ciclopentilmetil)-3-(1-((3,5-dimetilizoxazol-4-il)metil)-1H-pirazol-4-il)imidazolidin-2,4-dionă	0,316
10-28	 1-((1,5-dimetil-1H-pirazol-3-il)metil)-3-(1-((3,5-dimetilizoxazol-4-il)metil)-1H-pirazol-4-il)imidazolidin-2,4-dionă	0,322
10-33	 3-(1-((3,5-dimetilizoxazol-4-il)metil)-1H-pirazol-4-il)-1-(3-(hidroximetil)benzil)imidazolidin-2,4-dionă	0,322
10-59	 3-(1-((3,5-dimetilizoxazol-4-il)metil)-1H-pirazol-4-il)-5-(4-hidroxibenzil)imidazolidin-2,4-dionă	0,327

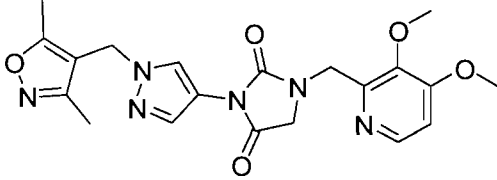
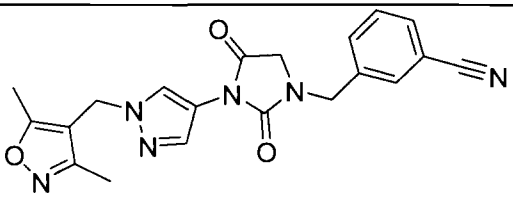
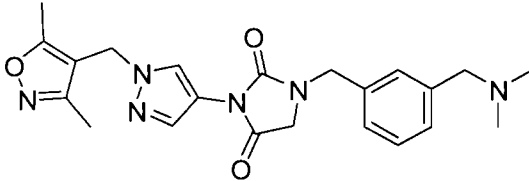
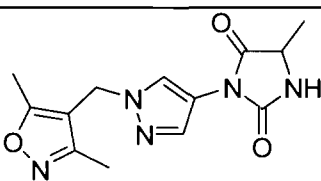
Compus nr.	Compus	IC ₅₀ al hT2R8 (μM)
10-38	 3-(1-((3,5-dimetilizoxazol-4-il)metil)-1H-pirazol-4-il)-1-((1-metil-1H-pirazol-3-il)metil)imidazolidin-2,4-dionă	0,363
10-46	 3-(1-((3,5-dimetilizoxazol-4-il)metil)-1H-pirazol-4-il)-5-(3-fenilpropil)imidazolidin-2,4-dionă	0,484
10-95	 1-benzil-2-butil-4-(1-((3,5-dimetilizoxazol-4-il)metil)-1H-pirazol-4-il)-1,2,4-triazolidin-3,5-dionă	0,409
10-17	 3-(1-((3,5-dimetilizoxazol-4-il)metil)-1H-pirazol-4-il)-1-(2-(metilsulfinil)benzil)imidazolidin-2,4-dionă	0,412

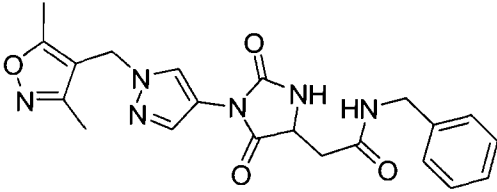
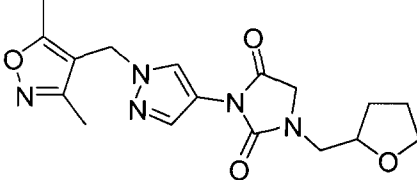
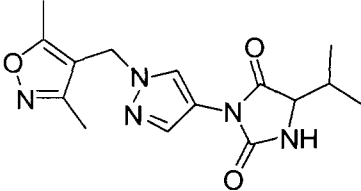
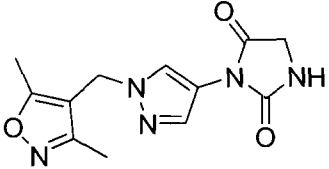
Compus nr.	Compus	IC ₅₀ al hT2R8 (μM)
10-86	 3-(1-((3,5-dimetilizoxazol-4-il)metil)-1H-pirazol-4-il)-1-(4-hidroxifenetil)imidazolidin-2,4-dionă	0,412
10-83	 3-(1-((3,5-dimetilizoxazol-4-il)metil)-1H-pirazol-4-il)-1-(2-fluorofenetil)imidazolidin-2,4-dionă	0,442
10-55	 1-((3,5-dimetilizoxazol-4-il)metil)-3-(1-((3,5-dimetilizoxazol-4-il)metil)-1H-pirazol-4-il)imidazolidin-2,4-dionă	0,479
10-60	 5-(3,4-dihidroxibenzil)-3-(1-((3,5-dimetilizoxazol-4-il)metil)-1H-pirazol-4-il)imidazolidin-2,4-dionă	0,513

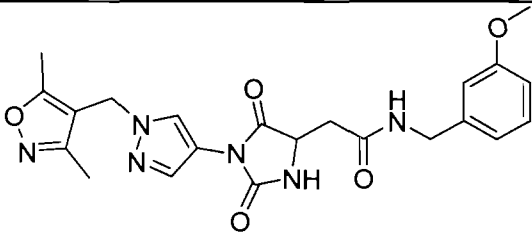
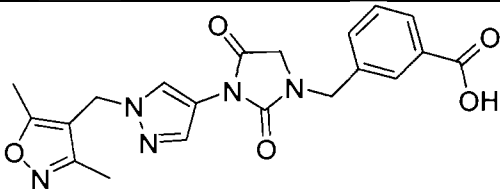
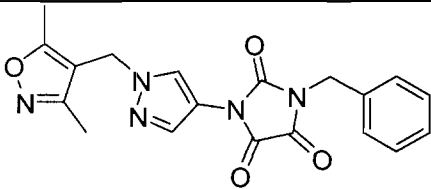
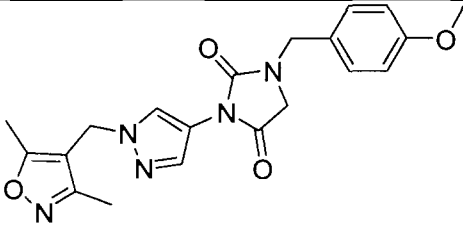
Compus nr.	Compus	IC ₅₀ al hT2R8 (μM)
10-19	 2-((3-(1-((3,5-dimetilizoxazol-4-il)metil)-1H-pirazol-4-il)-2,4-dioxoimidazolidin-1-il)metil)benzonitril	0,550
10-54	 3-(1-((3,5-dimetilizoxazol-4-il)metil)-1H-pirazol-4-il)-1-(piridin-2-ilmetil)imidazolidin-2,4-dionă	0,609
10-71	 3-(1-((3,5-dimetilizoxazol-4-il)metil)-1H-pirazol-4-il)-1-((6-(hidroximetil)piridin-2-il)metil)imidazolidin-2,4-dionă	0,721
10-48	 2-(1-(1-((3,5-dimetilizoxazol-4-il)metil)-1H-pirazol-4-il)-2,5-dioxoimidazolidin-4-il)-N-fenilacetamidă	0,747

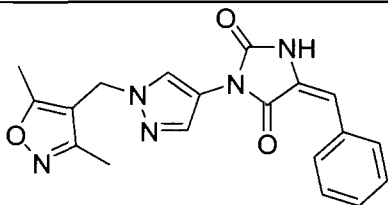
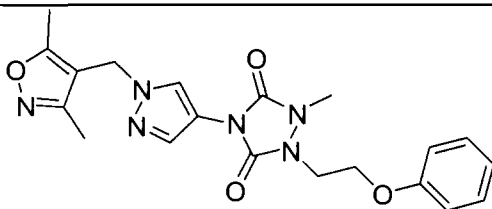
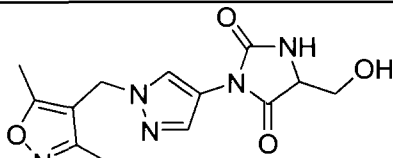
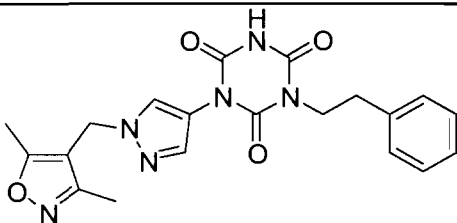
Compus nr.	Compus	IC ₅₀ al hT2R8 (μM)
10-47	 5-(benziloximetil)-3-((1-((3,5-dimetilizoxazol-4-il)metil)-1H-pirazol-4-il)imidazolidin-2,4-dionă	0,766
10-96	 terț-butil 3-((3-((1-((3,5-dimetilizoxazol-4-il)metil)-1H-pirazol-4-il)-2,4-dioxoimidazolidin-1-il)metil)benzilcarbamate	0,891
10-61	 3-((1-((3,5-dimetilizoxazol-4-il)metil)-1H-pirazol-4-il)-5-isobutilimidazolidin-2,4-dionă	0,912
10-80	 3-((1-((3,5-dimetilizoxazol-4-il)metil)-1H-pirazol-4-il)-1-(2-(naftalen-1-il)etil)imidazolidin-2,4-dionă	0,927

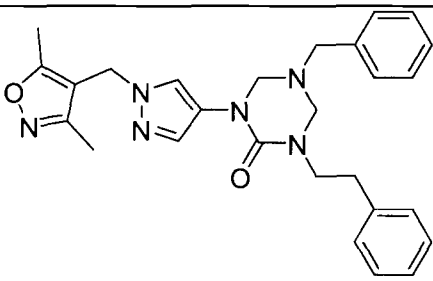
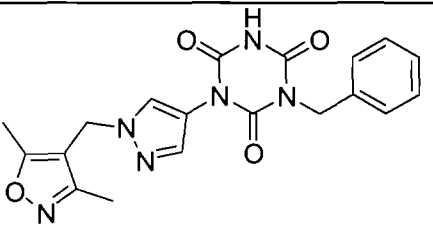
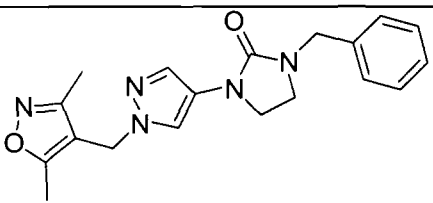
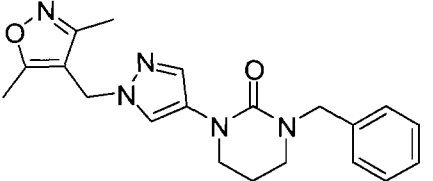
Compus nr.	Compus	IC ₅₀ al hT2R8 (μM)
10-57	 5-(ciclohexilmetil)-3-(1-((3,5-dimetilizoxazol-4-il)metil)-1H-pirazol-4-il)imidazolidin-2,4-dionă	0,962
10-51	 3-(1-((3,5-dimetilizoxazol-4-il)metil)-1H-pirazol-4-il)-1-metilimidazolidin-2,4-dionă	0,966
10-82	 1-(3-clorofenetil)-3-(1-((3,5-dimetilizoxazol-4-il)metil)-1H-pirazol-4-il)imidazolidin-2,4-dionă	0,982
10-45	 3-(1-((3,5-dimetilizoxazol-4-il)metil)-1H-pirazol-4-il)-5-fenetilimidazolidin-2,4-dionă	0,793

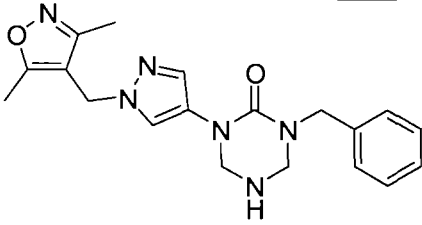
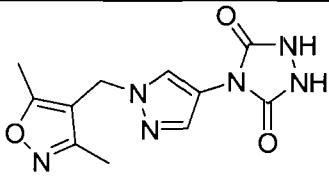
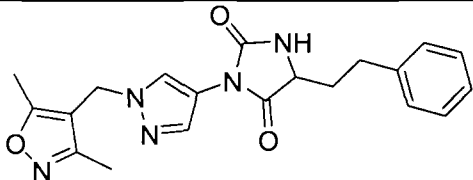
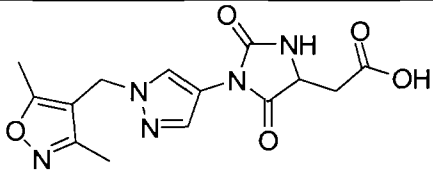
Compus nr.	Compus	IC ₅₀ al hT2R8 (μM)
10-72	 1-((3,4-dimetoxipiridin-2-il)metil)-3-(1-((3,5-dimetilizoxazol-4-il)metil)-1H-pirazol-4-il)imidazolidin-2,4-dionă	0,999
10-25	 3-((3-(1-((3,5-dimetilizoxazol-4-il)metil)-1H-pirazol-4-il)-2,4-dioxoimidazolidin-1-il)metil)benzonitril	1,003
10-37	 1-(3-((dimetilamino)metil)benzil)-3-(1-((3,5-dimetilizoxazol-4-il)metil)-1H-pirazol-4-il)imidazolidin-2,4-dionă	1,220
10-41	 3-(1-((3,5-dimetilizoxazol-4-il)metil)-1H-pirazol-4-il)-5-metilimidazolidin-2,4-dionă	1,285

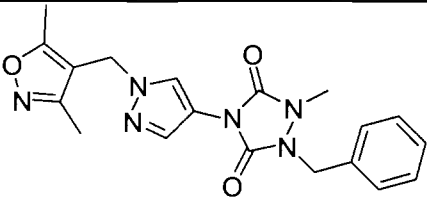
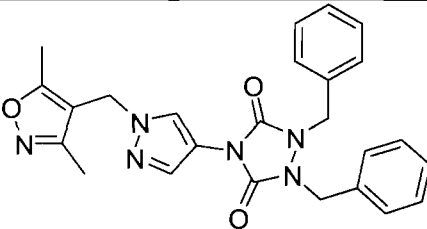
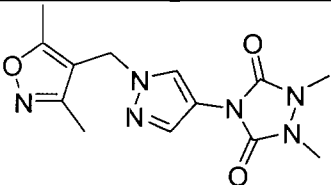
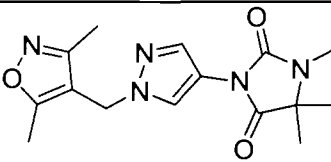
Compus nr.	Compus	IC ₅₀ al hT2R8 (μ M)
10-49	 N-benzil-2-(1-(1-((3,5-dimetilizoxazol-4-il)metil)-1H-pirazol-4-il)-2,5-dioxoimidazolidin-4-il)acetamidă	1,329
10-73	 3-(1-((3,5-dimetilizoxazol-4-il)metil)-1H-pirazol-4-il)-1-((tetrahidrofuran-2-il)metil)imidazolidin-2,4-dionă	1,362
10-62	 3-(1-((3,5-dimetilizoxazol-4-il)metil)-1H-pirazol-4-il)-5-izopropilimidazolidin-2,4-dionă	1,440
10-1	 3-(1-((3,5-dimetilizoxazol-4-il)metil)-1H-pirazol-4-il)imidazolidin-2,4-dionă	1,696

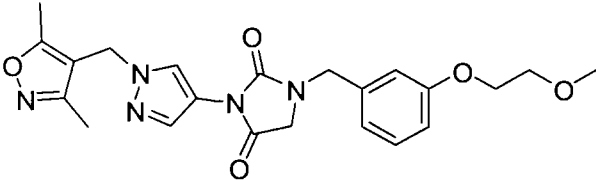
Compus nr.	Compus	IC ₅₀ al hT2R8 (μM)
10-50	 2-(1-(1-((3,5-dimetilizoxazol-4-il)metil)-1H-pirazol-4-il)-2,5-dioxoimidazolidin-4-il)-N-(3-metoxibenzil)acetamidă	1,773
10-8	 acid 3-((3-(1-(1-((3,5-dimetilizoxazol-4-il)metil)-1H-pirazol-4-il)-2,4-dioxoimidazolidin-1-il) metil)benzoic	1,798
9-5	 1-benzil-3-(1-(1-((3,5-dimetilizoxazol-4-il)metil)-1H-pirazol-4-il)imidazolidin-2,4,5-trionă	2,493
10-29	 3-(1-(1-((3,5-dimetilizoxazol-4-il)metil)-1H-pirazol-4-il)-1-(4-metoxibenzil)imidazolidin-2,4-dionă	3,117

Compus nr.	Compus	IC ₅₀ al hT2R8 (μM)
10-63	 (E)-5-benziliden-3-(1-((3,5-dimetilizoxazol-4-il)metil)-1H-pirazol-4-il)imidazolidin-2,4-dionă	
10-67	 4-(1-((3,5-dimetilizoxazol-4-il)metil)-1H-pirazol-4-il)-1-metil-2-(2-fenoxietil)-1,2,4-triazolidin-3,5-dionă	
10-97	 3-(1-((3,5-dimetilizoxazol-4-il)metil)-1H-pirazol-4-il)-5-(hidroximetil)imidazolidin-2,4-dionă	
9-8	 1-(1-((3,5-dimetilizoxazol-4-il)metil)-1H-pirazol-4-il)-3-fenetil-1,3,5-triazinan-2,4,6-trionă	6,151

Compus nr.	Compus	IC ₅₀ al hT2R8 (μM)
9-7	 5-benzil-1-(1-((3,5-dimetilizoxazol-4-il)metil)-1H-pirazol-4-il)-3-fenetil-1,3,5-triazinan-2-onă	6,580
9-9	 1-benzil-3-(1-((3,5-dimetilizoxazol-4-il)metil)-1H-pirazol-4-il)-1,3,5-triazinan-2,4,6-trione	1,562
10-88	 1-benzil-3-(1-((3,5-dimetilizoxazol-4-il)metil)-1H-pirazol-4-il)imidazolidin-2-onă	1,250
9-5	 1-benzil-3-(1-((3,5-dimetilizoxazol-4-il)metil)-1H-pirazol-4-il)tetrahidropirimidin-2(1H)-onă	3,434

Compus nr.	Compus	IC ₅₀ al hT2R8 (μM)
9-6	 1-benzil-3-(1-((3,5-dimetilizoxazol-4-il)metil)-1H-pirazol-4-il)-1,3,5-triazinan-2-onă	6,029
10-68	 4-(1-((3,5-dimetilizoxazol-4-il)metil)-1H-pirazol-4-il)-1,2,4-triazolidin-3,5-dionă	
10-45	 3-(1-((3,5-dimetilizoxazol-4-il)metil)-1H-pirazol-4-il)-5-fenetilimidazolidin-2,4-dionă	0,793
10-44	 acid 2-(1-(1-((3,5-dimetilizoxazol-4-il)metil)-1H-pirazol-4-il)-2,5-dioxoimidazolidin-4-il) acetic	

Compus nr.	Compus	IC ₅₀ al hT2R8 (μM)
10-65	 1-benzil-4-(1-((3,5-dimetilizoxazol-4-il)metil)-1H-pirazol-4-il)-2-metil-1,2,4-triazolidin-3,5-dionă	0,019
10-70	 1,2-dibenzil-4-(1-((3,5-dimetilizoxazol-4-il)metil)-1H-pirazol-4-il)-1,2,4-triazolidin-3,5-dionă	1,799
10-69	 4-(1-((3,5-dimetilizoxazol-4-il)metil)-1H-pirazol-4-il)-1,2-dimetil-1,2,4-triazolidin-3,5-dionă	0,707
10-52	 3-(1-((3,5-dimetilizoxazol-4-il)metil)-1H-pirazol-4-il)-1,5,5-trimetilimidazolidin-2,4-dionă	0,810

Compus nr.	Compus	IC ₅₀ al hT2R8 (μM)
10-14	 3-(1-((3,5-dimetilizoxazol-4-il)metil)-1H-pirazol-4-il)-1-(3-(2-metoxietoxi)benzil)imidazolidin-2,4-dionă	0,071

Exemplul 11. hT2R8 contribuie la gustul amar al zaharinei pentru persoane, cu versiuni “non-taster” ale genelor hT2R43 și hT2R44

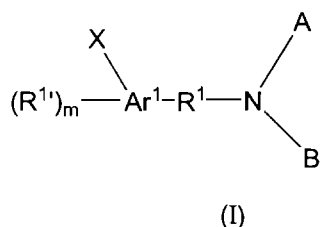
FIG. 6 prezintă relațiile doză-răspuns și efectele zaharinei asupra activității receptorului în celule transfectate ce exprimă variante ale hT2R43, hT2R44 și hT2R8. hT2R8 răspunde mai puțin la zaharină în testul in vitro decât “taster”-ul hT2R43-W35 și alele hT2R44-W35, dar răspunde mai bine decât “non-taster”-ul hT2R43-S35 și alele hT2R44-R35. Pronin și colab., *Curr. Biol.* 17: 1403–8 (2007). Cinci indivizi cu alele “taster” (hT2R43-W35 și/sau hT2R44-W35) și cinci cu allele “non-taster” (hT2R43-S35 și hT2R44-R35) au fost selectați pe baza analizei genotipului. Fiecărui subiect i s-au prezentat 6 perechi de soluții și li s-a cerut să determine care din probele din perechea testată este mai amară. Rezultatul prezentat în Tabelul 8, de mai jos, arată că hT2R8 blocker Cpd-D reduce gustul amar al zaharinei la persoanele cu alele “non- taster” hT2R43 și hT2R44, dar nu are niciun efect asupra persoanelor cu alele “taster” ale acelor gene.

Tabel 8: Rezultatele testelor de gust

Test gust	Agonist amar	Grup genotip	Selectat ca mai amar		Valoare
			fără	+ Cpd-P D	
1	zaharină	hT2R43-W35 și/sau hT2R44-W35	13	17	0,82
2	zaharină	hT2R43-S35 și hT2R44-R35	27	3	<0,001

[00605] Alte exemple de compuși furnizați de către prezenta invenție și/sau adecvați pentru a fi utilizați în metodele prezentei invenții includ compuși cu formulele următoare.

[0606] Într-un prim aspect, este prevăzut un compus cu formula structurală (I):



sau o sare, hidrat, solvat sau N-oxid al acestuia în care:

Ar¹ este un ciclu aril, heteroaril sau cicloalchil cu cinci sau șase atomi;

m este 0, 1, 2 sau 3;

R¹ este SO₂; C=O; C=S; sau C=NOR⁴;

X este selectat din grupul constând din hidrogen, halogen, alchil, alchil substituit, aril, aril substituit, arilalchil, arilalchil substituit, acil, acil substituit, heteroalchil, heteroalchil substituit, heteroaril, heteroaril substituit, heteroarilalchil, heteroarilalchil substituit, 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) și P(O)(R⁵)(OR⁶);

fiecare $R^{1'}$ este selectat în mod independent din grupul constând din hidrogen, halogen, alchil, alchil substituit, aril, aril substituit, arilalchil, arilalchil substituit, acil, acil substituit, heteroalchil, heteroalchil substituit, heteroaril, heteroaril substituit, heteroarilalchil, heteroarilalchil substituit, CN , NO_2 , OR^6 , $S(O)_bR^6$, NR^6R^7 , $CONR^6R^7$, CO_2R^6 , $NR^6CO_2R^7$, $NR^6CONR^7R^8$, $NR^6CSNR^7R^8$, $NR^6C(=NH)NR^7R^8$, $SO_2NR^5R^6$, $NR^5SO_2R^6$, $NR^5SO_2NR^6R^7$, $B(OR^5)(OR^6)$, $P(O)(OR^5)(OR^6)$ și $P(O)(R^5)(OR^6)$;

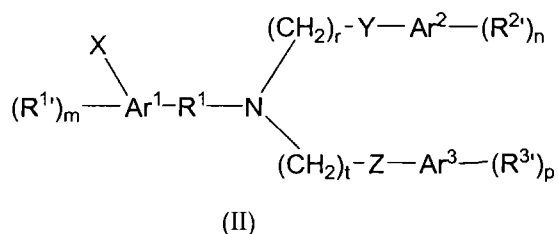
sau în mod alternativ, X și/sau cel puțin un $R^{1'}$ împreună cu atomii la care sunt legați formează un ciclu aril, aril substituit, heteroaril, heteroaril substituit, cicloalchil, cicloalchil substituit, cicloheteroalchil sau cicloheteroalchil substituit în care ciclul este condensat opțional cu un alt ciclu aril, aril substituit, heteroaril, heteroaril substituit, cicloalchil, cicloalchil substituit, cicloheteroalchil sau cicloheteroalchil substituit;

R^4 - R^8 sunt selectați în mod independent din grupul constând din hidrogen, alchil, alchil substituit, aril, aril substituit, arilalchil, arilalchil substituit, heteroalchil, heteroalchil substituit, heteroaril, heteroaril substituit, heteroarilalchil și heteroarilalchil substituit sau în mod alternativ, R^5 și R^6 , R^6 și R^7 , R^7 și R^8 , împreună cu atomii de care sunt legați formează un ciclu cicloheteroalchil sau cicloheteroalchil substituit;

A și B sunt selectați în mod independent din grupul constând din hidrogen, alchil, alchil substituit, aril, aril substituit, arilalchil, arilalchil substituit, acil, acil substituit, heteroalchil, heteroalchil substituit, heteroaril, heteroaril substituit, heteroarilalchil, heteroarilalchil substituit; și

b este 0, 1 sau 2.

[00607] În al doilea aspect, invenția prevede compușii cu formula structurală (II) prezentați mai jos:



sau o sare, hidrat, solvat sau N-oxid al acestora în care:

Ar^1 , Ar^2 și Ar^3 sunt în mod independent un ciclu aril, heteroaril sau cicloalchil cu cinci sau șase atomi;

m este 0, 1, 2 sau 3;

n și p sunt în mod independent 0, 1, 2, 3 sau 4;

r și t sunt în mod independent 0,1 sau 2;

Y și Z sunt în mod independent selectați din grupul constând din CR^6R^7 , $C=O$, $C=S$, $C=NOR^6$, O , NR^6 și $S(O)_b$;

R^1 este selectat din grupul constând din SO_2 , $C=O$, $C=S$ și $C=NOR^4$;

X poate fi selectat din grupul constând din hidrogen, alchil, alchil substituit, aril, aril substituit, arilalchil, arilalchil substituit, acil, acil substituit, heteroalchil, heteroalchil substituit, heteroaril, heteroaril substituit, heteroarilalchil, heteroarilalchil substituit, CN , NO_2 , $-OR^6$, $S(O)_bR^6$, NR^6R^7 , $CONR^6R^7$, CO_2R^6 , $NR^6CO_2R^7$, $NR^6CONR^7R^8$, $NR^6CSNR^7R^8$, $NR^6C(=NH)NR^7R^8$, $SO_2NR^5R^6$, $NR^5SO_2R^6$, $NR^5SO_2NR^6R^7$, $B(OR^5)(OR^6)$, $P(O)(OR^5)(OR^6)$ și $P(O)(R^5)(OR^6)$;

X este preferabil selectat din grupul constând din hidrogen, heteroalchil, heteroalchil substituit, heteroaril, heteroaril substituit, heteroarilalchil, heteroarilalchil substituit, CN , $S(O)_bR^6$, $CONR^6R^7$, $-CO_2R^6$, $SO_2NR^5R^6$, $NR^5SO_2R^6$, $NR^5SO_2NR^6R^7$, $B(OR^5)(OR^6)$, $P(O)(OR^5)(OR^6)$ și $P(O)(R^5)(OR^6)$.

fiecare $R^{1'}$ este selectat în mod independent din grupul constând din hidrogen, halogen, alchil, alchil substituit, aril, aril substituit, arilalchil, arilalchil substituit, acil, acil substituit, heteroalchil, heteroalchil substituit, heteroaril, heteroaril substituit, heteroarilalchil, substituit heteroarilalchil, CN , NO_2 , OR^6 , $S(O)_bR^6$, NR^6R^7 , $CONR^6R^7$, CO_2R^6 , $NR^6CO_2R^7$, $NR^6CONR^7R^8$, $NR^6CSNR^7R^8$, $NR^6C(=NH)NR^7R^8$, $SO_2NR^5R^6$, $NR^5SO_2R^6$, $NR^5SO_2NR^6R^7$, $B(OR^5)(OR^6)$, $P(O)(OR^5)(OR^6)$ și $P(O)(R^5)(OR^6)$;

fiecare $R^{2'}$ este selectat în mod independent din grupul constând din hidrogen, halogen, alchil, alchil substituit, aril, aril substituit, arilalchil, arilalchil substituit, acil, acil substituit, heteroalchil, heteroalchil substituit, heteroaril, heteroaril substituit, heteroarilalchil, heteroarilalchil substituit, CN , NO_2 , OR^6 , $S(O)_bR^6$, NR^6R^7 , $CONR^6R^7$, CO_2R^6 , $NR^6CO_2R^7$, $NR^6CONR^7R^8$, $NR^6CSNR^7R^8$, $NR^6C(=NH)NR^7R^8$, $SO_2NR^5R^6$, $NR^5SO_2R^6$, $NR^5SO_2NR^6R^7$, $B(OR^5)(OR^6)$ și $P(O)(OR^5)(OR^6)$;

fiecare $R^{3'}$ este selectat în mod independent din grupul constând din hidrogen, halogen, alchil, alchil substituit, aril, aril substituit, arilalchil, arilalchil substituit, acil, acil substituit, heteroalchil, heteroalchil substituit, heteroaril, heteroaril substituit, heteroarilalchil, heteroarilalchil substituit, CN , NO_2 , OR^6 , $S(O)_bR^6$, NR^6R^7 , $CONR^6R^7$,

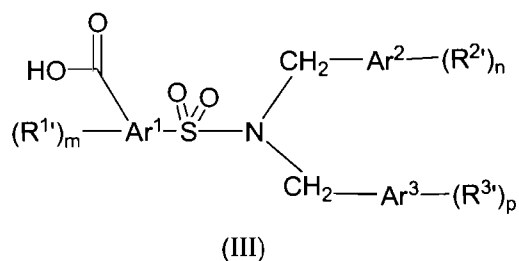
CO_2R^6 , $\text{NR}^6\text{CO}_2\text{R}^7$, $\text{NR}^6\text{CONR}^7\text{R}^8$, $\text{NR}^6\text{CSNR}^7\text{R}^8$, $\text{NR}^6\text{C(=NH)NR}^7\text{R}^8$, $\text{SO}_2\text{NR}^5\text{R}^6$, $\text{NR}^5\text{SO}_2\text{R}^6$, $\text{NR}^5\text{SO}_2\text{NR}^6\text{R}^7$, $\text{B(OR}^5\text{)(OR}^6\text{)}$, $\text{P(O)(OR}^5\text{)(OR}^6\text{)}$ și $\text{P(O)(R}^5\text{)(OR}^6\text{)}$;

sau în mod alternativ, X și/sau cel puțin unul dintre $\text{R}^{1'}$ împreună cu atomii la care sunt legați formează un aril, aril substituit, heteroaril, heteroaril substituit, cicloalchil, cicloalchil substituit, cicloheteroalchil sau cicloheteroalchil substituit, ciclu în care ciclul este în mod opțional condensat cu ciclu alt aril, aril substituit, heteroaril, heteroaril substituit, cicloalchil, cicloalchil substituit, cicloheteroalchil sau cicloheteroalchil substituit;

$\text{R}^4\text{-R}^8$ sunt în mod independent hidrogen, alchil, alchil substituit, aril, aril substituit, arilalchil, arilalchil substituit, heteroalchil, heteroalchil substituit, heteroaril, heteroaril substituit, heteroarilalchil sau heteroarilalchil substituit sau în mod alternativ, R^5 și R^6 , R^6 și R^7 , R^7 și R^8 , împreună cu atomii la care sunt legați formează un ciclu cicloheteroalchil sau cicloheteroalchil substituit;

b este 0, 1 sau 2.

[00608] Într-un alt aspect, invenția prevede compuși cu formula structurală (III) prezentați mai jos:



sau o sare, hidrat, solvat sau N-oxid a acestora, în care:

Ar^1 , Ar^2 și Ar^3 sunt în mod independent un ciclu aril, heteroaril sau cicloalchil cu cinci sau șase atomi și Ar^2 și Ar^3 poate fi omis în mod opțional;

m este 0, 1, 2 sau 3;

n și p sunt în mod independent 0, 1, 2, 3 sau 4;

fiecare $\text{R}^{1'}$ este în mod independent selectat din grupul constând din hidrogen, halogen, alchil, alchil substituit, aril, aril substituit, arilalchil, arilalchil substituit, acil, acil substituit, heteroalchil, heteroalchil substituit, heteroaril, heteroaril substituit, heteroarilalchil, heteroarilalchil substituit, CN, NO_2 , OR^6 , $\text{S(O)}_b\text{R}^6$, NR^6R^7 , CONR^6R^7 ,

CO_2R^6 , $\text{NR}^6\text{CO}_2\text{R}^7$, $\text{NR}^6\text{CONR}^7\text{R}^8$, $\text{NR}^6\text{CSNR}^7\text{R}^8$, $\text{NR}^6\text{C(=NH)NR}^7\text{R}^8$, $\text{SO}_2\text{NR}^5\text{R}^6$, $\text{NR}^5\text{SO}_2\text{R}^6$, $\text{NR}^5\text{SO}_2\text{NR}^6\text{R}^7$, $\text{B(OR}^5\text{)(OR}^6\text{)}$, $\text{P(O)(OR}^5\text{)(OR}^6\text{)}$ și $\text{P(O)(R}^5\text{)(OR}^6\text{)}$;

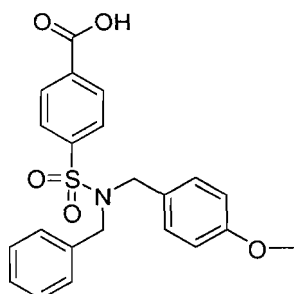
fiecare R^{2i} este în mod independent selectat din grupul constând din hidrogen, halogen, alchil, alchil substituit, aril, aril substituit, arilalchil, arilalchil substituit, acil, acil substituit, heteroalchil, heteroalchil substituit, heteroaril, heteroaril substituit, heteroarilalchil, heteroarilalchil substituit, CN, NO_2 , OR^6 , $\text{S(O)}_b\text{R}^6$, NR^6R^7 , CONR^6R^7 , CO_2R^6 , $\text{NR}^6\text{CO}_2\text{R}^7$, $\text{NR}^6\text{CONR}^7\text{R}^8$, $\text{NR}^6\text{CSNR}^7\text{R}^8$, $\text{NR}^6\text{C(=NH)NR}^7\text{R}^8$, $\text{SO}_2\text{NR}^5\text{R}^6$, $\text{NR}^5\text{SO}_2\text{R}^6$, $\text{NR}^5\text{SO}_2\text{NR}^6\text{R}^7$, $\text{B(OR}^5\text{)(OR}^6\text{)}$, $\text{P(O)(OR}^5\text{)(OR}^6\text{)}$ și $\text{P(O)(R}^5\text{)(OR}^6\text{)}$;

fiecare R^{3i} este în mod independent selectat din grupul constând din hidrogen, halogen, alchil, alchil substituit, aril, aril substituit, arilalchil, arilalchil substituit, acil, acil substituit, heteroalchil, heteroalchil substituit, heteroaril, heteroaril substituit, heteroarilalchil, heteroarilalchil substituit, CN, NO_2 , OR^6 , $\text{S(O)}_b\text{R}^6$, NR^6R^7 , CONR^6R^7 , CO_2R^6 , $\text{NR}^6\text{CO}_2\text{R}^7$, $\text{NR}^6\text{CONR}^7\text{R}^8$, $\text{NR}^6\text{CSNR}^7\text{R}^8$, $\text{NR}^6\text{C(=NH)NR}^7\text{R}^8$, $\text{SO}_2\text{NR}^5\text{R}^6$, $\text{NR}^5\text{SO}_2\text{R}^6$, $\text{NR}^5\text{SO}_2\text{NR}^6\text{R}^7$, $\text{B(OR}^5\text{)(OR}^6\text{)}$, $\text{P(O)(OR}^5\text{)(OR}^6\text{)}$ și $\text{P(O)(R}^5\text{)(OR}^6\text{)}$;

$\text{R}^5\text{-R}^8$ sunt în mod independent hidrogen, alchil, alchil substituit, aril, aril substituit, arilalchil, arilalchil substituit, heteroalchil, heteroalchil substituit, heteroaril, heteroaril substituit, heteroarilalchil sau heteroarilalchil substituit sau în mod alternativ, R^5 și R^6 , R^6 și R^7 , R^7 și R^8 , împreună cu atomii la care sunt legați formează un ciclu cicloheteroalchil sau cicloheteroalchil substituit;

b este 0, 1 sau 2.

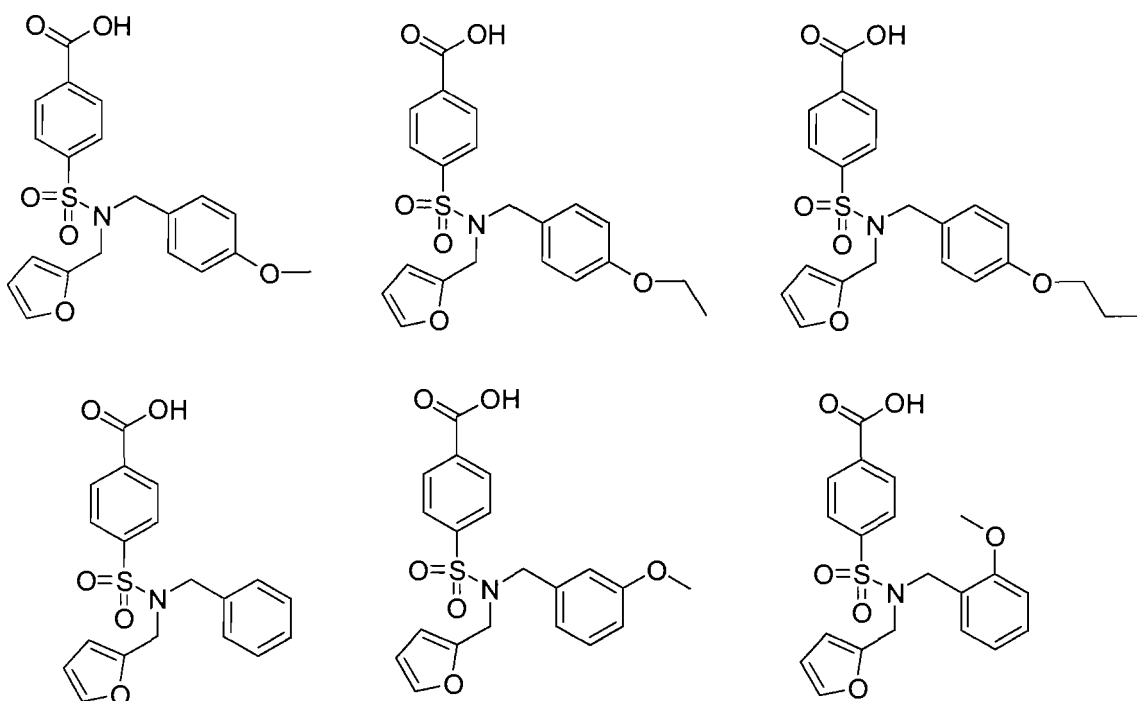
[00609] În încă un alt aspect, invenția oferă un compus având structura de mai jos:



sau o sare, hidrat, solvat sau N-oxid al acestuia.

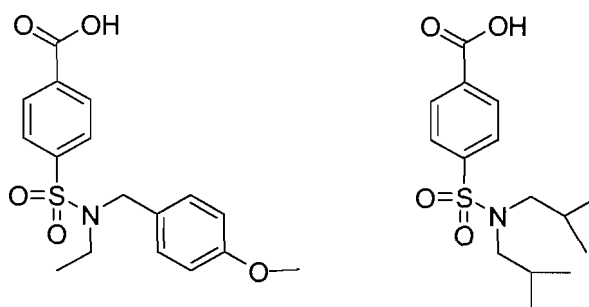
[00610] În încă un alt aspect, invenția prevede compuși având structura de mai jos:

332



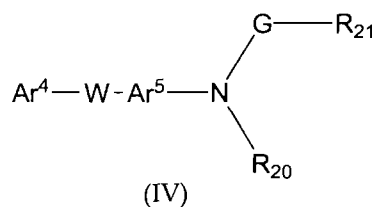
sau o sare, hidrat, solvat sau N-oxid al acestuia.

[00611] În încă alte forme de realizare, invenția prevede compuși având structura de mai jos:



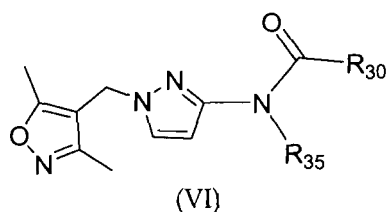
sau o sare, hidrat, solvat sau N-oxid al acestora.

[00612] Într-un aspect conex este furnizat un compus cu formula structurală (IV):



sau o sare, hidrat, solvat sau N-oxid al acestuia în care:

[00614] În încă alte forme de realizare suplimentare ale invenției, este furnizat un compus cu formula structurală (VI)

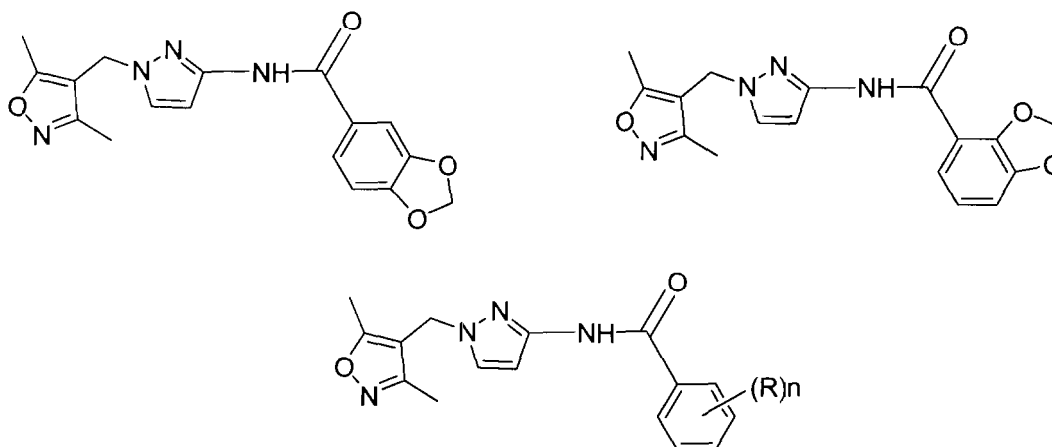


sau o sare, hidrat, solvat sau N-oxid al acestuia în care:

R^{30} este selectat din grupul constând dintr-un arilalchenil, heteroarilalchenil, arilalchil, heteroarilalky, aril, heteroaril, alchil, alcoxi-alchil, alchenil, cicloalchil, cicloalchenil și derivați substituiți;

R^{35} este selectat din grupul constând din hidrogen, alchil și alchil substituit.

[00615] În încă alte forme de realizare suplimentare, invenția prevede compuși având structura de mai jos:

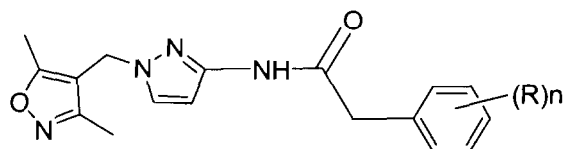


sau o sare, hidrat, solvat sau N-oxid al acestora,

în care fiecare R este în mod independent Cl, MeO, CN, EtO, OH, Me, -SO₂Me, F sau H și

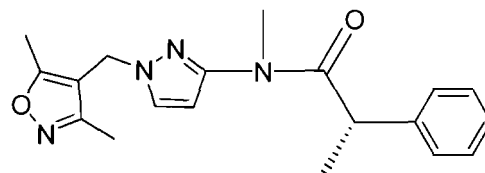
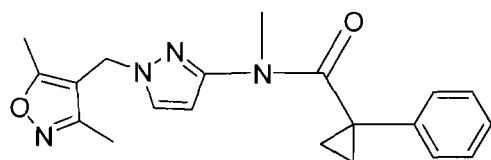
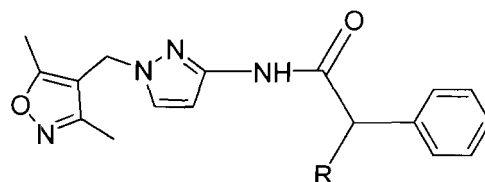
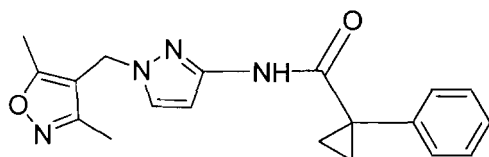
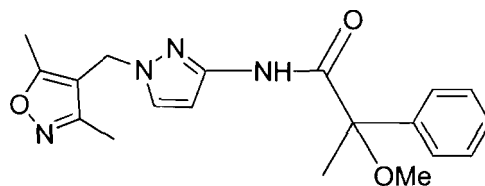
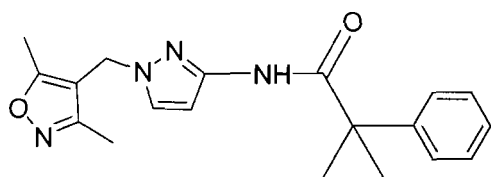
n este 0,1,2,3 sau 4.

[00616] În încă alte forme de realizare, invenția prevede compuși având structura de mai jos:



sau o sare, hidrat, solvat sau N-oxid al acestora,
 în care fiecare R este în mod independent MeO sau OH și
 n este 0,1,2,3 sau 4.

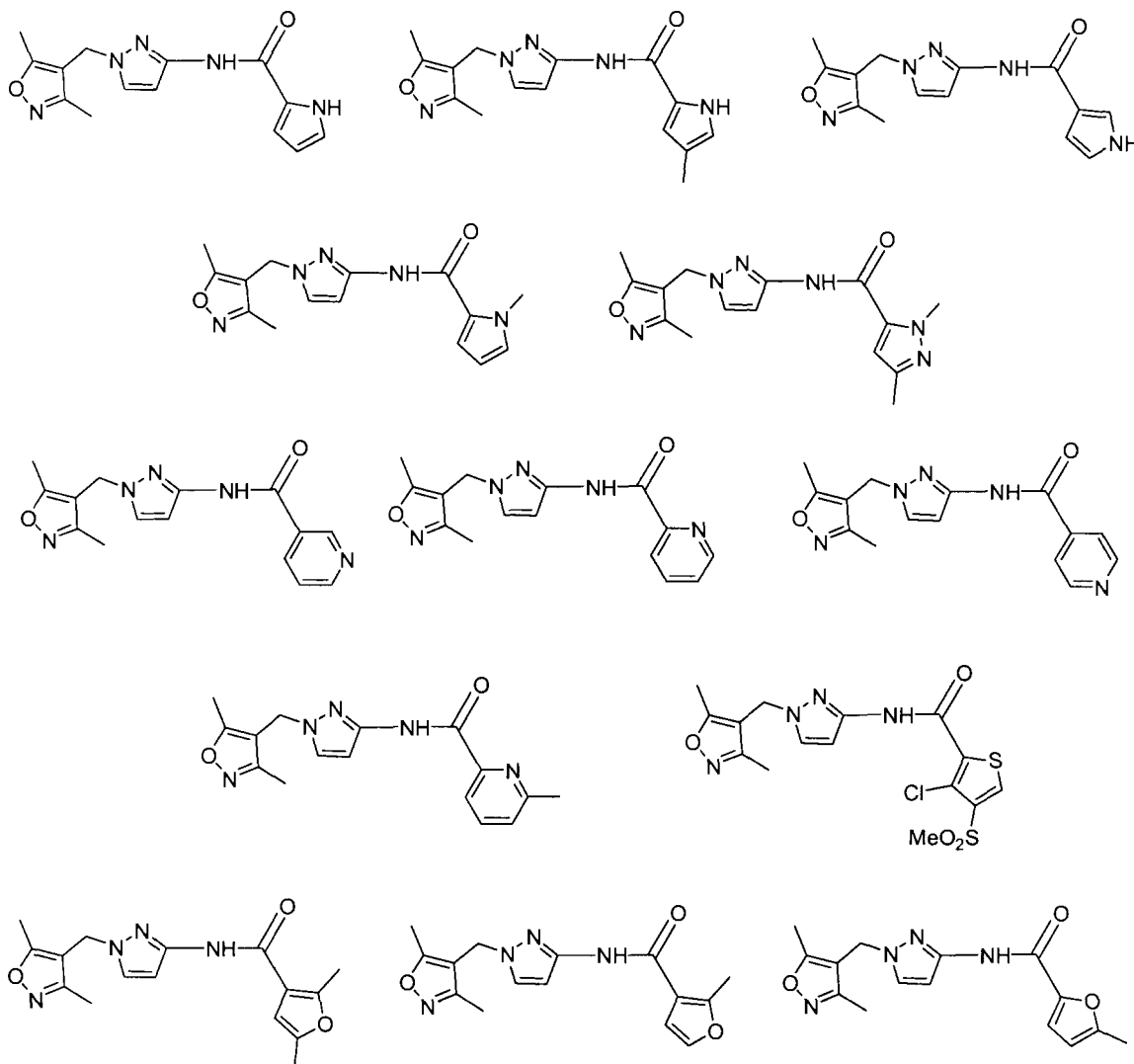
[00617] În încă alte forme de realizare, invenția prevede compuși având structura de
 mai jos:



sau o sare, hidrat, solvat sau N-oxid al acestora,
 în care R este H, Me, Et, OCOMe, CH₂OH, OMe sau Ph.

336

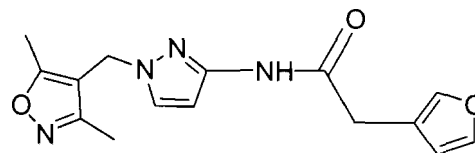
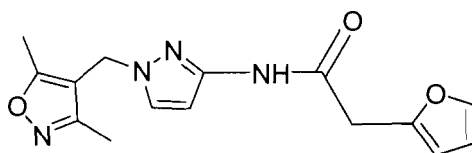
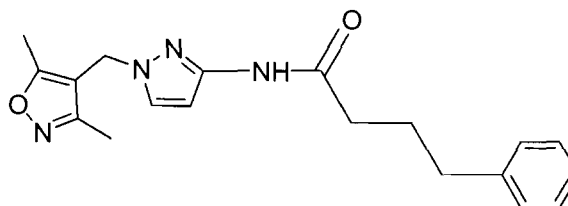
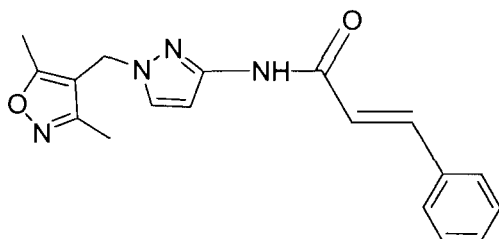
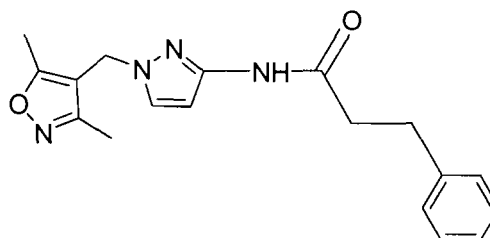
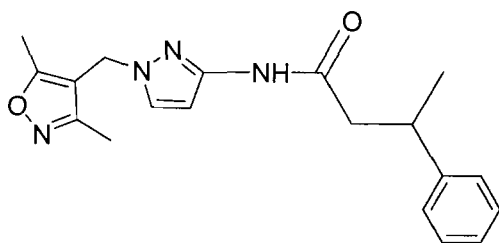
[00618] În încă alte forme de realizare, invenția prevede compuși având structura de mai jos:



sau o sare, hidrat, solvat sau N-oxid al acestora.

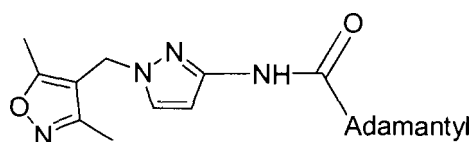
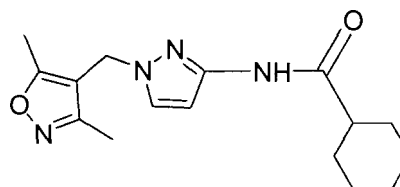
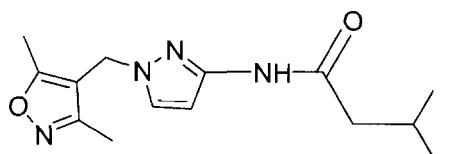
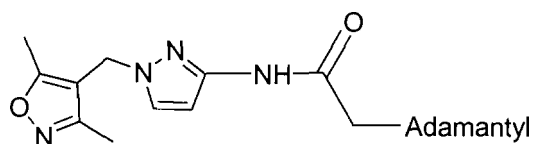
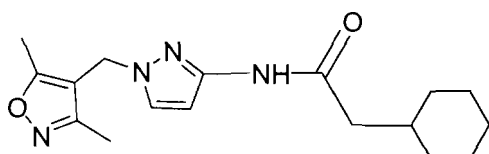
[00619] În încă alte forme de realizare, invenția prevede compuși având structura de mai jos:

337



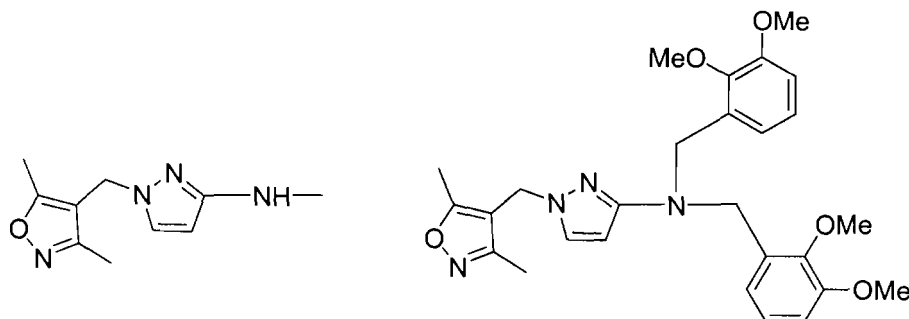
sau o sare, hidrat, solvat sau N-oxid al acestora.

[00620] În încă alte forme de realizare, invenția prevede compuși având structura de mai jos:



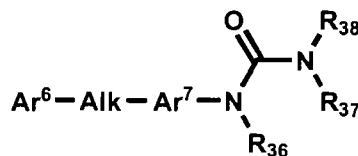
sau o sare, hidrat, solvat sau N-oxid al acestora.

[00621] În încă alte forme de realizare, invenția prevede compuși având structura de mai jos:



sau o sare, hidrat, solvat sau N-oxid al acestora.

[00622] Într-un aspect, invenția se referă la un compus cu formula:



sau o sare, hidrat, solvat, N-oxid sau promedicament al acestuia, în care Ar^6 și Ar^7 sunt, același sau diferit, în mod independent unul de celălalt, o grupare aril cu cinci sau șase atomi sau o grupare heteroaril cu cinci sau șase atomi;

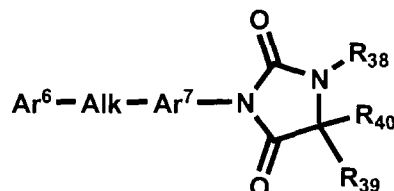
Alk este o grupare alchil, în mod opțional întreruptă de un heteroatom;

R_{36} și R_{37} sunt, același sau diferit în mod independent unul de celălalt, H, alchil sau R_{36} și R_{37} , împreună cu atomii la care sunt atașați, formează un heterociclu cu cinci sau șase atomi opțional substituit; și

R_{38} este H, alchil substituit sau nesubstituit, cicloalchil alchil substituit sau nesubstituit, heterocicloalchil alchil substituit sau nesubstituit, aril substituit sau nesubstituit, arilamidoalchil substituit sau nesubstituit, heteroarilamidoalchil substituit sau nesubstituit, arilalchil substituit sau nesubstituit, arilalcoxi substituit sau nesubstituit, heteroaril substituit sau nesubstituit, heteroarilalchil substituit sau nesubstituit sau haloalchil.

[00623] Într-un aspect, compușii invenției conțin un heterociclu de cinci atomi. Într-o formă de realizare, heterociclu de cinci atomi este o hidantoină sau o uree ciclică substituită sau nesubstituită.

[00624] Într-o formă de realizare, hidantoina este o hidantoină cu formula:



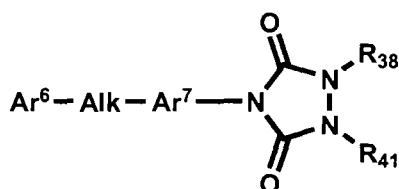
sau o sare, hidrat, solvat, N-oxid sau promedicament a acesteia, în care Ar^6 și Ar^7 sunt, același sau diferit în mod independent unul de celălalt, o grupare aril cu cinci sau șase atomi sau o grupare heteroaril cu cinci sau șase atomi;

Alk este o grupare alchil, în mod opțional întreruptă de un heteroatom;

R_{38} este H, alchil substituit sau nesubstituit, cicloalchil alchil substituit sau nesubstituit, heterocicloalchil alchil substituit sau nesubstituit, aril substituit sau nesubstituit, arilamidoalchil substituit sau nesubstituit, heteroarilamidoalchil substituit sau nesubstituit, arilalchil substituit sau nesubstituit, arilalcoxi substituit sau nesubstituit, heteroaril substituit sau nesubstituit, heteroarilalchil substituit sau nesubstituit sau haloalchil; și

R_{39} și R_{40} sunt, același sau diferit în mod independent unul de celălalt, H, alchil substituit sau nesubstituit, cicloalchil alchil substituit sau nesubstituit, heterocicloalchil alchil substituit sau nesubstituit, aril substituit sau nesubstituit, arilamidoalchil substituit sau nesubstituit, arilalchilamidoalchil substituit sau nesubstituit, heteroarilamidoalchil substituit sau nesubstituit, heteroarilalchilamidoalchil substituit sau nesubstituit, arilalchil substituit sau nesubstituit, arilalcoxi substituit sau nesubstituit, heteroaril substituit sau nesubstituit, heteroarilalchil substituit sau nesubstituit, haloalchil sau R_{39} și R_{40} , împreună cu atomul de carbon la care sunt atașați, formează o grupare C=O sau o grupare alchenil substituită sau nesubstituită.

[00625] În alt aspect, compușii invenției conțin un heterociclu cu cinci atomi care este un urazol. Într-o formă de realizare, urazolul este un urazol cu formula:



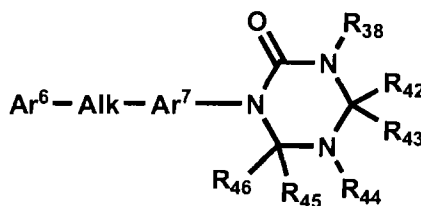
sau o sare, hidrat, solvat, N-oxid sau promedicament al acestuia, în care Ar⁶ și Ar⁷ sunt, același sau diferit în mod independent unul de celălalt, o grupare aril cu cinci sau șase atomi sau o grupare heteroaril cu cinci sau șase atomi;

Alk este o grupare alchil, în mod optional întrerupt de un heteroatom;

R₃₈ este H, alchil substituit sau nesubstituit, cicloalchil alchil substituit sau nesubstituit, heterocicloalchilalchil substituit sau nesubstituit, aril substituit sau nesubstituit, arilamidoalchil substituit sau nesubstituit, heteroarilamidoalchil substituit sau nesubstituit, arilalchil substituit sau nesubstituit, arilalcoxi substituit sau nesubstituit, heteroaril substituit sau nesubstituit, heteroarilalchil substituit sau nesubstituit sau haloalchil; și

R₄₁ este H, alchil substituit sau nesubstituit, cicloalchil alchil substituit sau nesubstituit, heterocicloalchilalchil substituit sau nesubstituit, aril substituit sau nesubstituit, arilamidoalchil substituit sau nesubstituit, arilalchilamidoalchil substituit sau nesubstituit, heteroarilamidoalchil substituit sau nesubstituit, heteroarilalchilamidoalchil substituit sau nesubstituit, arilalchil substituit sau nesubstituit, arilalcoxi substituit sau nesubstituit, heteroaril substituit sau nesubstituit, heteroarilalchil substituit sau nesubstituit sau haloalchil.

[00626] În alt aspect, compuşii invenţiei conţin un heterociclu cu şase atomi. Într-o formă de realizare, heterociclul cu şase atomi este un heterociclu cu şase atomi cu formula:



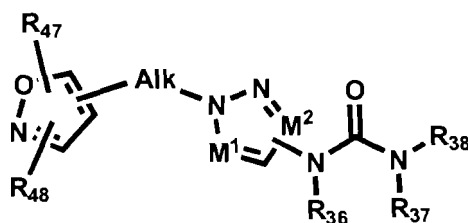
sau o sare, hidrat, solvat, N-oxid sau promedicament al acestuia,

în care R_{38} este H, alchil substituit sau nesubstituit, cicloalchil alchil substituit sau nesubstituit, heterocicloalchilalchil substituit sau nesubstituit, aril substituit sau nesubstituit, arilamidoalchil substituit sau nesubstituit, heteroarilamidoalchil substituit sau nesubstituit, arilalchil substituit sau

nesubstituit, arilalcoxi substituit sau nesubstituit, heteroaril substituit sau nesubstituit, heteroarilalchil substituit sau nesubstituit sau haloalchil; și

R_{42} , R_{43} , R_{44} , R_{45} și R_{46} sunt, același sau diferit în mod independent unul de celălalt, H, alchil substituit sau nesubstituit, cicloalchil alchil substituit sau nesubstituit, arilalchil substituit sau nesubstituit, arilalcoxi substituit sau nesubstituit, heteroaril substituit sau nesubstituit, heteroarilalchil substituit sau nesubstituit sau R_{42} și R_{43} sau R_{45} și R_{46} , împreună cu atomii de carbon la care este atașat fiecare, formează o grupare C=O.

[00627] În alt aspect, invenția se referă la un compus cu formula:



sau o sare, hidrat, solvat, N-oxid sau promedicament al acestuia,

în care Alk este o grupare alchil, în mod opțional întrerupt de un heteroatom;

M^1 este N sau CR_{49} , în care R_{49} este H sau alchil substituit sau nesubstituit;

M^2 este N sau CR_{50} , în care R_{50} este H sau alchil substituit sau nesubstituit;

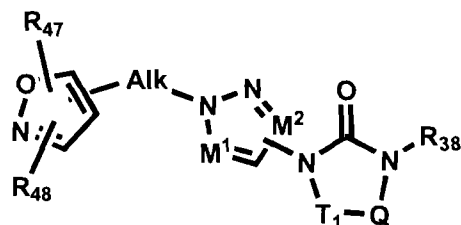
R_{36} și R_{37} sunt, același sau diferit în mod independent unul de celălalt, H, alchil sau, R_{36} și R_{37} , împreună cu atomii la care sunt atașați, formează un heterociclu cu cinci sau șase atomi opțional substituit; și

R_{38} este H, alchil substituit sau nesubstituit, cicloalchil alchil substituit sau nesubstituit, heterocicloalchilalchil substituit sau nesubstituit, aril substituit sau nesubstituit, arilamidoalchil substituit sau nesubstituit, heteroarilamidoalchil substituit sau nesubstituit, arilalchil substituit sau nesubstituit, arilalcoxi substituit sau nesubstituit, heteroaril substituit sau nesubstituit, heteroarilalchil substituit sau nesubstituit sau haloalchil;

R_{47} este H, alchil substituit sau nesubstituit, alcoxi substituit sau nesubstituit, aril substituit sau nesubstituit, arilalchil substituit sau nesubstituit sau halo; și

R_{48} este H, alchil substituit sau nesubstituit, alcoxi substituit sau nesubstituit, aril substituit sau nesubstituit, arilalchil substituit sau nesubstituit sau halo.

[00628] În încă alt aspect, invenția se referă la un compus cu formula:



sau o sare, hidrat, solvat, N-oxid sau promedicament al acestuia, în care Alk este o grupare alchil, în mod opțional întrerupt de un heteroatom; T_1 este C=O și Q este $CR_{51}R_{52}$ sau NR_{51} , în care R_{51} și R_{52} sunt, același sau diferit în mod independent unul de celălalt, H, alchil substituit sau nesubstituit, cicloalchil alchil substituit sau nesubstituit, heterocicloalchilalchil substituit sau nesubstituit, aril substituit sau nesubstituit, arilamidoalchil substituit sau nesubstituit, arilalchilamidoalchil substituit sau nesubstituit, heteroarilamidoalchil substituit sau nesubstituit, heteroarilalchilamidoalchil substituit sau nesubstituit, arilalchil substituit sau nesubstituit, arilalcoxi substituit sau nesubstituit, heteroaril substituit sau nesubstituit, heteroarilalchil substituit sau nesubstituit, haloalchil sau R_{51} și R_{52} , împreună cu atomul de carbon la care sunt atașați, formează o grupare C=O sau o grupare alchenil substituită sau nesubstituită;

M^1 este N sau CR_{49} , în care R_{49} este H sau alchil substituit sau nesubstituit;

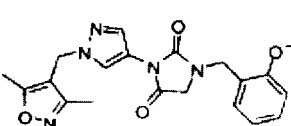
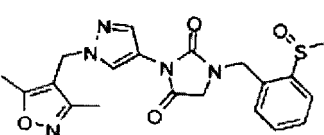
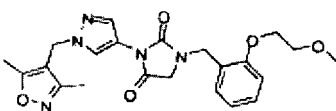
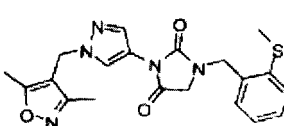
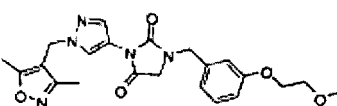
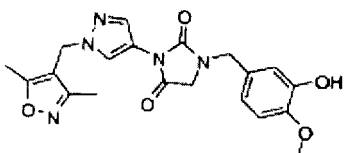
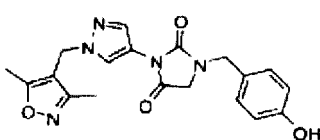
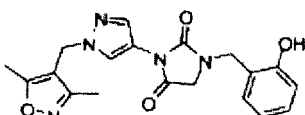
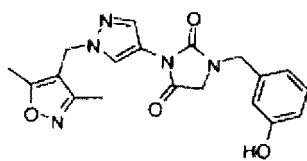
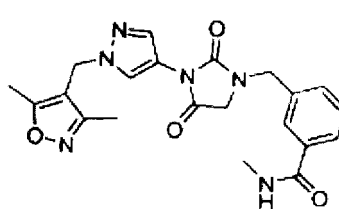
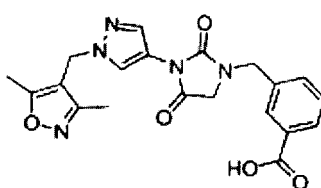
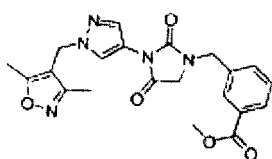
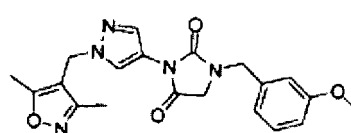
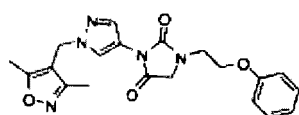
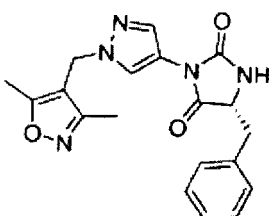
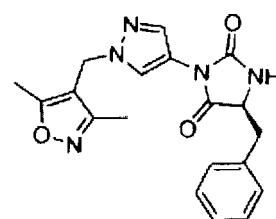
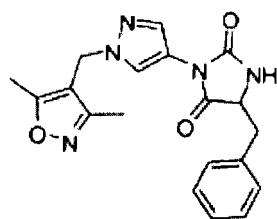
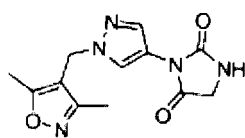
M^2 este N sau CR_{50} , în care R_{50} este H sau alchil substituit sau nesubstituit;

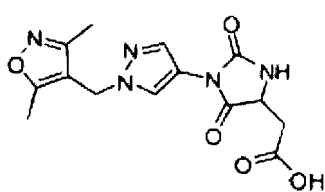
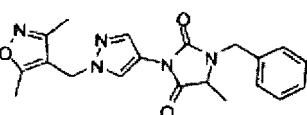
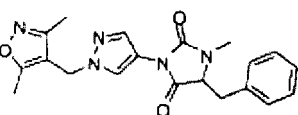
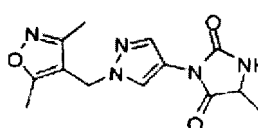
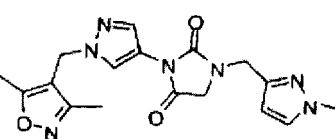
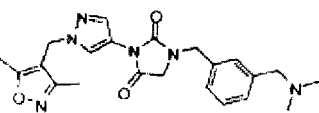
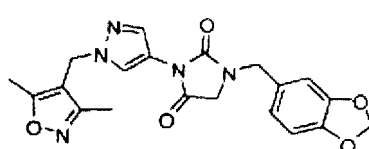
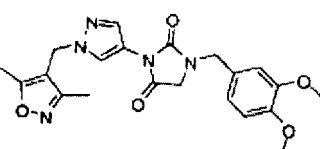
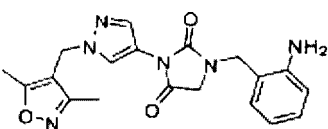
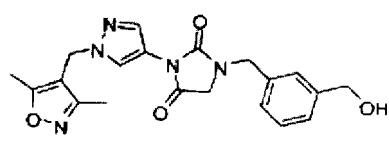
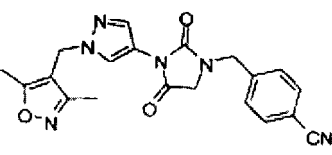
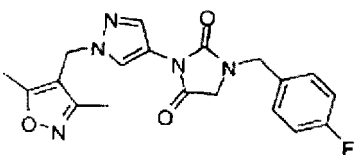
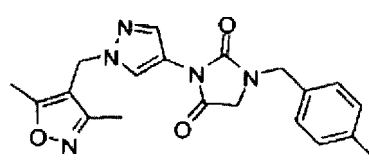
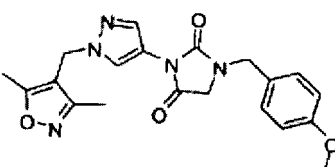
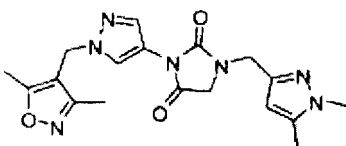
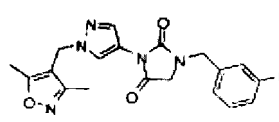
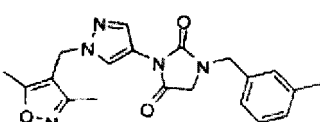
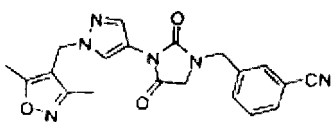
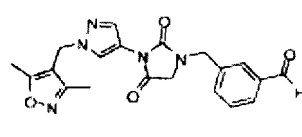
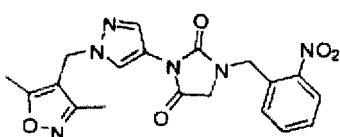
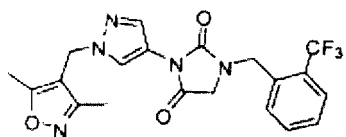
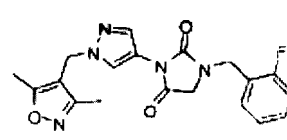
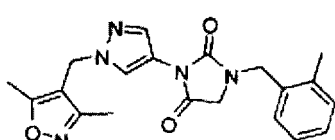
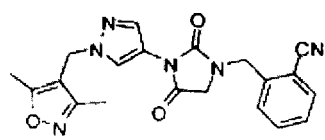
R_{38} este H, alchil substituit sau nesubstituit, cicloalchil alchil substituit sau nesubstituit, heterocicloalchilalchil substituit sau nesubstituit, aril substituit sau nesubstituit, arilamidoalchil substituit sau nesubstituit, heteroarilamidoalchil substituit sau nesubstituit, arilalchil substituit sau nesubstituit, arilalcoxi substituit sau nesubstituit, heteroaril substituit sau nesubstituit, heteroarilalchil substituit sau nesubstituit sau haloalchil;

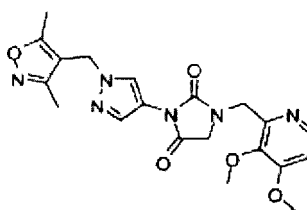
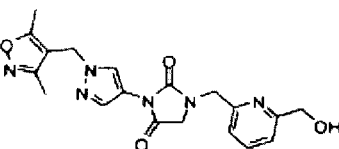
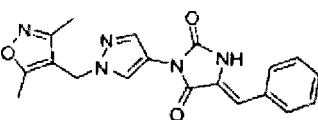
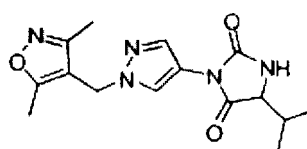
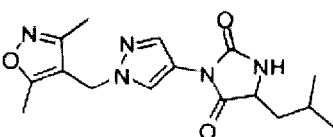
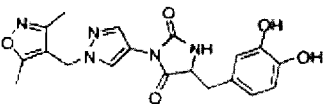
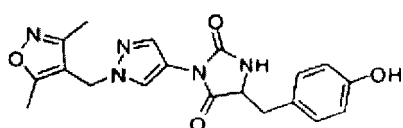
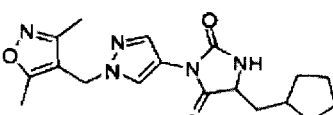
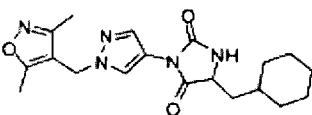
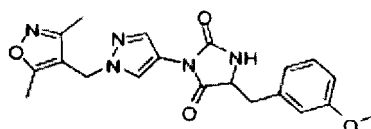
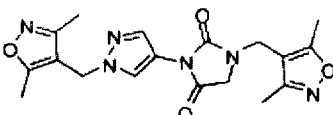
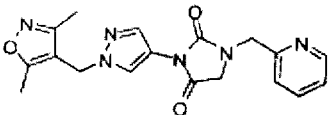
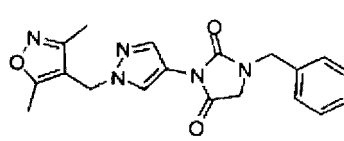
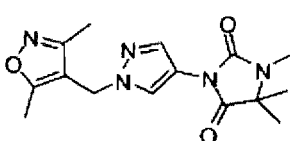
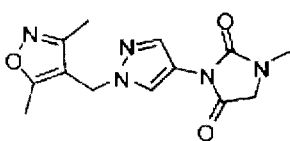
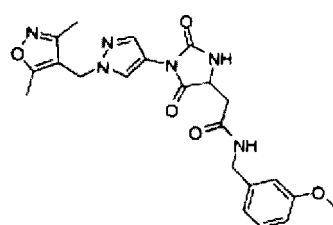
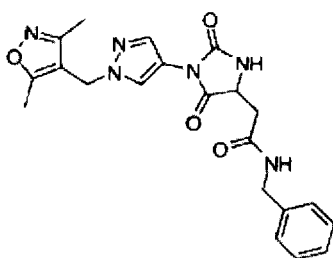
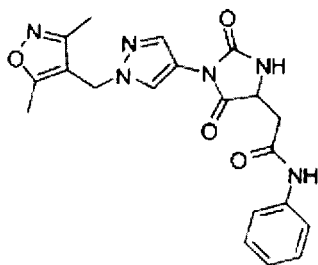
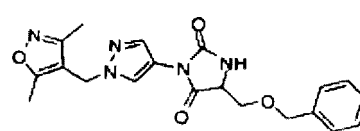
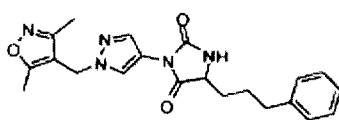
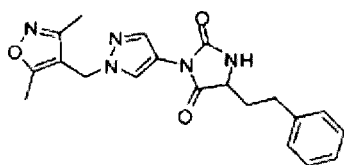
R_{47} este H, alchil substituit sau nesubstituit, alcoxi substituit sau nesubstituit, aril substituit sau nesubstituit, arilalchil substituit sau nesubstituit sau halogen; și

R_{48} este H, alchil substituit sau nesubstituit, alcoxi substituit sau nesubstituit, aril substituit sau nesubstituit, arilalchil substituit sau nesubstituit sau halogen.

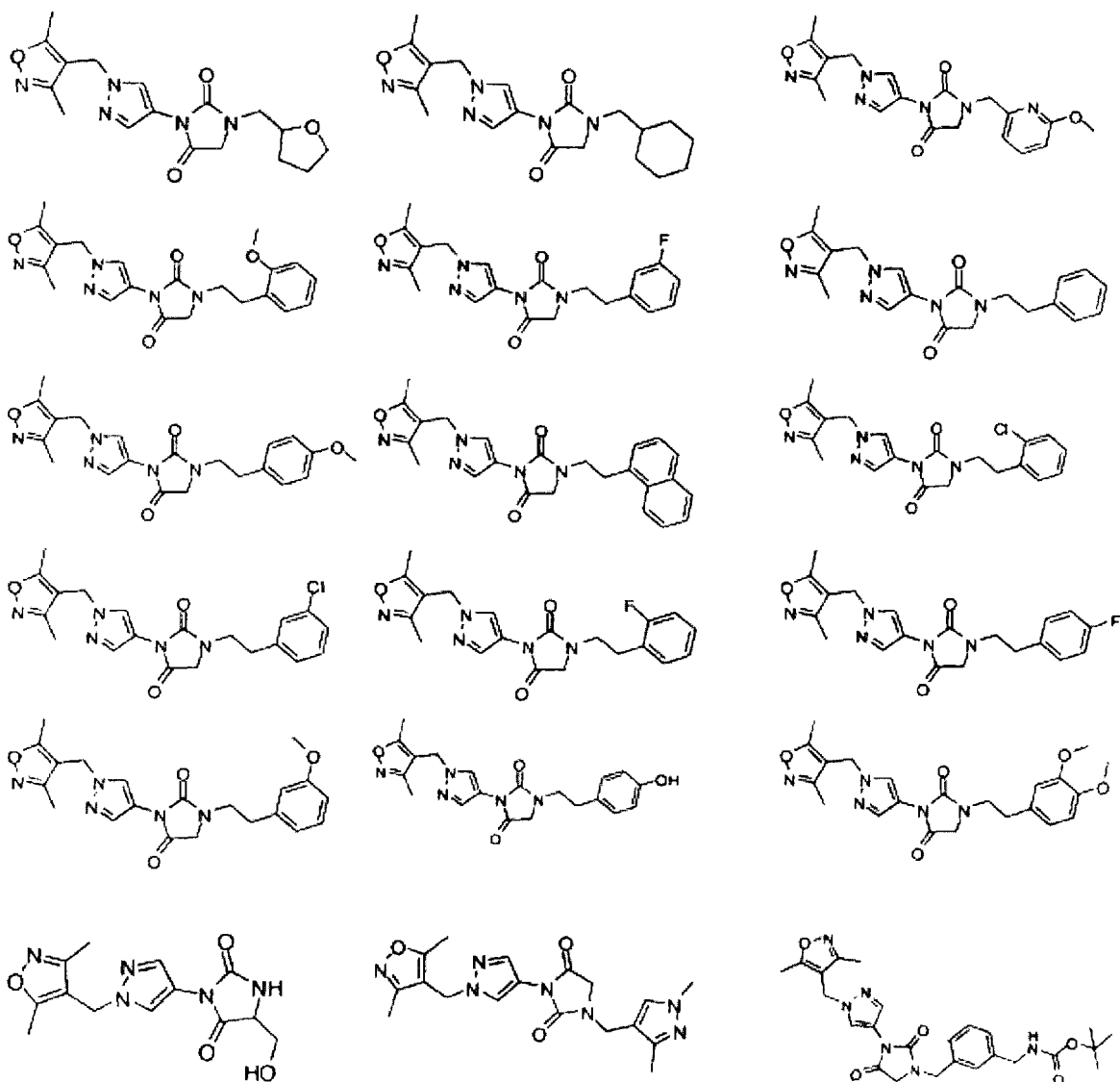
[00629] În încă alt aspect, invenția se referă la un compus cu formula:







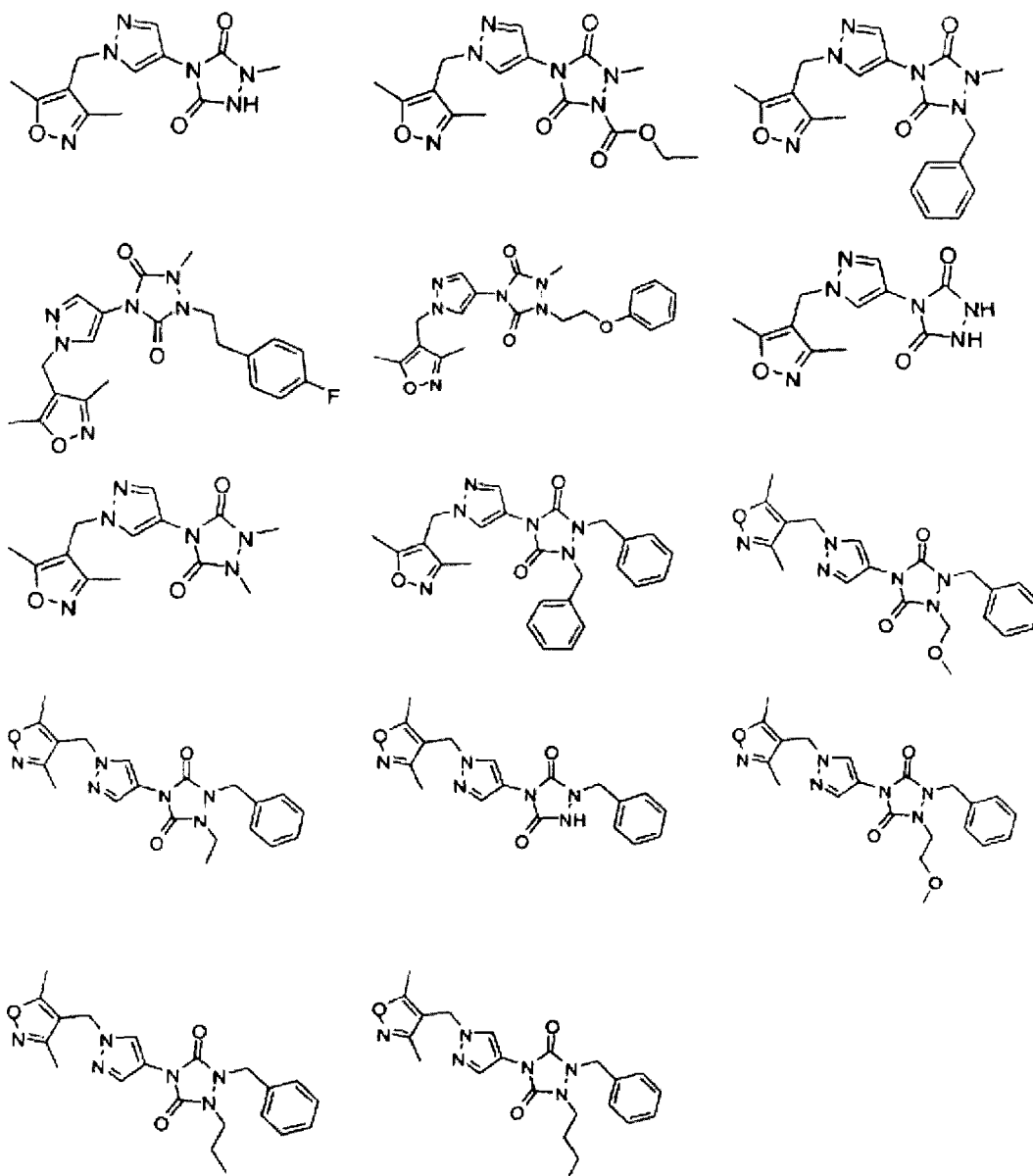
346



sau o sare, hidrat, solvat, N-oxid sau promedicament al acestuia.

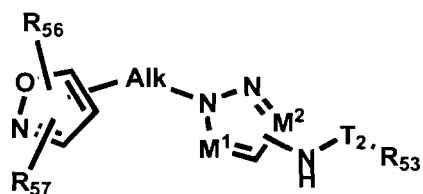
[00630] In alt aspect, invenția se referă la un compus cu formula:

347



sau o sare, hidrat, solvat, N-oxid sau promedicament al acestuia.

[00631] În încă alt aspect, invenția se referă la o metodă de obținere a unui compus cu formula:



sau o sare, hidrat, solvat, N-oxid sau promedicament al acestuia,

în care Alk este o grupare alchil, în mod opțional întrerupt de un heteroatom;

T₂ este C=S, C=O sau S(O)₂;

R₅₃ este alchil substituit sau nesubstituit, cicloalchil substituit sau nesubstituit, heteroaril substituit sau nesubstituit, aril substituit sau nesubstituit sau arilalchil substituit sau nesubstituit;

M¹ este N sau CR₅₄, în care R₅₄ este H sau alchil substituit sau nesubstituit;

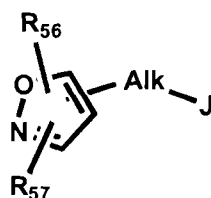
M² este N sau CR₅₅, în care R₅₅ este H sau alchil substituit sau nesubstituit;

R₅₆ este H, alchil substituit sau nesubstituit, alcoxi substituit sau nesubstituit, aril substituit sau nesubstituit, arilalchil substituit sau nesubstituit sau halogen;

și

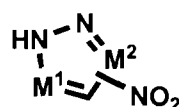
R₅₇ este H, alchil substituit sau nesubstituit, alcoxi substituit sau nesubstituit, aril substituit sau nesubstituit, arilalchil substituit sau nesubstituit sau halogen;

în care metoda cuprinde reacția unui compus cu formula:

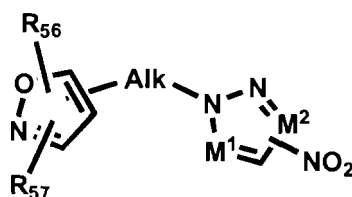


în care R₅₆, R₅₇ și Alk sunt definite mai sus și J este o grupare fugace;

cu un compus cu formula:



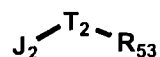
în care M¹ și M² sunt definite mai sus pentru a da un compus cu formula



având o grupare NO₂;

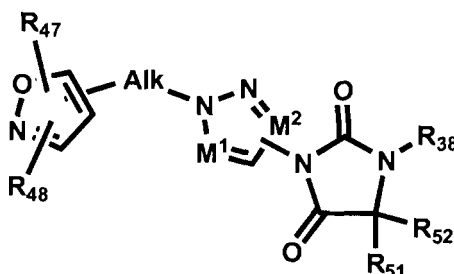
reducerea grupării NO₂ pentru a da un compus având o grupare NH₂; și

reacția compusului având o grupare NH₂ cu un compus cu formula



în care J₂ este o grupare fugace și T₂ și R₅₃ sunt definite mai sus.

[00632] În încă alt aspect, invenția se referă la o metodă de obținere a unui compus cu formula:



sau o sare, hidrat, solvat, N-oxid sau promedicament al acestuia, în care Alk este o grupare alchil, în mod opțional întrerupt de un heteroatom; R₅₁ și R₅₂ sunt, același sau diferit în mod independent unul de celălalt, H, alchil substituit sau nesubstituit, cicloalchil alchil substituit sau nesubstituit, heterocicloalchil alchil substituit sau nesubstituit, aril substituit sau nesubstituit, arilamidoalchil substituit sau nesubstituit, arilalchilamidoalchil substituit sau nesubstituit, heteroarilamidoalchil substituit sau nesubstituit, heteroarilalchilamidoalchil substituit sau nesubstituit, arilalchil substituit sau nesubstituit, arilalcoxi substituit sau nesubstituit, heteroaril substituit sau nesubstituit, heteroarilalchil substituit sau nesubstituit, haloalchil sau R₅₁ și R₅₂, împreună cu atomul de carbon la care sunt atașați, formează o grupare alchenil substituit sau nesubstituit;

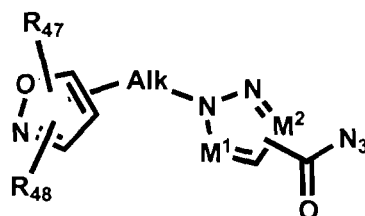
M¹ este N sau CR₄₉, în care R₄₉ este H sau alchil substituit sau nesubstituit;

M² este N sau CR₅₀, în care R₅₀ este H sau alchil substituit sau nesubstituit;

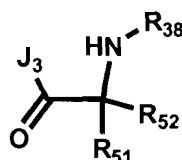
R₃₈ este H, alchil substituit sau nesubstituit, cicloalchil alchil substituit sau nesubstituit, heterocicloalchil alchil substituit sau nesubstituit, aril substituit sau nesubstituit, arilamidoalchil substituit sau nesubstituit, heteroarilamidoalchil substituit sau nesubstituit, arilalchil substituit sau nesubstituit, arilalcoxi substituit sau nesubstituit, heteroaril substituit sau nesubstituit, heteroarilalchil substituit sau nesubstituit sau haloalchil;

R₄₇ este H, alchil substituit sau nesubstituit, alcoxi substituit sau nesubstituit, aril substituit sau nesubstituit, arilalchil substituit sau nesubstituit sau halogen; și

R_{48} este H, alchil substituit sau nesubstituit, alcoxi substituit sau nesubstituit, aril substituit sau nesubstituit, arilalchil substituit sau nesubstituit sau halogen; în care metoda cuprinde încălzirea unui compus cu formula:

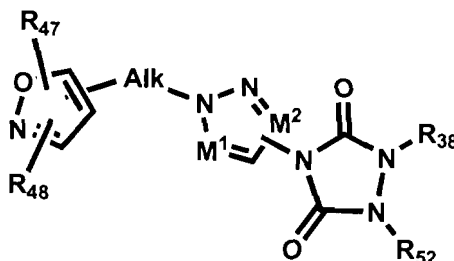


în care R_{47} , R_{48} , Alk, M^1 și M^2 sunt definite mai sus; pentru transformarea grupării $-\text{CON}_3$ într-o grupare $-\text{N}=\text{C}=\text{O}$ și apoi reacția cu un compus cu formula:



în care J_3 este o grupare fugace și R_{38} , R_{51} și R_{52} sunt definite mai sus.

[00633] În încă alt aspect, invenția se referă la o metodă de obținere a unui compus cu formula:



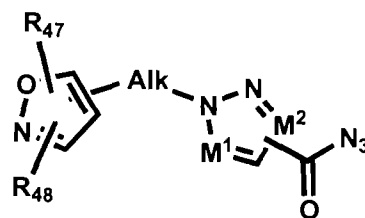
sau o sare, hidrat, solvat, N-oxid sau promedicament al acestuia, în care Alk este o grupare alchil, în mod opțional întrerupt de un heteroatom; R_{52} este H, alchil substituit sau nesubstituit, cicloalchil alchil substituit sau nesubstituit, heterocicloalchil alchil substituit sau nesubstituit, aril substituit sau nesubstituit, arilamidoalchil substituit sau nesubstituit, arilalchilamidoalchil substituit sau nesubstituit, heteroarilamidoalchil substituit sau nesubstituit, heteroarilalchilamidoalchil substituit sau nesubstituit, arilalchil substituit sau nesubstituit, arilalcoxi substituit sau nesubstituit, heteroaril substituit sau nesubstituit, heteroarilalchil substituit sau nesubstituit, haloalchil; M^1 este N sau CR_{49} , în care R_{49} este H sau alchil substituit sau nesubstituit;

M^2 este N sau CR_{50} , în care R_{50} este H sau alchil substituit sau nesubstituit;
 R_{38} este H, alchil substituit sau nesubstituit, cicloalchil alchil substituit sau nesubstituit, heterocicloalchil alchil substituit sau nesubstituit, aril substituit sau nesubstituit, arilamidoalchil substituit sau nesubstituit, heteroarilamidoalchil substituit sau nesubstituit, arilalchil substituit sau nesubstituit, arilalcoxi substituit sau nesubstituit, heteroaril substituit sau nesubstituit, heteroarilalchil substituit sau nesubstituit sau haloalchil;

R_{47} este H, alchil substituit sau nesubstituit, alcoxi substituit sau nesubstituit, aril substituit sau nesubstituit, arilalchil substituit sau nesubstituit sau halo; și

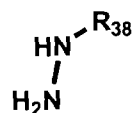
R_{48} este H, alchil substituit sau nesubstituit, alcoxi substituit sau nesubstituit, aril substituit sau nesubstituit, arilalchil substituit sau nesubstituit sau halo;

în care metoda cuprinde încălzirea unui compus cu formula:



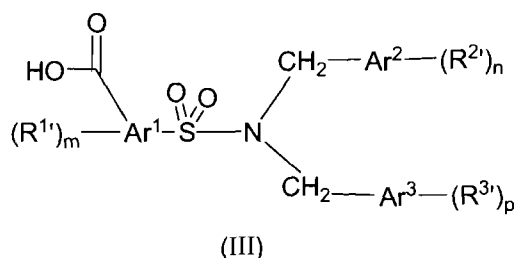
în care R_{47} , R_{48} , Alk, M^1 și M^2 sunt definite mai sus;

pentru transformarea grupării $-CON_3$ într-o grupare $-N=C=O$ și apoi reacția cu o hidrazină cu formula:



în care R_{38} este definită mai sus.

[00634] În încă alt aspect, invenția se referă la o metodă de obținere a unui compus cu formula:



sau o sare, hidrat, solvat sau N-oxid al acestuia în care:

Ar^1 , Ar^2 și Ar^3 sunt în mod independent un ciclu aril, heteroaril sau cicloalchil cu cinci sau șase atomi și Ar^2 și Ar^3 pot fi omiși în mod opțional;

m este 0, 1, 2 sau 3;

n și p sunt în mod independent 0, 1, 2, 3 sau 4;

fiecare $R^{1'}$ este în mod independent selectat din grupul constând din hidrogen, halogen, alchil, alchil substituit, aril, aril substituit, arilalchil, arilalchil substituit, acil, acil substituit, heteroalchil, heteroalchil substituit, heteroaril, heteroaril substituit, heteroarilalchil, heteroarilalchil substituit, CN, NO_2 , OR^6 , $S(O)_bR^6$, NR^6R^7 , $CONR^6R^7$, CO_2R^6 , $NR^6CO_2R^7$, $NR^6CONR^7R^8$, $NR^6CSNR^7R^8$, $NR^6C(=NH)NR^7R^8$, $SO_2NR^5R^6$, $NR^5SO_2R^6$, $NR^5SO_2NR^6R^7$, $B(OR^5)(OR^6)$, $P(O)(OR^5)(OR^6)$ și $P(O)(R^5)(OR^6)$;

fiecare $R^{2'}$ este în mod independent selectat din grupul constând din hidrogen, halogen, alchil, alchil substituit, aril, aril substituit, arilalchil, arilalchil substituit, acil, acil substituit, heteroalchil, heteroalchil substituit, heteroaril, substituit heteroaril, heteroarilalchil, heteroarilalchil substituit, CN, NO_2 , OR^6 , $S(O)_bR^6$, NR^6R^7 , $CONR^6R^7$, CO_2R^6 , $NR^6CO_2R^7$, $NR^6CONR^7R^8$, $NR^6CSNR^7R^8$, $NR^6C(=NH)NR^7R^8$, $SO_2NR^5R^6$, $NR^5SO_2R^6$, $NR^5SO_2NR^6R^7$, $B(OR^5)(OR^6)$, $P(O)(OR^5)(OR^6)$ și $P(O)(R^5)(OR^6)$;

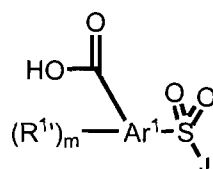
fiecare $R^{3'}$ este în mod independent selectat din grupul constând din hidrogen, halogen, alchil, alchil substituit, aril, aril substituit, arilalchil, arilalchil substituit, acil, acil substituit, heteroalchil, heteroalchil substituit, heteroaril, heteroaril substituit, heteroarilalchil, heteroarilalchil substituit, CN, NO_2 , OR^6 , $S(O)_bR^6$, NR^6R^7 , $CONR^6R^7$, CO_2R^6 , $NR^6CO_2R^7$, $NR^6CONR^7R^8$, $NR^6CSNR^7R^8$, $NR^6C(=NH)NR^7R^8$, $SO_2NR^5R^6$, $NR^5SO_2R^6$, $NR^5SO_2NR^6R^7$, $B(OR^5)(OR^6)$, $P(O)(OR^5)(OR^6)$ și $P(O)(R^5)(OR^6)$;

R^5R^8 sunt în mod independent hidrogen, alchil, alchil substituit, aril, aril substituit, arilalchil, arilalchil substituit, heteroalchil, heteroalchil substituit, heteroaril, heteroaril substituit, heteroarilalchil sau substituit heteroarilalchil sau în mod alternativ, R^6 și R^7 , R^7 și R^8 , împreună cu atomii la care sunt legați formează un ciclu cicloheteroalchil sau cicloheteroalchil substituit;

b este 0, 1 sau 2;

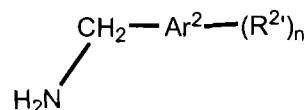
în care metoda cuprinde reacția unui compus cu formula:

353



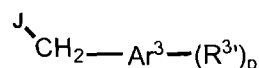
în care J este o grupare fugace;

cu un compus cu formula:



pentru a da un produs; și

reacția produsului cu un compus cu formula:



în care J este o grupare fugace.

SECVENȚE DE PROTEINA G HIMERICĂ ȘI GENE hT2R ȘI POLIPEPTIDE

[00635] Secvența proteică din marcatorul rodopsină: (SEQ ID NO:1)

MNGTEGPNFYVPFSNKTGVVRSPFEAPQYYLAEPW

[00636] Secvența proteică din G16gust44: (SEQ ID NO:2)

MARSLTWRCCPWCLTEDEKAAARVDQEINRILLEQKKQDRGELKLLLLGPGESGKST
FIKQMRIIHGAGYSEEERKGFRPLVYQNIFVSMRAMIEAMERLQIPFSRPESKHHASLV
MSQDPYKVTTFEKRYAAAMQWLWRDAGIRACYERRREFHLLDSAVYYLSHLERITE
EGYVPTAQDVLRSRMPTTGINEYCFSVQKTNLRIVDVGGQKSERKKWIHCFENVIALI
YLASLSEYDQCLEENNQENRMKESLALFGTILELPWFKSTSVILFLNKTDILEEKIPTSH
LATYFPSFQGPQDAEAAKRFILDMYTRMYTGCVDGPEGSNLKKEDKEIYSHMTCA
TDTQNVKVFVDAVTDIIKENLKDCLF

[00637] Secvențele hT2R8:

ADN-(SEQ ID NO:3)

ATGTTTCAGTCCTGCAGATAACATCTTTATAATCCTAATAACTGGAGAATTCATACT
AGGAATATTGGGGAATGGATACAT

TGCACTAGTCAACTGGATTGACTGGATTAAGAAGAAAAAGATTTCCACAGTTGAC
TACATCCTTACCAATTTAGTTATCG
CCAGAATTTGTTTGATCAGTGTAATGGTTGTAAATGGCATTGTAATAGTACTGAA
CCCAGATGTTTATACAAAAAATAAA
CAACAGATAGTCATTTTTACCTTCTGGACATTTGCCAACTACTTAAATATGTGGAT
TACCACCTGCCTTAATGTCTTCTA
TTTTCTGAAGATAGCCAGTTCCTCTCATCCACTTTTTCTCTGGCTGAAGTGGAAAA
TTGATATGGTGGTGCCTGGATCC
TGCTGGGATGCTTTGCCATTTCTTGTGGTCAGCCTTATAGCAGCAATAGTACTG
AGTTGTGATTATAGGTTTTCATGCA
ATTGCCAAACATAAAAGAAACATTACTGAAATGTTCCATGTGAGTAAAATACCAT
ACTTTGAACCCTTaACTCTCTTTAA
CCTGTTTGCAATTGTCCCATTTATTGTGTCACTGATATCATTTTTCCTTTTAGTAAG
ATCTTTATGGAGACATACCAAGC
AAATAAAACTCTATGCTACCGGCAGTAGAGACCCCAGCACAGAAGTTCATGTGA
GAGCCATTAAAACTATGACTTCATTT
ATCTTCTTTTTTTTCCTATACTATATTTCTTCTATTTTGATGACCTTTAGCTATCTTA
TGACAAAATACAAGTTAGCTGT
GGAGTTTGGAGAGATTGCAGCAATTCTCTACCCCTTGGGTCACTCACTTATTTTAA
TTGTTTTAAATAATAAACTGAGGC
AGACATTTGTCAGAATGCTGACATGTAGAAAAATTGCCTGCATGATATGA

Proteină-(SEQ ID NO:4)

MFSPADNIFILITGEFILGILNGYIALVNWIDWIKKKKISTVDYILTNLVIARICLISVM
VVNGIVIVLNPDVYTKNK
QQIVFTFWTFANYLNMWITTCLNVFYFLKIASSSHPLFLWLKWKIDMVVHWILLGCF
AISLLVSLIAAIVLSCDYRFHA
IAKHKRNITEMFHVSKIPYFEPLTLFNLFAIVPFIVSLISFFLLVRSLWRHTKQIKLYATG
SRDPSTEVHVRAIKTMTSF
IFFFFLYYISSILMTFSYLMTKYKLAVEFGEIAAILYPLGHSLILIVLNNKLRQTFVRML
TCRKIACMI

[00638] Secvențele hT2R14:

355

ADN-(SEQ ID NO:5)

ATGGGTGGTGTCTATAAAGAGCATATTTACATTCGTTTTAATTGTGGAATTTATAAT
TGGAATTTAGGAAATAGTTTCAT
AGCACTGGTGAAGTGTATTGACTGGGTCAAGGGAAGAAAGATCTCTTCGGTTGAT
CGGATCCTCACTGCTTTGGCAATCT
CTCGAATTAGCCTGGTTTGGTTAATATTCGGAAGCTGGTGTGTGTCTGTGTTTTTC
CCAGCTTTATTTGCCACTGAAAAA
ATGTTTCAGAATGCTTACTAATATCTGGACAGTGATCAATCATTTTAGTGTCTGGTT
AGCTACAGGCCTCGGTACTTTTTA
TTTTCTCAAGATAGCCAATTTTTCTAACTCTATTTTTCTCTACCTAAAGTGGAGaGT
TAAAAAGGTGGTTTTGGTGCTGC
TTCTTGACTTCGGTCTTCTTGTTTTTAAATATTGCACTGATAAACATCCATATA
AATGCCAGTATCAATGGATACAGA
AGAAACAAGACTTGCAGTTCTGATTCAAGTAACTTTACACGATTTTCCAGTCTTAT
TGTATTAACCAGCACTGTGTTTCAT
TTTCATACCCTTTACTTTGTCCCTGGCAATGTTTCTTCTCCTCATCTTCTCCATGTG
GAAACATCGCAAGAAGATGCAGC
ACACTGTCAAAATATCCGGAGACGCCAGCACCAAAGCCACAGAGGAGTTAAAA
GTGTGATCACTTTCTTCTACTCTAT
GCCATTTTCTCTCTGTCTTTTTTCATATCAGTTTGGACCTCTGAAAGGTTGGAGGA
AAATCTAATTATTCTTTCCCAGGT
GATGGGAATGGCTTATCCTTCATGTCACTCATGTGTTCTGATTCTTGAAACAAGA
AGCTGAGACAGGCCTCTCTGTCAG
TGCTACTGTGGCTGAGGTACATGTTCAAAGATGGGGAGCCCTCAGGTCACAAAGA
ATTTAGAGAATCATCTTGA

Protein-(SEQ ID NO:6)

MGGVIKSIFTFVLIVEFIIGNLGNSFIALVNCIDWVKGRKISSVDRILTALAI SRISLVWLI
FGSWCVSVFFPALFATEK
MFRMLTNIWTVINHFSVWLATGLGTFYFLKIANFSNSIFLYLKWRVKKVVLVLLLV
TVFLFLNIALINIHINASINGYR
RNKTCSSDSSNFTRFSSLIVLTSTVFIFIPFTLSLAMFLLIFSMWKHRKKMQHTVKISG
DASTKAHRGVKSVITFFLLY

356

AIFSLSFFISVWTSERLEENLIILSQVMGMAYPSCHSCVLILGNKKLRQASLSVLLWLR
YMFKDGEPSGHKEFRESS

[00639] Deși descrierea detaliată de mai sus a descris mai multe forme de realizare ale prezentei invenții, să înțelege că descrierea de mai sus este doar ilustrativă și nu limitează invenția dezvăluită. Invenția va fi limitată numai de revendicările care urmează.

REVENDICĂRI

1. Analiză pentru identificarea unui compus care modulează în mod prezumptiv gustul amar asociat cafelei și/sau alimentelor, băuturilor și/sau medicamentelor cu aromă de cafea care cuprinde efectuarea unei analize care examinează un compus care modulează un receptor de gust amar T2R uman selectat dintre hT2R8 și/sau hT2R14 sau care modulează activarea hT2R8 și/sau hT2R14 umani menționați prin alt compus amar sau compoziție care conține compusul amar menționat.
2. Analiza din revendicarea 1, în care compusul amar este conținut într-un extras derivat din cafea.
3. Analiza din revendicarea 1, în care receptorul are o secvență polipeptidică în proporție de cel puțin 90% identică cu polipeptida hT2R8 din SEQ ID NO: 4 sau este codificată de o secvență de acid nucleic care se hibridizează la secvența de acid nucleic din SEQ ID NO: 3 în condiții stricte de hibridizare.
4. Analiza din revendicarea 1, în care receptorul are o secvență polipeptidică în proporție de cel puțin 90% identică cu polipeptida hT2R14 din SEQ ID No: 6 sau este codificată de o secvență de acid nucleic care hibridizează în condiții stricte de hibridizare la secvența de acid nucleic din SEQ ID NO: 5 în condiții stricte de hibridizare.
5. Analiza din revendicarea 1, 2, sau 3 în care eficacitatea blocării gustului amar al compusului identificat este confirmată printr-un test de gust.
6. Analiza din revendicarea 5 în care testul de gust confirmă dacă compusul identificat blochează sau inhibă gustul amar provocat de un compus derivat din cafea sau o compoziție care conține compusul.
7. Analiza din revendicarea 6 în care cafeaua cuprinde cafea instant, cafea măcinată, cafea preparată sau un compus sau un extras derivat din aceasta.

8. Analiza din revendicarea 1 în care receptorul de gust menționat este exprimat pe o membrană celulară.
9. Analiza din revendicarea 1 în care receptorul de gust menționat este exprimat pe o membrană celulară izolată.
10. Analiza din revendicarea 1 în care receptorul de gust menționat este exprimat pe o celulă intactă.
11. Analiza din revendicarea 1 în care receptorul de gust menționat este exprimat pe o celulă eucariotă.
12. Analiza din revendicarea 1 în care receptorul de gust menționat este exprimat pe o celulă de amfibian, mamifer sau insectă.
13. Analiza din revendicarea 1 în care receptorul de gust menționat este exprimat pe o celulă selectată dintre HEK293, BHK, COS, HEK293T, CHO și ovocitul de *Xenopus*.
14. Analiza din revendicarea 1 care este o analiză fluorimetrică.
15. Analiza din revendicarea 1 care este o analiză de legare.
16. Analiza din revendicarea 1 care detectează efectul asupra compusului menționat prin testarea efectului său asupra unei concentrații de ioni intracelulari.
17. Analiza din revendicarea 1 care detectează efectul compusului menționat asupra sodiului sau calciului intracelular.
18. Analiza din revendicarea 1 care detectează efectul compusului menționat asupra potențialului de membrană celulară.
19. Analiza din revendicarea 1 care detectează efectul compusului menționat asupra

transcrierii genei reporter.

20. Analiza din revendicarea 1 în care compusul menționat este selectat pe baza capacității sale de a bloca interacțiunea receptorului de gust menționat cu unul din liganzii pentru gust amar menționați.

21. Analiza din revendicarea 1 care detectează efectul compusului menționat asupra cAMP, cGMP sau IP3 intracelulari.

22. Analiza din revendicarea 1 în care receptorul de gust menționat cuprinde domeniul extracelular sau regiunea transmembranară a receptorului de gust menționat.

23. Analiza din revendicarea 1 în care analiza menționată detectează modificări ale calciului folosind un colorant fluorescent specific calciului.

24. Analiza din revendicarea 1 în care analiza menționată detectează modificări ale calciului intracelular folosind un colorant selectat dintre Fluo-3, Fluo-4 și Fura-2.

25. Analiza din revendicarea 1 în care receptorul de gust menționat este în soluție.

26. Analiza din revendicarea 1 care este o analiză de legare care detectează modificări ale caracteristicilor spectroscopice, ale caracteristicilor hidrodinamice sau ale solubilității.

27. Analiza din revendicarea 1 care detectează efectul compusului menționat asupra complexării receptorului de gust menționat cu o proteină G.

28. Analiza din revendicarea 1 care detectează efectul compusului menționat asupra complexării receptorului de gust menționat cu o proteină G selectată dintre transducin, gustducin, $G_{\alpha 15}$, $G_{\alpha 16}$, sau o himeră a acestora.

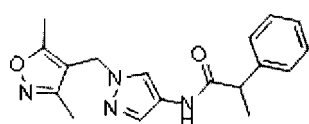
29. Analiza din revendicarea 1 care este o analiză de polarizare a fluorescenței.

30. Analiza din revendicarea 1 în care receptorul de gust menționat este atașat la un substrat în fază solidă.

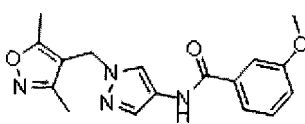
31. Analiza din revendicarea 1 care este o analiză cu grad ridicat de procesare.

32. Analiza din revendicarea 1 în care receptorul de gust este exprimat printr-o celulă HEK293.

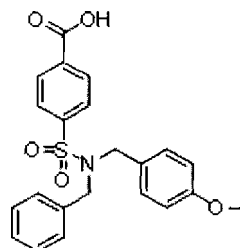
33. Compus selectat dintre compușii având structurile de mai jos:



Compusul A
 $IC_{50}=0.3 \mu M (hT2R08)$

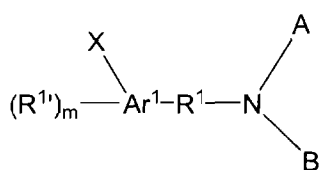


Compusul B
 $IC_{50}=0.4 \mu M (hT2R08)$



Compusul C
 $IC_{50}=0.2 \mu M (hT2R14)$

34. Compus cu formula structurală (I) de mai jos :



(I)

sau o sare, hidrat, solvat sau N-oxid al acestuia în care:

Ar^1 este un ciclu aril, heteroaril sau cicloalchil cu cinci sau șase atomi;

m este 0, 1, 2 sau 3;

R^1 este SO_2 ; $C=O$; $C=S$; sau $C=NOR^4$;

X este selectat din grupul constând din hidrogen, halogen, alchil, alchil substituit, aril, aril substituit, arilalchil, arilalchil substituit, acil, acil substituit, heteroalchil, heteroalchil substituit, heteroaril, heteroaril substituit, heteroarilalchil, heteroarilalchil substituit, CN , NO_2 , OR^6 , $S(O)_bR^6$, NR^6R^7 , $CONR^6R^7$, CO_2R^6 ,

$\text{NR}^6\text{CO}_2\text{R}^7$, $\text{NR}^6\text{CONR}^7\text{R}^8$, $\text{NR}^6\text{CSNR}^7\text{R}^8$, $\text{NR}^6\text{C}(=\text{NH})\text{NR}^7\text{R}^8$, $\text{SO}_2\text{NR}^5\text{R}^6$, $\text{NR}^5\text{SO}_2\text{R}^6$, $\text{NR}^5\text{SO}_2\text{NR}^6\text{R}^7$, $\text{B}(\text{OR}^5)(\text{OR}^6)$, $\text{P}(\text{O})(\text{OR}^5)(\text{OR}^6)$ și $\text{P}(\text{O})(\text{R}^5)(\text{OR}^6)$;

fiecare $\text{R}^{1'}$ este selectat în mod independent din grupul constând din hidrogen, halogen, alchil, alchil substituit, aril, aril substituit, arilalchil, arilalchil substituit, acil, acil substituit, heteroalchil, heteroalchil substituit, heteroaril, heteroaril substituit, heteroarilalchil, heteroarilalchil substituit, CN , NO_2 , OR^6 , $\text{S}(\text{O})_b\text{R}^6$, NR^6R^7 , CONR^6R^7 , CO_2R^6 , $\text{NR}^6\text{CO}_2\text{R}^7$, $\text{NR}^6\text{CONR}^7\text{R}^8$, $\text{NR}^6\text{CSNR}^7\text{R}^8$, $\text{NR}^6\text{C}(=\text{NH})\text{NR}^7\text{R}^8$, $\text{SO}_2\text{NR}^5\text{R}^6$, $\text{NR}^5\text{SO}_2\text{R}^6$, $\text{NR}^5\text{SO}_2\text{NR}^6\text{R}^7$, $\text{B}(\text{OR}^5)(\text{OR}^6)$, $\text{P}(\text{O})(\text{OR}^5)(\text{OR}^6)$ și $\text{P}(\text{O})(\text{R}^5)(\text{OR}^6)$;

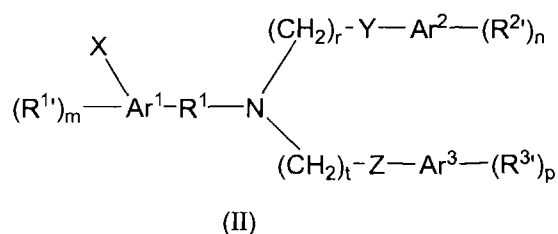
sau în mod alternativ, X și/sau cel puțin un $\text{R}^{1'}$ împreună cu atomii la care sunt legați formează un ciclu aril, aril substituit, heteroaril, heteroaril substituit, cicloalchil, cicloalchil substituit, cicloheteroalchil sau cicloheteroalchil substituit în care ciclul este condensat opțional cu un alt ciclu aril, aril substituit, heteroaril, heteroaril substituit, cicloalchil, cicloalchil substituit, cicloheteroalchil sau cicloheteroalchil substituit;

$\text{R}^4\text{-R}^8$ sunt selectați în mod independent din grupul constând din hidrogen, alchil, alchil substituit, aril, aril substituit, arilalchil, arilalchil substituit, heteroalchil, heteroalchil substituit, heteroaril, heteroaril substituit, heteroarilalchil și heteroarilalchil substituit sau în mod alternativ, R^5 și R^6 , R^6 și R^7 , R^7 și R^8 , împreună cu atomii de care sunt legați formează un ciclu cicloheteroalchil sau cicloheteroalchil substituit;

A și B sunt selectați în mod independent din grupul constând din hidrogen, alchil, alchil substituit, aril, aril substituit, arilalchil, arilalchil substituit, acil, acil substituit, heteroalchil, heteroalchil substituit, heteroaril, heteroaril substituit, heteroarilalchil, heteroarilalchil substituit; și

b este 0, 1, sau 2.

35. Compus cu formula structurală (II) prezentată mai jos:



sau o sare, hidrat, solvat sau N-oxid al acestuia în care:

Ar^1 , Ar^2 și Ar^3 sunt în mod independent un ciclu aril, heteroaril sau cicloalchil cu cinci sau șase atomi;

m este 0, 1, 2 sau 3;

n și p sunt în mod independent 0, 1, 2, 3 sau 4;

r și t sunt în mod independent 0, 1 sau 2;

Y și Z sunt selectați în mod independent din grupul constând din CR^6R^7 , $C=O$, $C=S$, $C=NOR^6$, O , NR^6 și $S(O)_b$;

R^1 este selectat din grupul constând din SO_2 , $C=O$, $C=S$ și $C=NOR^4$;

X este selectat din grupul constând din hidrogen, alchil, alchil substituit, aril, aril substituit, arilalchil, arilalchil substituit, acil, acil substituit, heteroalchil, heteroalchil substituit, heteroaril, heteroaril substituit, heteroarilalchil, heteroarilalchil substituit, CN , NO_2 , $-OR^6$, $S(O)_bR^6$, NR^6R^7 , $CONR^6R^7$, CO_2R^6 , $NR^6CO_2R^7$, $NR^6CONR^7R^8$, $NR^6CSNR^7R^8$, $NR^6C(=NH)NR^7R^8$, $SO_2NR^5R^6$, $NR^5SO_2R^6$, $NR^5SO_2NR^6R^7$, $B(OR^5)(OR^6)$, $P(O)(OR^5)(OR^6)$ și $P(O)(R^5)(OR^6)$;

fiecare $R^{1'}$ este selectat în mod independent din grupul constând din hidrogen, halogen, alchil, alchil substituit, aril, aril substituit, arilalchil, arilalchil substituit, acil, acil substituit, heteroalchil, heteroalchil substituit, heteroaril, heteroaril substituit, heteroarilalchil, heteroarilalchil substituit, CN , NO_2 , OR^6 , $S(O)_bR^6$, NR^6R^7 , $CONR^6R^7$, CO_2R^6 , $NR^6CO_2R^7$, $NR^6CONR^7R^8$, $NR^6CSNR^7R^8$, $NR^6C(=NH)NR^7R^8$, $SO_2NR^5R^6$, $NR^5SO_2R^6$, $NR^5SO_2NR^6R^7$, $B(OR^5)(OR^6)$, $P(O)(OR^5)(OR^6)$ și $P(O)(R^5)(OR^6)$;

fiecare $R^{2'}$ este selectat în mod independent din grupul constând din hidrogen, halogen, alchil, alchil substituit, aril, aril substituit, arilalchil, arilalchil substituit, acil, acil substituit, heteroalchil, heteroalchil substituit, heteroaril, heteroaril substituit, heteroarilalchil, heteroarilalchil substituit, CN , NO_2 , OR^6 , $S(O)_bR^6$, NR^6R^7 , $CONR^6R^7$, CO_2R^6 , $NR^6CO_2R^7$, $NR^6CONR^7R^8$, $NR^6CSNR^7R^8$, $NR^6C(=NH)NR^7R^8$, $SO_2NR^5R^6$, $NR^5SO_2R^6$, $NR^5SO_2NR^6R^7$, $B(OR^5)(OR^6)$ și $P(O)(OR^5)(OR^6)$;

fiecare $R^{3'}$ este selectat în mod independent din grupul constând din hidrogen, halogen, alchil, alchil substituit, aril, aril substituit, arilalchil, arilalchil substituit, acil, acil substituit, heteroalchil, heteroalchil substituit, heteroaril, heteroaril substituit, heteroarilalchil, heteroarilalchil substituit, CN , NO_2 , OR^6 , $S(O)_bR^6$, NR^6R^7 , $CONR^6R^7$, CO_2R^6 , $NR^6CO_2R^7$, $NR^6CONR^7R^8$, $NR^6CSNR^7R^8$, $NR^6C(=NH)NR^7R^8$, $SO_2NR^5R^6$, $NR^5SO_2R^6$, $NR^5SO_2NR^6R^7$, $B(OR^5)(OR^6)$, $P(O)(OR^5)(OR^6)$ și $P(O)(R^5)(OR^6)$;

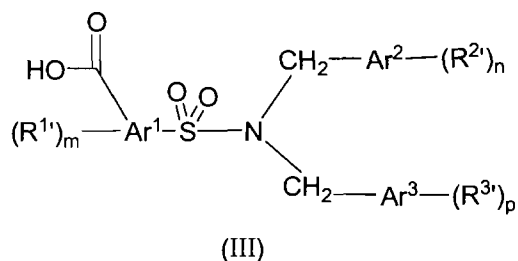
sau, în mod alternativ, X și/sau cel puțin unul dintre $R^{1'}$ împreună cu atomii la care sunt legați formează un ciclu aril, aril substituit, heteroaril, heteroaril substituit, cicloalchil, cicloalchil substituit, cicloheteroalchil sau cicloheteroalchil substituit în care ciclul este condensat opțional cu un alt ciclu aril, aril substituit, heteroaril, heteroaril substituit, cicloalchil, cicloalchil substituit, cicloheteroalchil sau cicloheteroalchil substituit;

R^4 - R^8 sunt în mod independent hidrogen, alchil, alchil substituit, aril, aril substituit, arilalchil, arilalchil substituit, heteroalchil, heteroalchil substituit, heteroaril, heteroaril substituit, heteroarilalchil sau heteroarilalchil substituit sau, în mod alternativ, R^5 și R^6 , R^6 și R^7 , R^7 și R^8 , împreună cu atomii de care sunt legați, formează un ciclu cicloheteroalchil sau cicloheteroalchil substituit;

b este 0, 1, sau 2.

36. Compusul din revendicarea 35, în care X este selectat din grupul constând din hidrogen, heteroalchil, heteroalchil substituit, heteroaril, heteroaril substituit, heteroarilalchil, heteroarilalchil substituit, CN, $S(O)_bR^6$, $CONR^6R^7$, $-CO_2R^6$, $SO_2NR^5R^6$, $NR^5SO_2R^6$, $NR^5SO_2NR^6R^7$, $B(OR^5)(OR^6)$, $P(O)(OR^5)(OR^6)$ și $P(O)(R^5)(OR^6)$.

37. Compus cu formula structurală (III) de mai jos :



sau o sare, hidrat, solvat sau N-oxid al acestuia în care:

Ar^1 , Ar^2 și Ar^3 sunt în mod independent un ciclu aril, heteroaril sau cicloalchil cu cinci sau șase atomi și Ar^2 și Ar^3 pot fi omiși în mod opțional;

m este 0, 1, 2 sau 3;

n și p sunt în mod independent 0, 1, 2, 3 sau 4;

fiecare $R^{1'}$ este selectat în mod independent din grupul constând din hidrogen, halogen, alchil, alchil substituit, aril, substituit aril, arilalchil, arilalchil substituit, acil,

acil substituit, heteroalchil, heteroalchil substituit, heteroaril, heteroaril substituit, heteroarilalchil, heteroarilalchil substituit, 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) și P(O)(R⁵)(OR⁶);

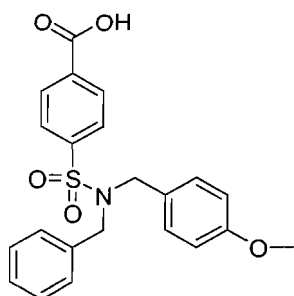
fiecare R²ⁱ este selectat în mod independent din grupul constând din hidrogen, halogen, alchil, alchil substituit, aril, aril substituit, arilalchil, arilalchil substituit, acil, acil substituit, heteroalchil, heteroalchil substituit, heteroaril, heteroaril substituit, heteroarilalchil, heteroarilalchil substituit, 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) și P(O)(R⁵)(OR⁶);

fiecare R³ⁱ este selectat în mod independent din grupul constând din hidrogen, halogen, alchil, alchil substituit, aril, aril substituit, arilalchil, arilalchil substituit, acil, acil substituit, heteroalchil, heteroalchil substituit, heteroaril, heteroaril substituit, heteroarilalchil, heteroarilalchil substituit, 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) și P(O)(R⁵)(OR⁶);

R⁵R⁸ sunt în mod independent hidrogen, alchil, alchil substituit, aril, substituit aril, arilalchil, arilalchil substituit, heteroalchil, heteroalchil substituit, heteroaril, heteroaril substituit, heteroarilalchil sau heteroarilalchil substituit sau, în mod alternativ, R⁵ și R⁶, R⁶ și R⁷, R⁷ și R⁸, împreună cu atomii de care sunt legați, formează un ciclu cicloheteroalchil sau substituit cicloheteroalchil;

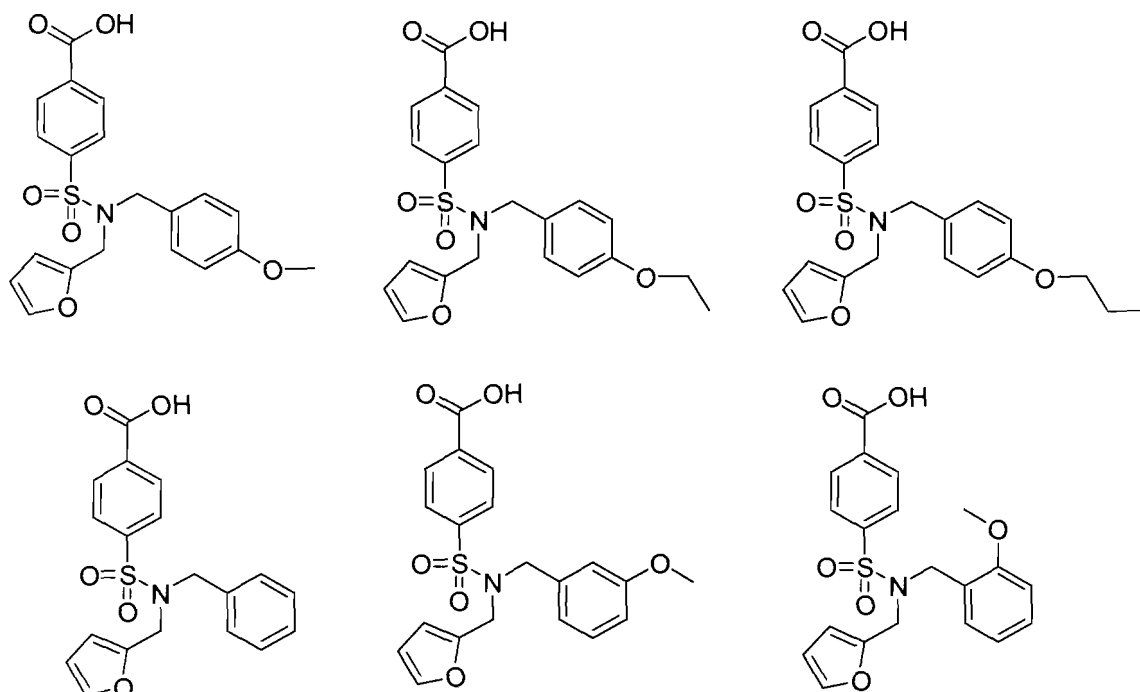
b este 0, 1, sau 2.

38. Compus având structura de mai jos:



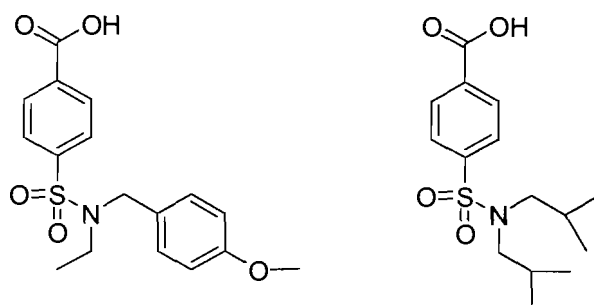
sau o sare, hidrat, solvat sau N-oxid al acestuia.

39. Compus având structura de mai jos:



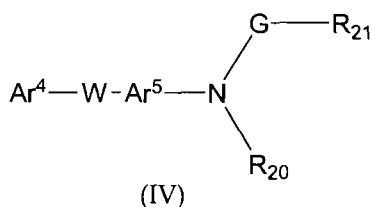
sau o sare, hidrat, solvat sau N-oxid al acestuia.

40. Compus având structura de mai jos:



sau o sare, hidrat, solvat sau N-oxid al acestuia.

41. Compus cu formula structurală (IV) de mai jos:



sau o sare, hidrat, solvat sau N-oxid al acestuia în care:

Ar^4 și Ar^5 sunt în mod independent un ciclu aril sau heteroaril cu cinci sau șase atomi;

W este selectat din grupul constând din CR^6R^7 , $\text{C}=\text{O}$, $\text{C}=\text{S}$; $\text{C}=\text{NOR}^6$; O, NR^6 , S, SO, SO_2 și $(\text{CH}_2)_n$;

n este 0, 1, 2, sau 3;

G este selectat din grupul constând din CR^6R^7 , $\text{C}=\text{O}$, $\text{C}=\text{S}$, $\text{C}=\text{NOR}^6$ și $\text{S}(\text{O})_b$;

R^{20} este selectat din grupul constând din hidrogen, arilalchenil, heteroarilalchenil, arilalchil, heteroarilalchil, aril, heteroaril, alchil, alcoxi-alchil, alchenil, cicloalchil, cicloalchenil și derivați substituiți;

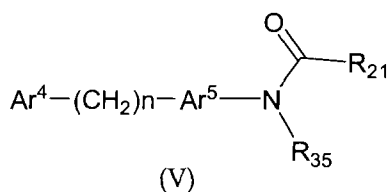
R^{21} este selectat din grupul constând dintr-un arilalchenil, heteroarilalchenil, arilalchil, heteroarilalchil, aril, heteroaril, alchil, alcoxi-alchil, alchenil, cicloalchil, cicloalchenil și derivați substituiți;

R^6 și R^7 sunt selectați în mod independent din grupul constând din hidrogen, alchil, alchil substituit, aril, aril substituit, arilalchil, arilalchil substituit, heteroalchil, heteroalchil substituit, heteroaril, heteroaril substituit, heteroarilalchil sau heteroarilalchil substituit sau, în mod alternativ, R^6 și R^7 , R^7 și R^8 , împreună cu atomii de care sunt legați, formează un ciclu cicloheteroalchil sau cicloheteroalchil substituit;

și

b este 0, 1, sau 2.

42. Compus cu formula structurală (V) de mai jos:



sau o sare, hidrat, solvat sau N-oxid al acestuia în care:

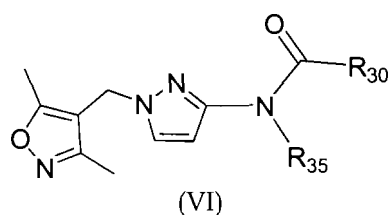
Ar^4 și Ar^5 sunt în mod independent un ciclu aril sau heteroaril cu cinci sau șase atomi;

n este 0, 1, 2, sau 3;

R^{21} este selectat din grupul constând dintr-un arilalchenil, heteroarilalchenil, arilalchil, hereoarilalchil, aril, heteroaril, alchil, alcoxi-alchil, alchenil, cicloalchil, cicloalchenil și derivați substituiți;

R^{35} este selectat din grupul constând din hidrogen, alchil și alchil substituit.

43. Compus cu formula structurală (VI) de mai jos:

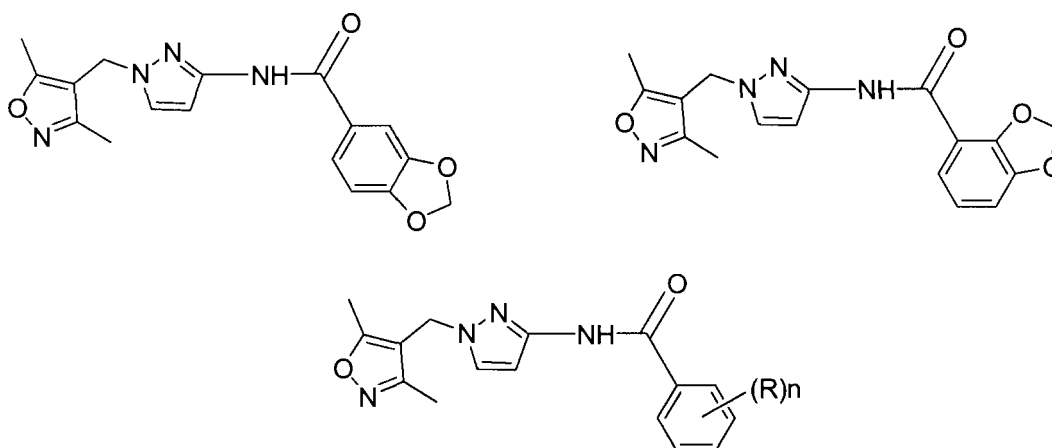


sau o sare, hidrat, solvat sau N-oxid al acestuia în care:

R^{30} este selectat din grupul constând dintr-un arilalchenil, heteroarilalchenil, arilalchil, hereoarilalchil, aril, heteroaril, alchil, alcoxi-alchil, alchenil, cicloalchil, cicloalchenil și derivați substituiți;

R^{35} este selectat din grupul constând din hidrogen, alchil și alchil substituit.

44. Compus având structura de mai jos:



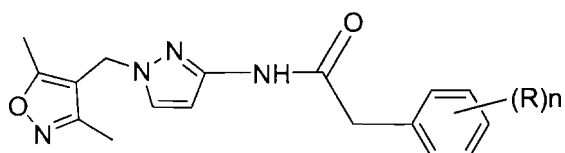
sau o sare, hidrat, solvat sau N-oxid al acestuia,

în care fiecare R este în mod independent Cl, MeO, CN, EtO, OH, Me, $-SO_2Me$, F, H și

n este 0,1,2,3 sau 4.

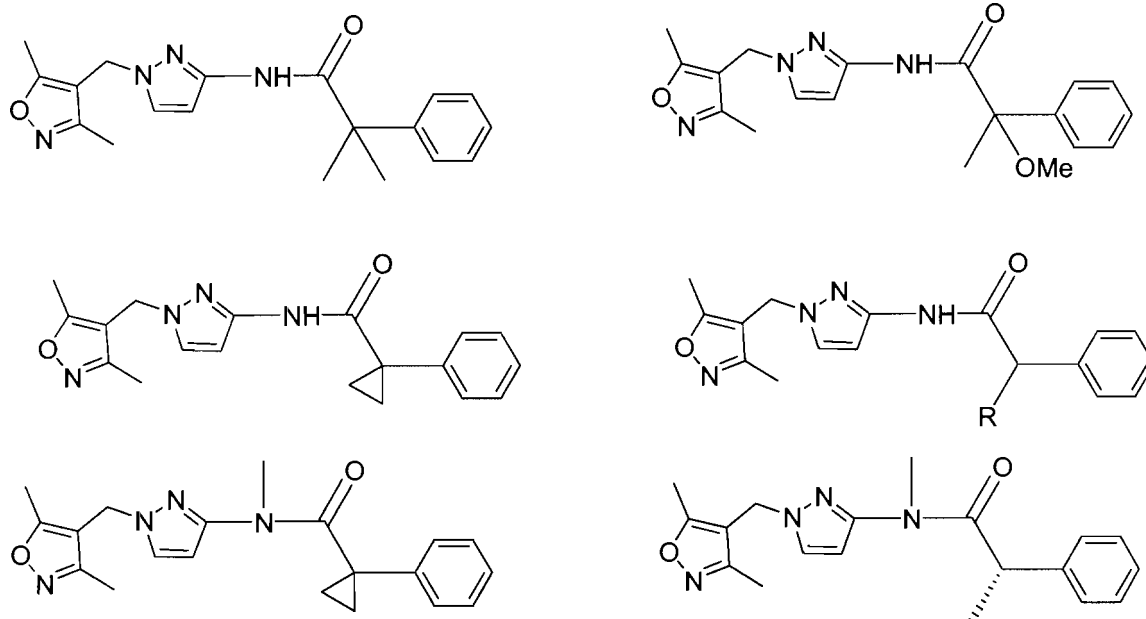
369

45. Compus având structura de mai jos:



sau o sare, hidrat, solvat sau N oxid al acestuia,
în care fiecare R este în mod independent MeO, OH și
n este 0,1,2,3 sau 4.

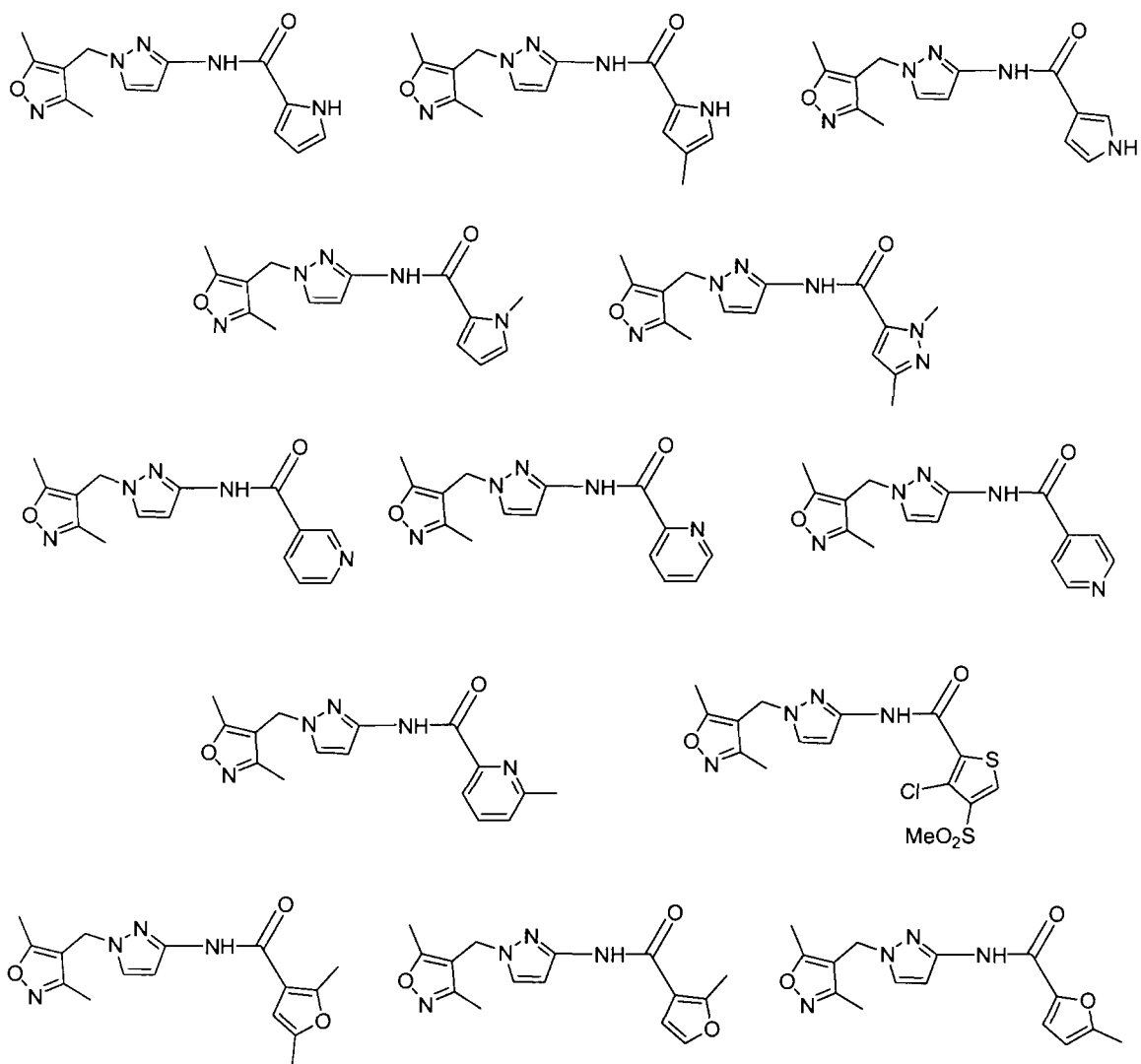
46. Compus având structura de mai jos:



sau o sare, hidrat, solvat sau N oxid al acestuia,
în care R este selectat din grupul constând din H, Me, Et, OCOMe, CH₂OH, OMe și
Ph.

47. Compus având structura de mai jos:

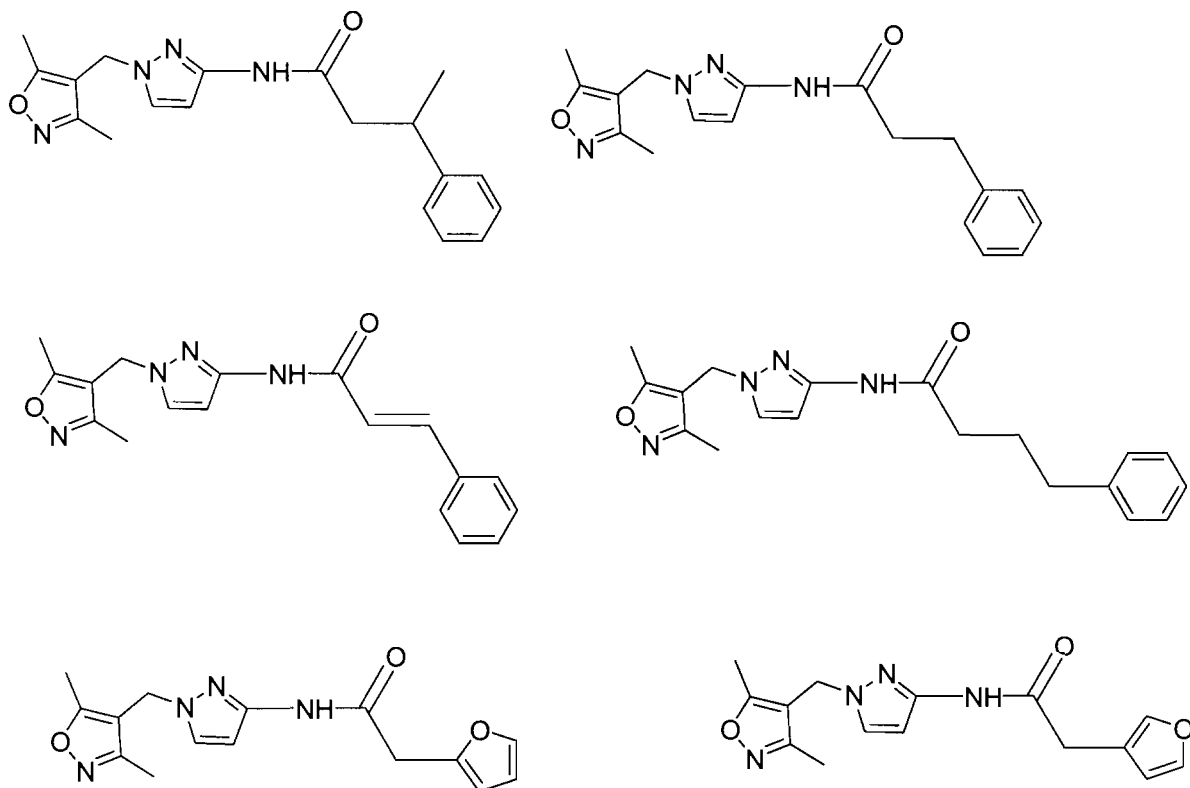
370



sau o sare, hidrat, solvat sau N oxid al acestuia.

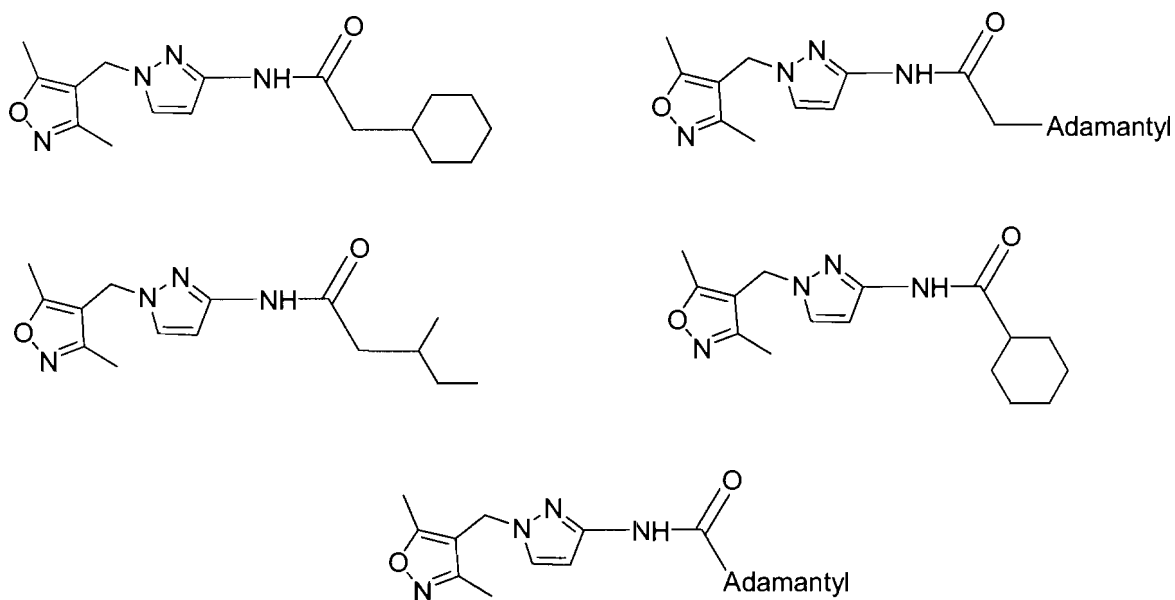
371

48. Compus având structura de mai jos:



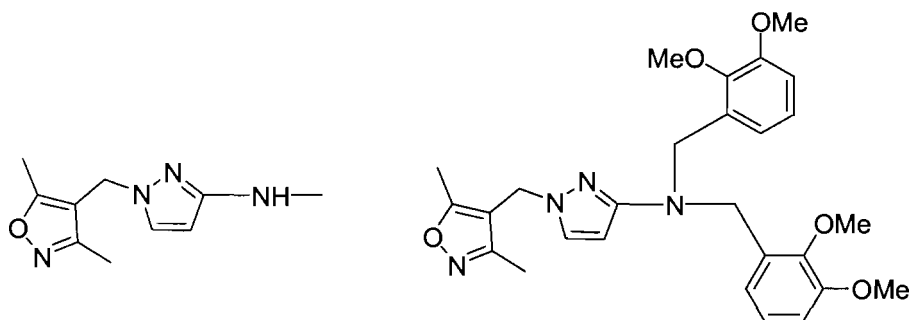
sau o sare, hidrat, solvat sau N oxid al acestuia.

49. Compus având structura de mai jos:



sau o sare, hidrat, solvat sau N oxid al acestuia.

50. Compus având structura de mai jos :



sau o sare, hidrat, solvat sau N oxid al acestuia.

51. Metodă de reducere sau atenuare a gustului amar, care cuprinde adăugarea compusului din revendicarea 34 sau a unui analog al acestuia la o compoziție pentru ingestia de către oameni sau animale, în care gustul amar trebuie să fie redus sau atenuat.

52. Metoda din revendicarea 51 în care compoziția este un aliment, o băutură sau un medicament.

53. Metoda din revendicarea 51, în care compoziția conține compuși amari care activează unul sau mai mulți dintre hT2R3, 7, 10, 14, 16, 44, 51, 55, 61, 63, 65, 71 și/sau hT2R5, 9, 13, 54, 67 și 75.

54. Metoda din revendicarea 51 în care compoziția conține cel puțin un compus amar care activează receptorii amari multipli sau care are o specificitate nedeterminată pentru receptorul de amar.

55. Metoda din revendicarea 51 în care compoziția conține salicină sau un derivat.

56. Metoda din revendicarea 51 în care compoziția conține omeprazol sau un derivat.

57. Metoda din revendicarea 51 în care compoziția conține rebaudiosida A sau un derivat.
58. Metoda din revendicarea 51 în care compoziția conține dextrometorfan.
59. Metoda din revendicarea 51 în care compoziția conține difenhidramină.
60. Metoda din revendicarea 51 în care compoziția este un aliment, o băutură sau un medicament pentru consumul uman.
61. Metodă de ameliorare a gustului amar asociat cu cafeaua sau cu un aliment, băutură sau medicament cu aromă de cafea care cuprinde adăugarea la acesta a cel puțin unui compus conform uneia dintre revendicările 33-50.
62. Metoda din revendicarea 61, în care cafeaua sau alimentul, băutura sau medicamentul cu aromă de cafea cuprinde cel puțin 2 compuși, dintre care cel puțin unul este un antagonist de hT2R8 și dintre care cel puțin unul este un antagonist de hT2R14.
63. Metoda din revendicarea 61 în care cafeaua este o cafea instant sau cafea preparată.
64. Cafea sau aliment sau băutură sau medicament cu aromă de cafea care cuprinde cel puțin un compus selectat dintre compușii conform uneia dintre revendicările 33-50.
65. Compoziția din revendicarea 64 în care compoziția cuprinde cel puțin 2 compuși, dintre care cel puțin unul este un antagonist de hT2R8 și dintre care cel puțin unul este un antagonist de hT2R14.
66. Compoziția din revendicarea 65, în care cafeaua este o cafea instant, cafea măcinată sau cafea preparată.

67. Compoziția din revendicarea 65 care este o cafea instant.
68. Compoziție de aliment sau băutură sau medicament care cuprinde cel puțin un compus selectat dintre compușii în conformitate cu una dintre revendicările 33-50
69. Compoziție de aliment sau băutură sau medicament care cuprinde un compus în conformitate cu revendicarea 34.
70. Alimentul, băutura sau medicamentul din revendicarea 68 care cuprinde cel puțin 2 compuși, dintre care cel puțin unul este un antagonist de hT2R8 și dintre care cel puțin unul este un antagonist de hT2R14.
71. Metodă pentru detectarea sau determinarea cantitativă a unui compus amar dintr-o compoziție, metoda menționată cuprinzând:
- aducerea în contact cu o compoziție care cuprinde un receptor de gust amar uman care este hT2R8, hT2R14, sau ambele și
- detectarea legării unui compus la receptorul menționat, în care legătura menționată indică faptul că compusul menționat contribuie la gustul amar al compoziției menționate.
72. Metoda din revendicarea 71, în care gradul de legare este indicativul concentrației compusului menționat în compoziția menționată.
73. Metodă de analiză pentru a detecta sau determina cantitativ dacă gustul amar al unui compus amar dintr-o compoziție este blocat de către compusul antagonist din revendicarea 34, metoda menționată cuprinzând:
- aducerea în contact cu o compoziție care conține cel puțin un compus amar care activează cel puțin un receptor de gust amar uman selectat din grupul constând din hT23, 7, 10, 14, 16, 44, 51, 55, 61, 63, 64, 65 sau 71 și/sau hT2R5, 9, 13, 54, 67 și 75 și

detectarea dacă activarea cel puțin a unui receptor menționat este blocată sau inhibată de compusul din revendicarea 38, în care blocarea sau inhibarea menționată ameliorează gustul amar al cel puțin unui compus amar.

74. Analiza din revendicarea 73 care mai cuprinde un test de gust în care compusul amar și compusul antagonist menționat sunt testate prin gustare separat și în combinație, pentru a confirma faptul că gustul amar este atenuat de către antagonist.

75. Analiza din revendicarea 73, în care receptorul de gust menționat este exprimat pe o membrană celulară.

76. Analiza din revendicarea 73 în care receptorul de gust menționat este exprimat pe o membrană celulară izolată.

77. Analiza din revendicarea 73 în care receptorul de gust menționat este exprimat pe o celulă intactă.

78. Analiza din revendicarea 73 în care receptorul de gust menționat este exprimat pe o celulă eucariotă.

79. Analiza din revendicarea 73 în care receptorul de gust menționat este exprimat de către o celulă de amfibian, mamifer sau insectă.

80. Analiza din revendicarea 73 în care receptorul de gust menționat este exprimat pe o celulă selectată dintre HEK293, BHK, COS, HEK293T, CHO și ovocitul de *Xenopus*.

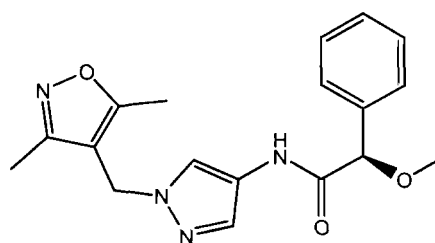
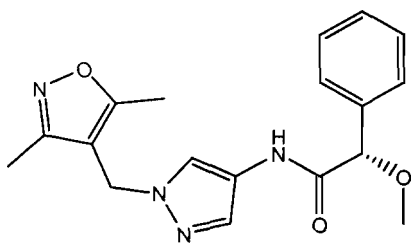
81. Analiza din revendicarea 73 care este o analiză fluorimetrică.

82. Analiza din revendicarea 73 care este o analiză de legare.

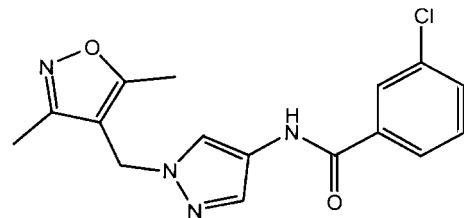
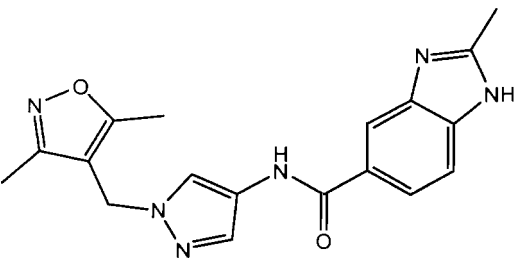
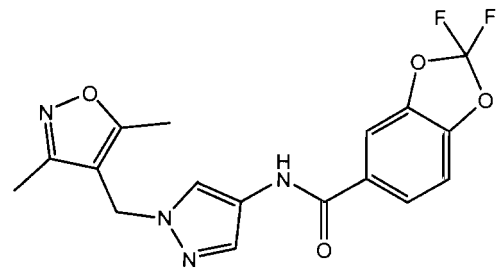
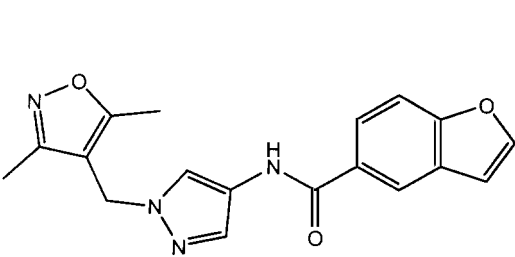
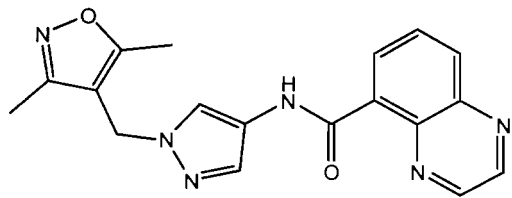
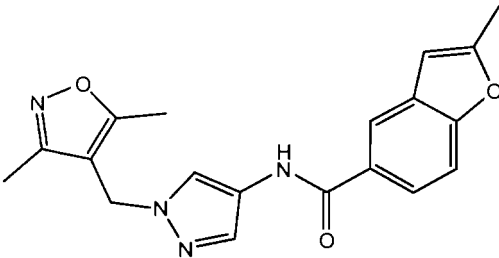
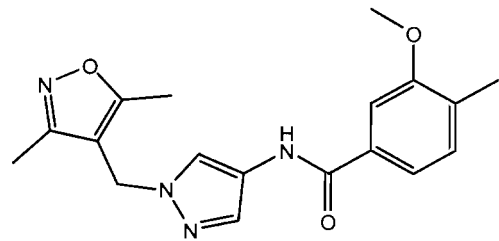
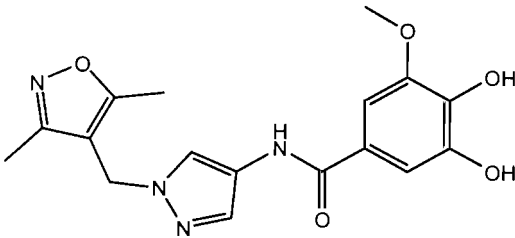
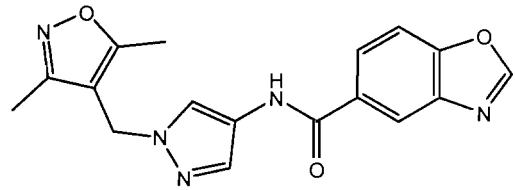
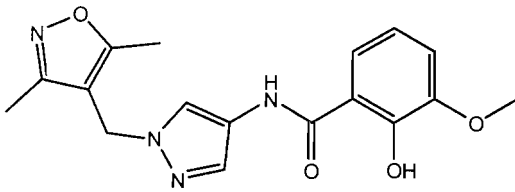
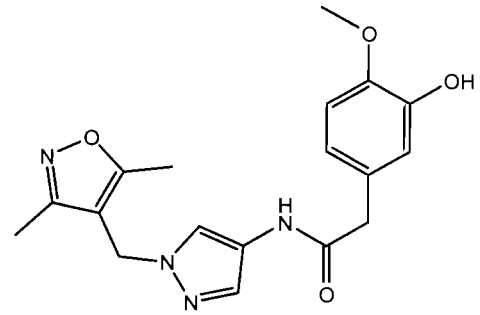
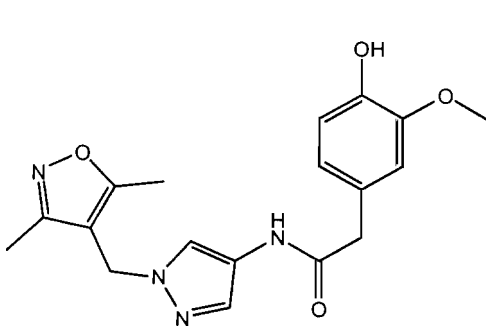
83. Analiza din revendicarea 73 care detectează efectul compusului menționat prin analizarea efectului său asupra unei concentrații de ioni intracelulari.

84. Analiza din revendicarea 73 care detectează efectul compusului menționat asupra sodiului sau calciului intracelular.
85. Analiza din revendicarea 73 care detectează efectul compusului menționat asupra potențialului de membrană celulară.
86. Analiza din revendicarea 73, care detectează efectul compusului menționat asupra transcrierii unei gene reporter.
87. Analiza din revendicarea 73, în care compusul menționat este selectat pe baza capacității sale de a bloca interacțiunea receptorului de gust menționat cu unul dintre liganzii amari menționați.
88. Analiza din revendicarea 73 care detectează efectul compusului menționat asupra cAMP, cGMP sau IP3 intracelular.
89. Analiza din revendicarea 73 în care receptorul de gust menționat cuprinde domeniul extracelular sau regiunea transmembranară a receptorului de gust menționat.
90. Analiza din revendicarea 73 în care analiza menționată detectează modificările calciului folosind un colorant fluorescent specific calciului.
91. Analiza din revendicarea 90 în care colorantul menționat este Fluo-3, Fluo-4, Fura-2 sau amestecuri ale acestora.
92. Analiza din revendicarea 73 în care receptorul de gust menționat este în soluție.
93. Analiza din revendicarea 73 care este un test de legare care detectează modificările caracteristicilor spectroscopice, ale caracteristicilor hidrodinamice sau ale solubilității receptorului.

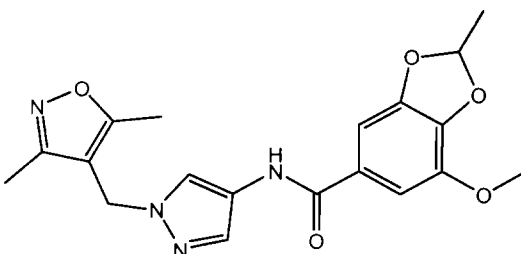
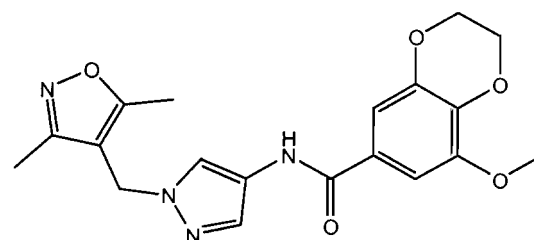
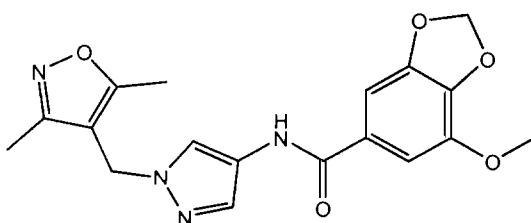
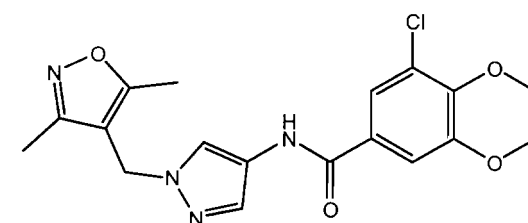
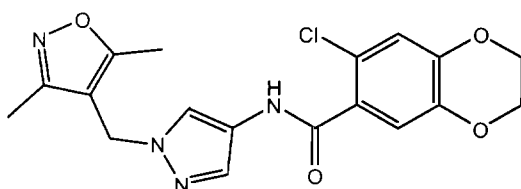
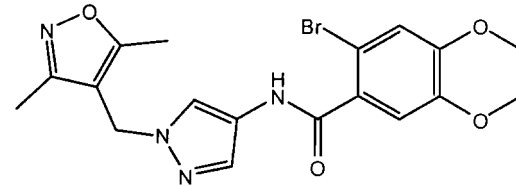
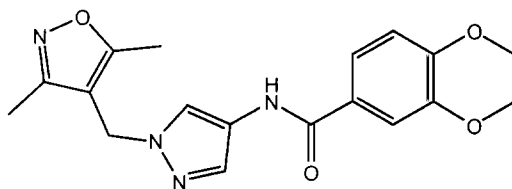
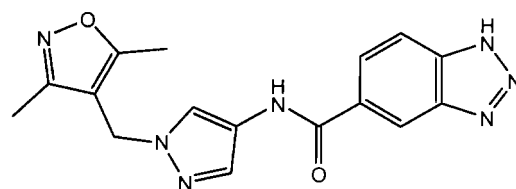
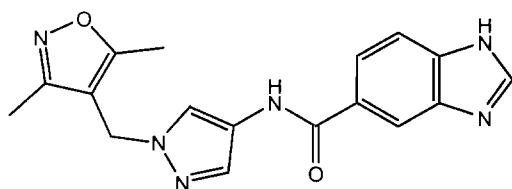
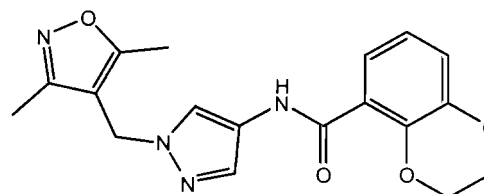
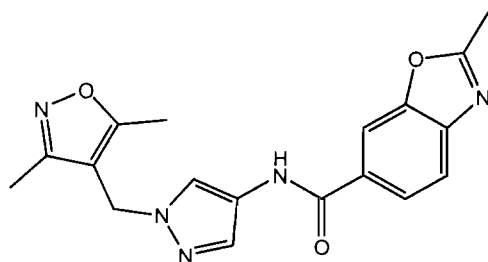
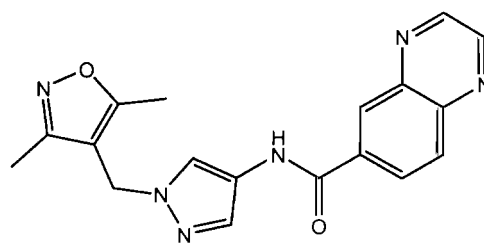
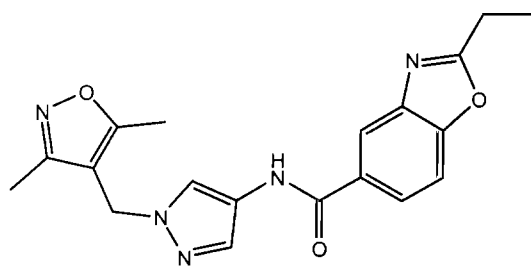
94. Analiza din revendicarea 73 care detectează efectul compusului menționat asupra complexării receptorului de gust menționat cu o proteină G.
95. Analiza din revendicarea 94 în care proteina G menționată este transducin, gustducin, $G_{\alpha 15}$, $G_{\alpha 16}$ sau o himeră a acestora.
96. Analiza din revendicarea 73 care este o analiză de polarizare a fluorescenței.
97. Analiza din revendicarea 73 în care receptorul de gust menționat este atașat la un substrat în fază solidă.
98. Analiza din revendicarea 73 care este o analiză cu grad ridicat de procesare.
99. Analiza din revendicarea 73 în care receptorului de gust este exprimat printr-o celulă HEK293.
100. Metodă de identificare a unui motiv de legare conservat prezent în diferite T2R umane care cuprinde expunerea membranei celulare a unei celule la compusul din revendicarea 38.
101. Un GPCR himeră proiectat să conțină motivul identificat din revendicarea 75.
102. Compus cu formula:

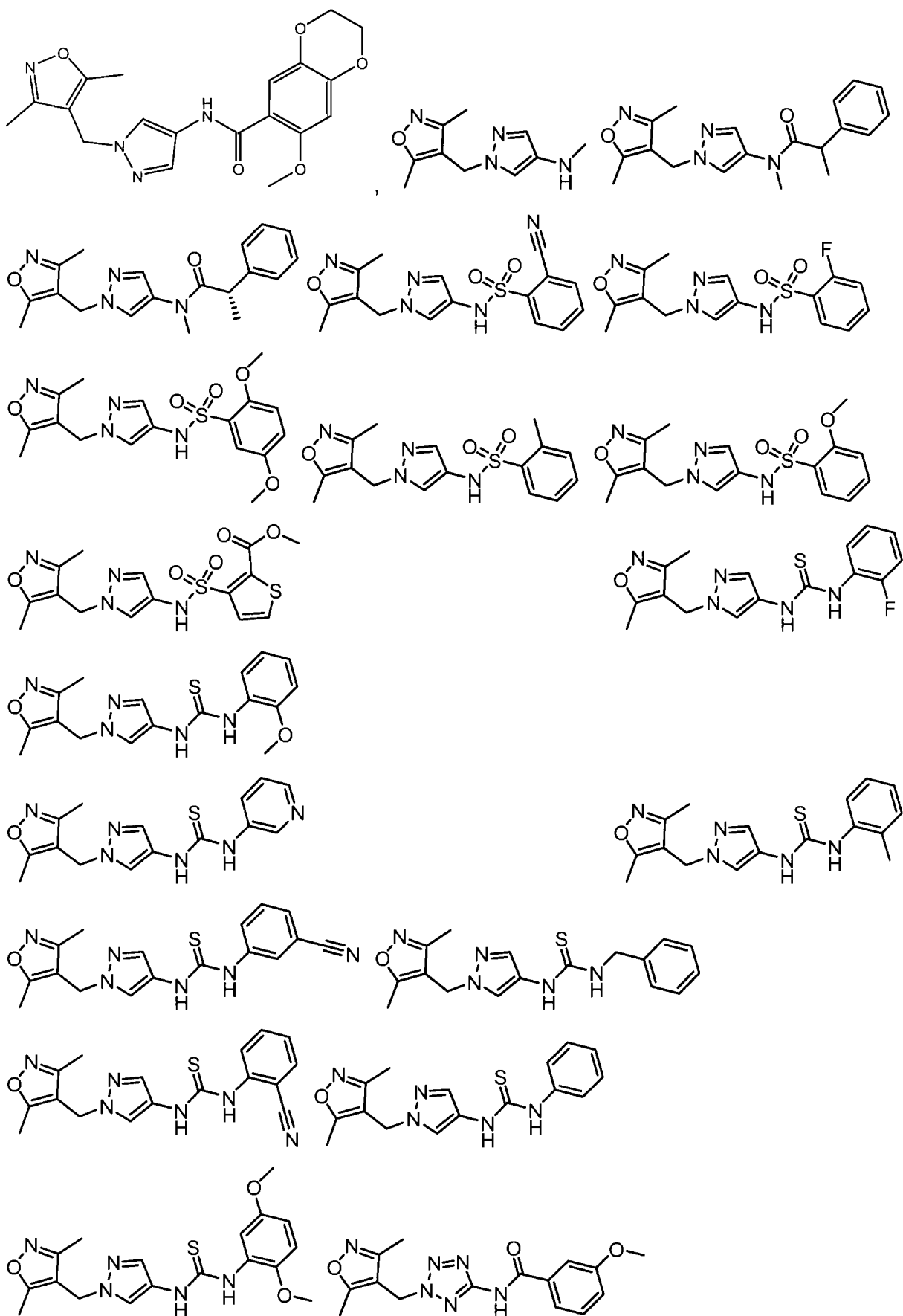


378

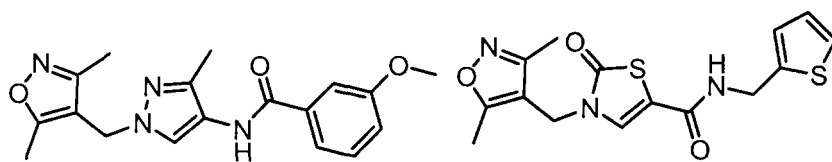


379



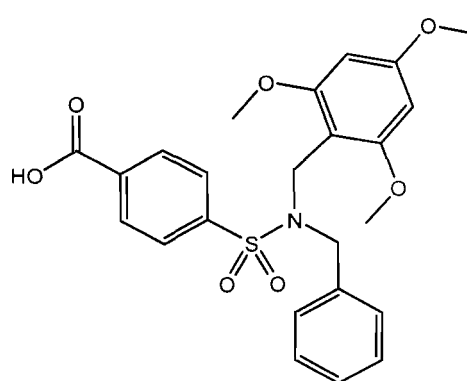
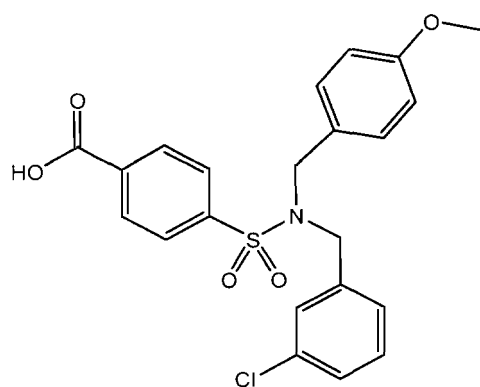
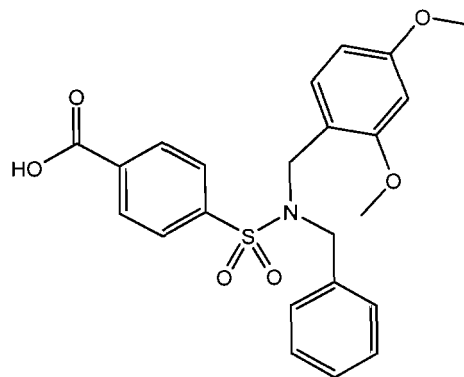
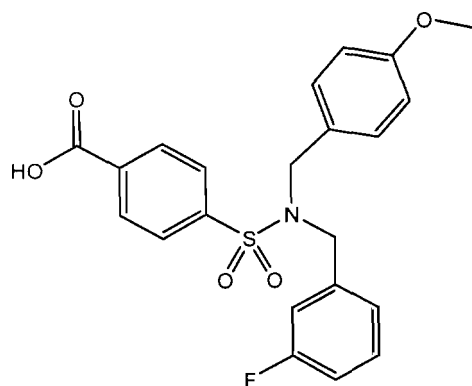
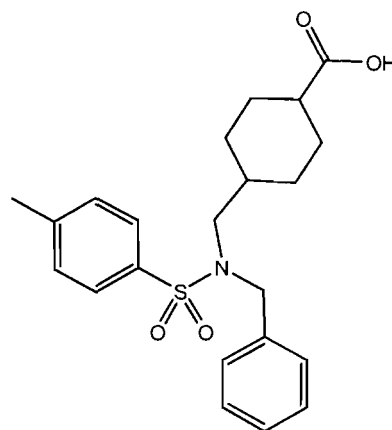
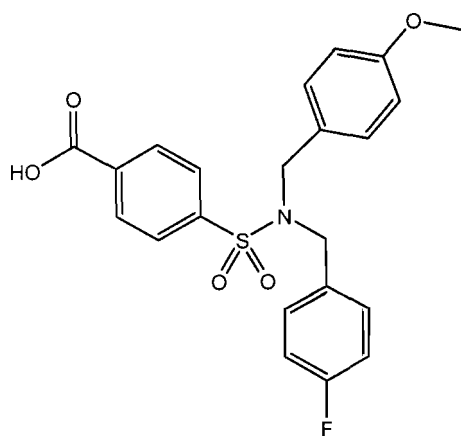


381



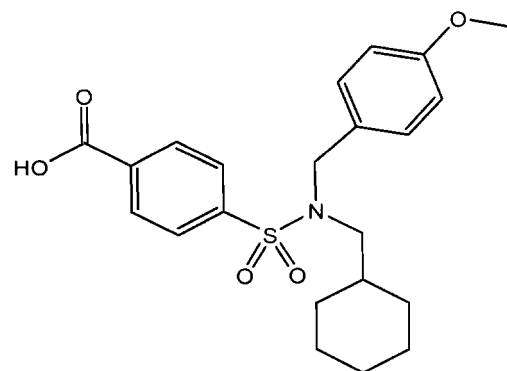
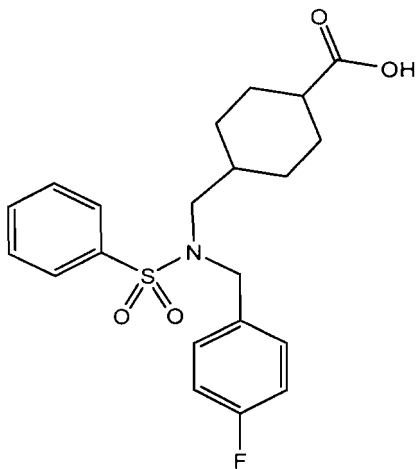
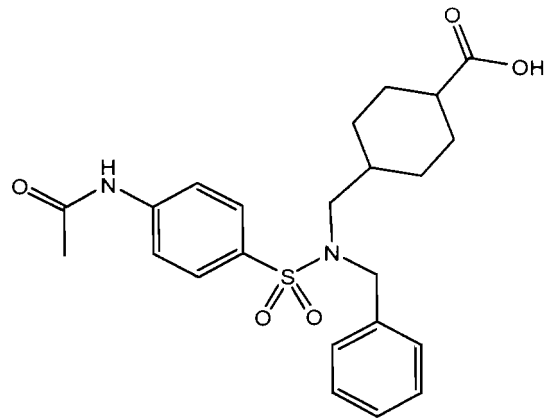
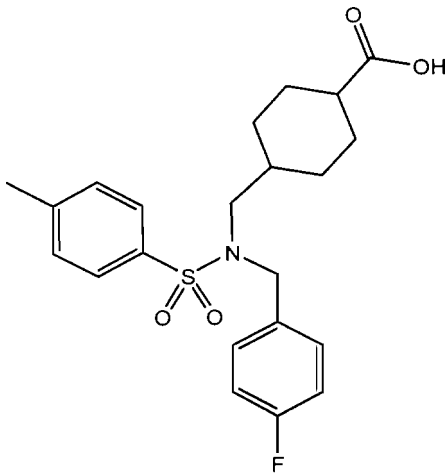
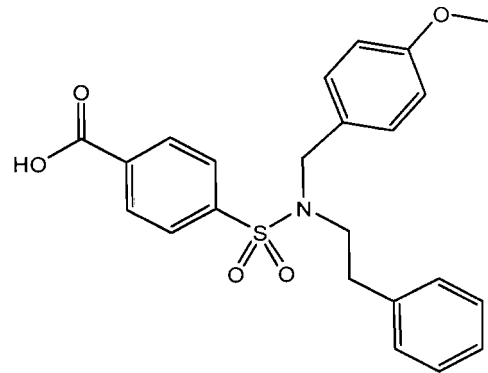
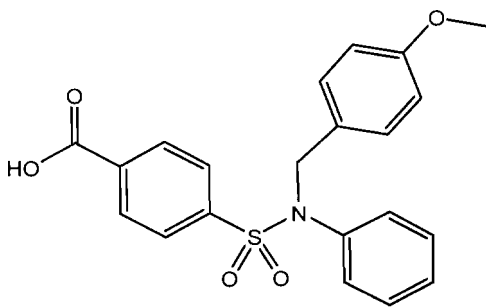
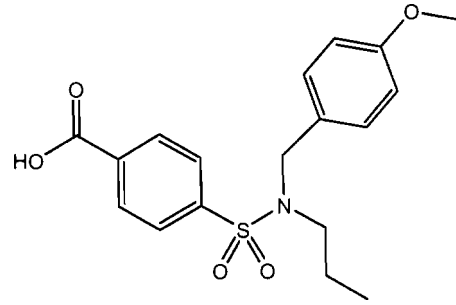
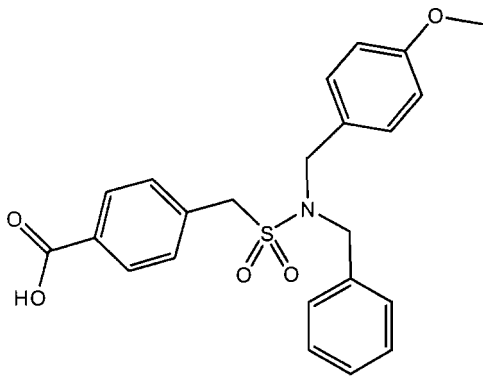
sau o sare, hidrat, solvat sau N-oxid al acestuia.

103. Compus cu formula:



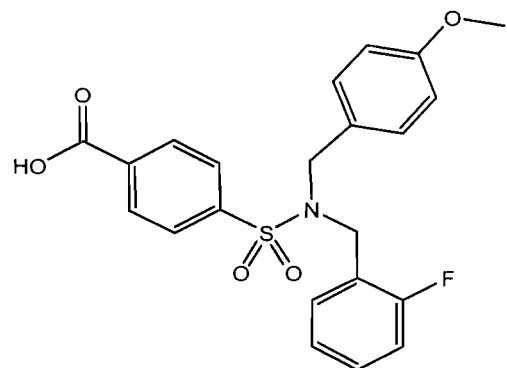
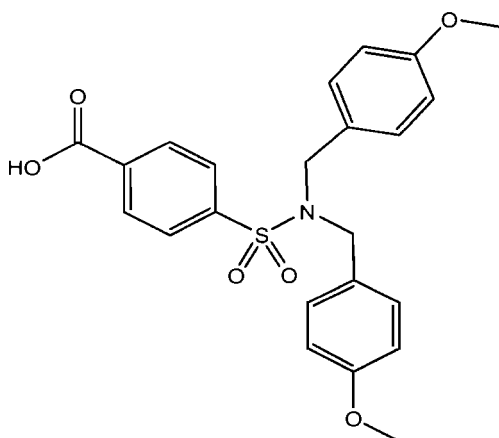
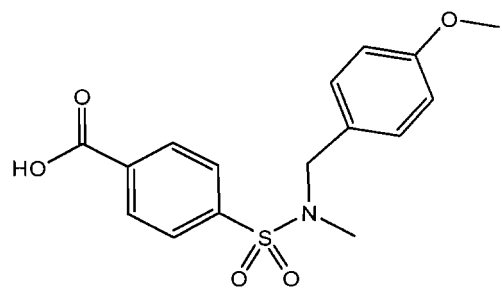
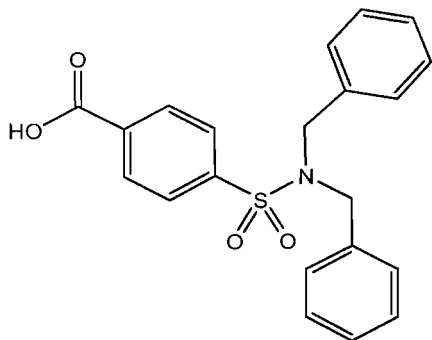
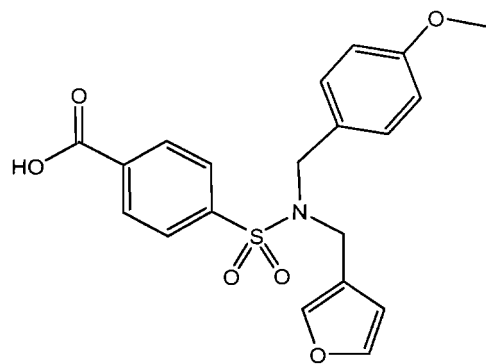
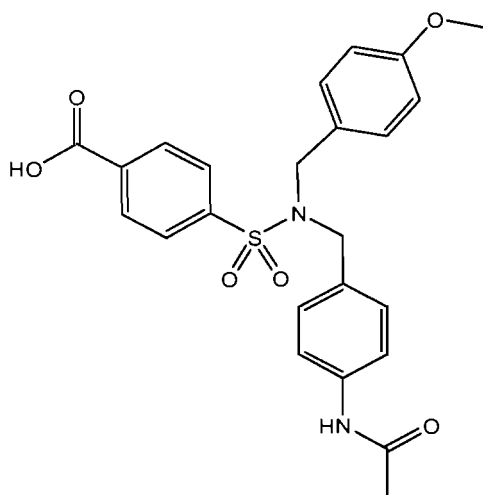
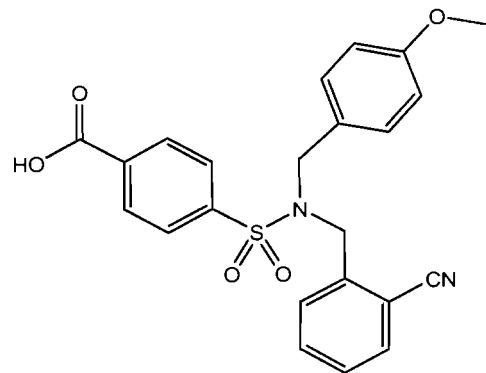
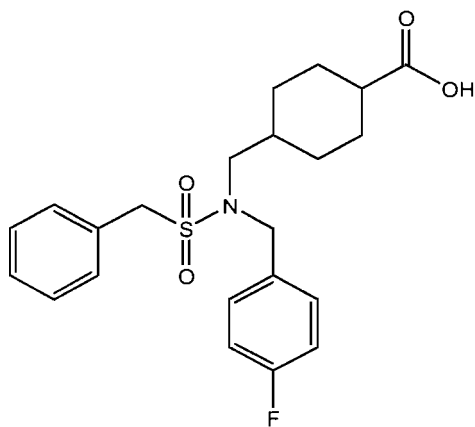
19-08-2008

382

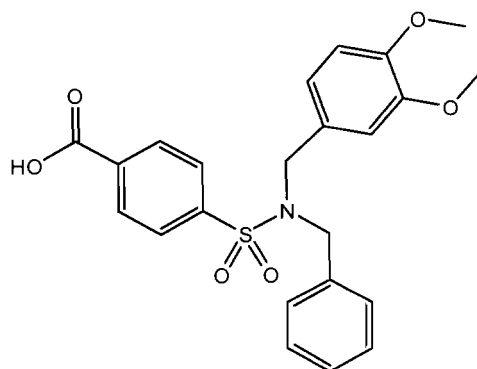
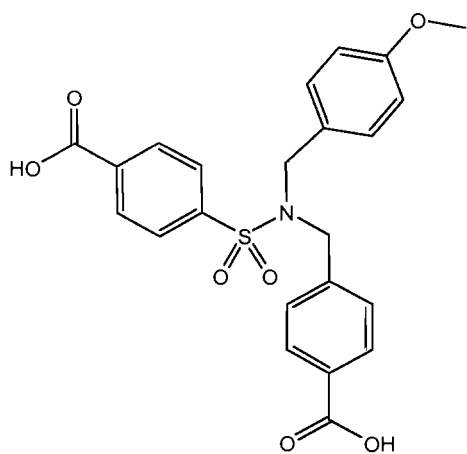
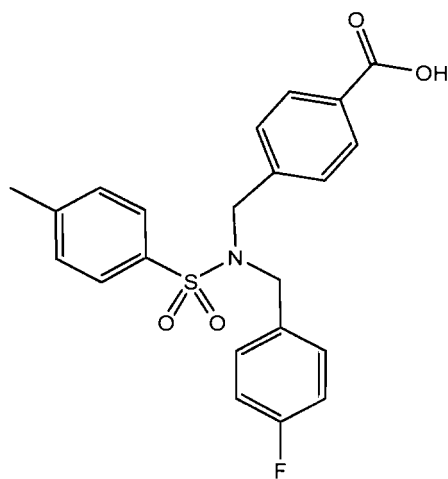
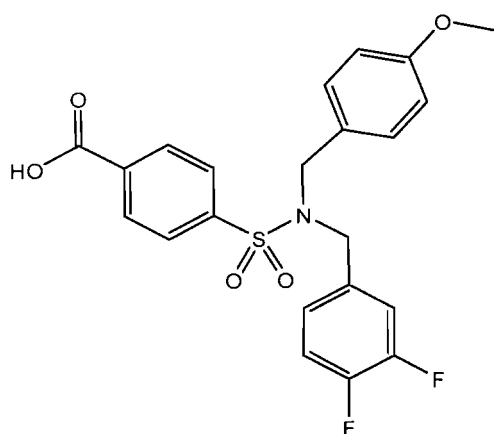
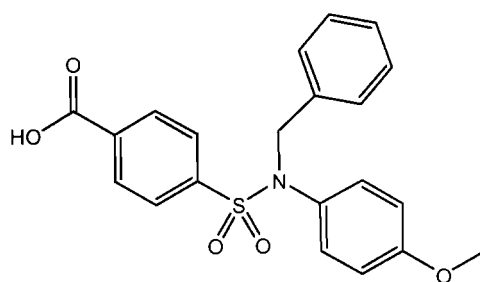
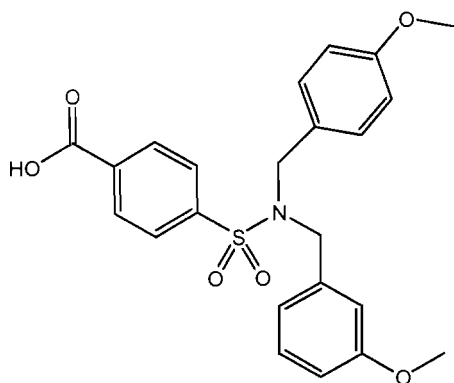
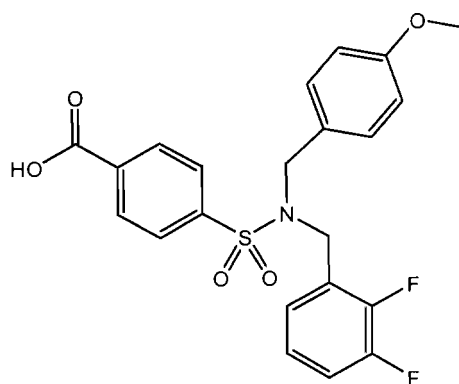
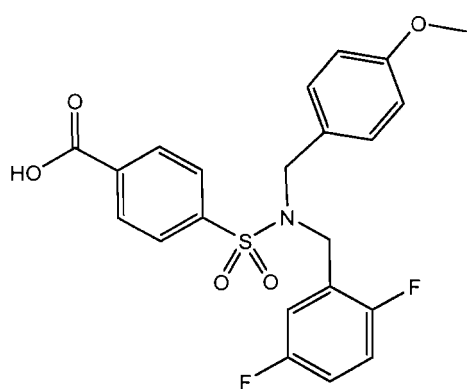


19-08-2008

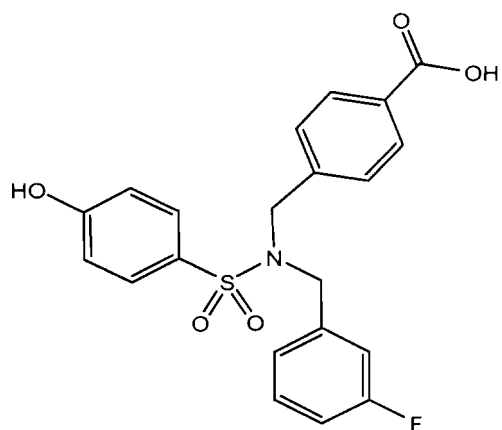
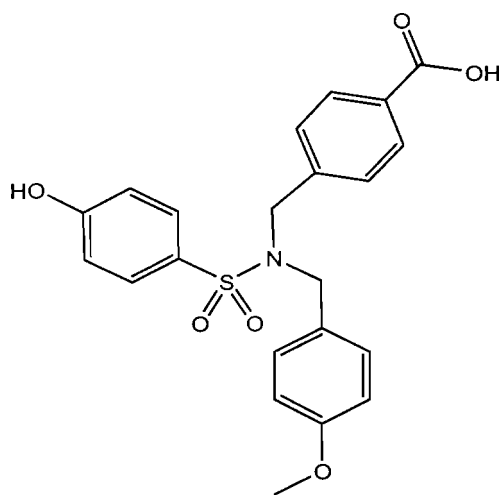
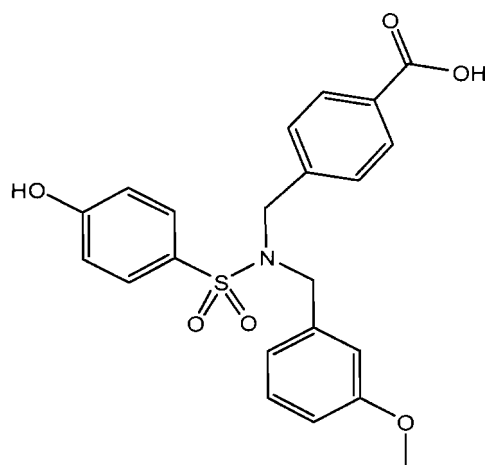
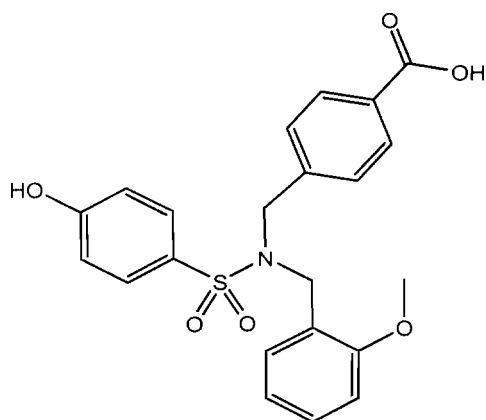
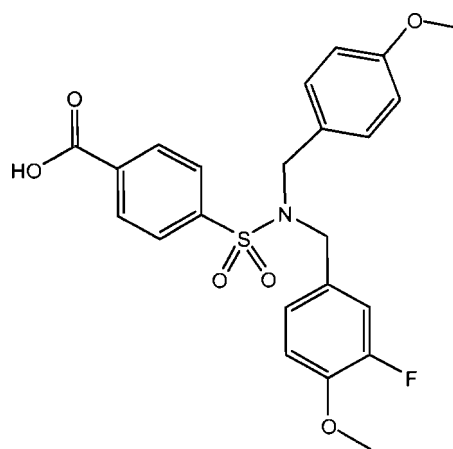
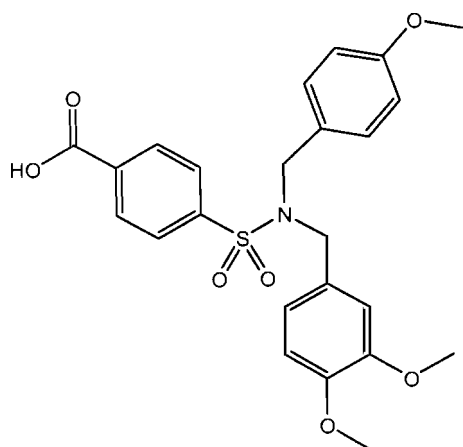
383



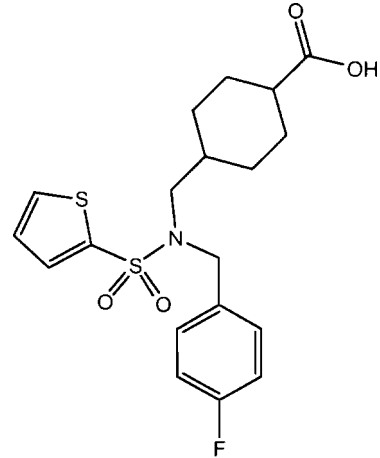
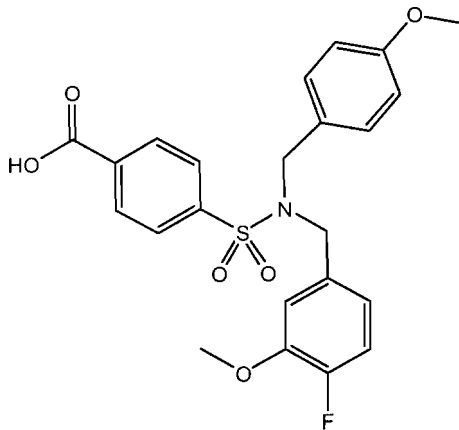
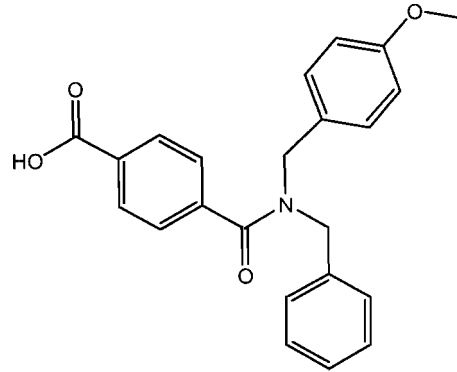
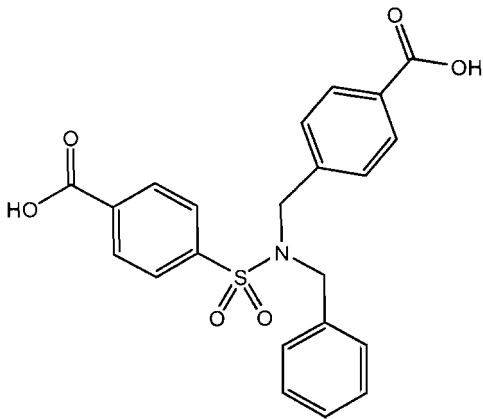
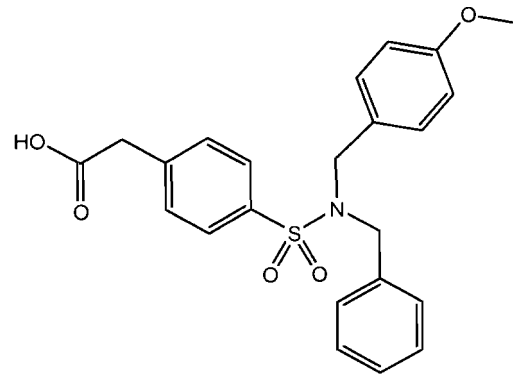
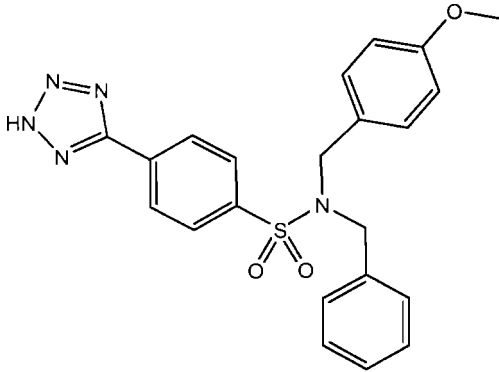
384



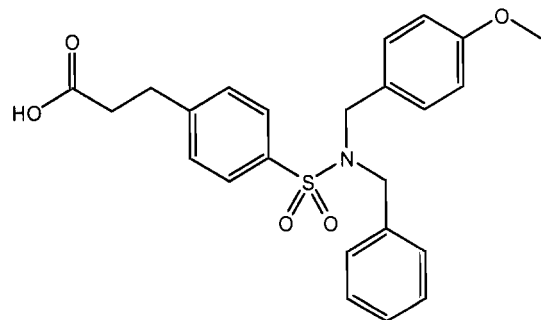
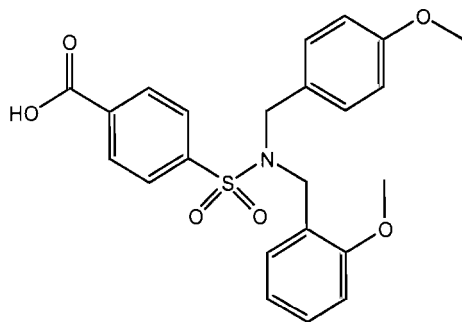
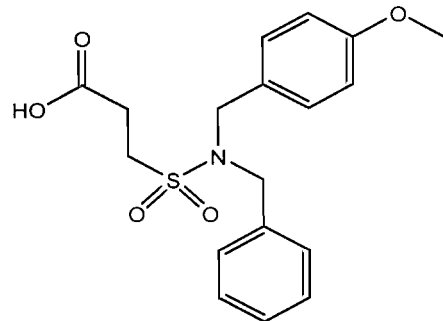
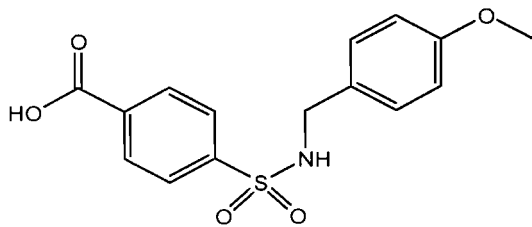
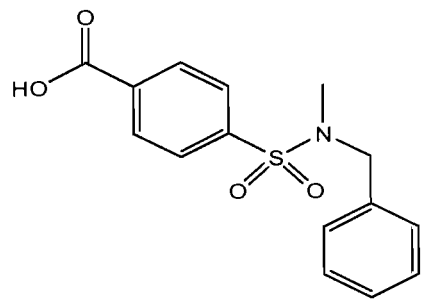
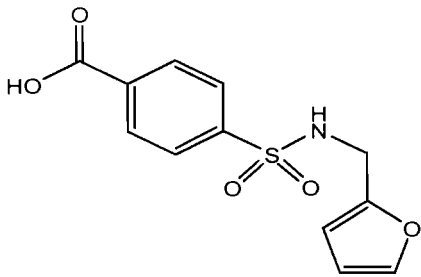
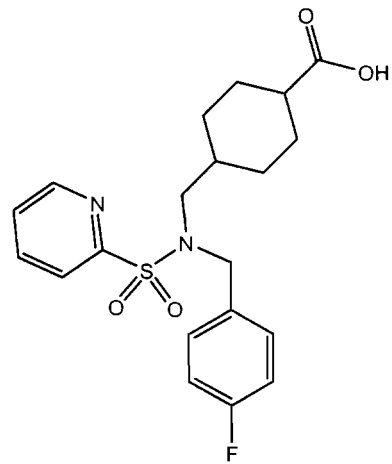
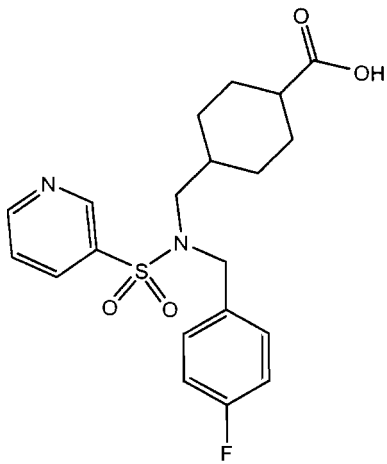
385



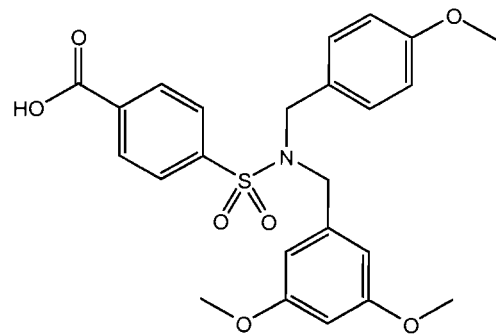
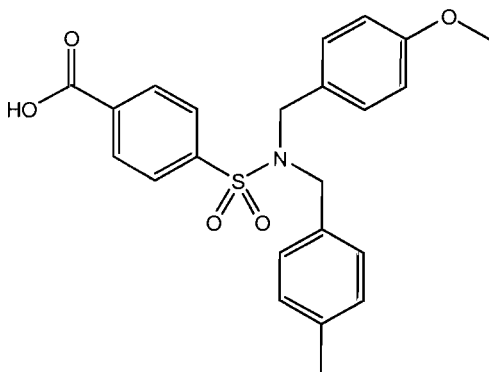
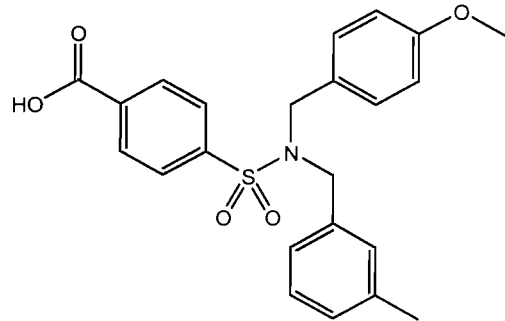
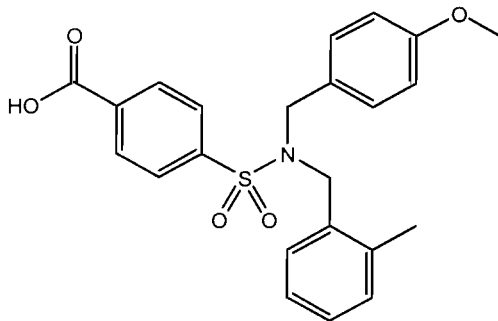
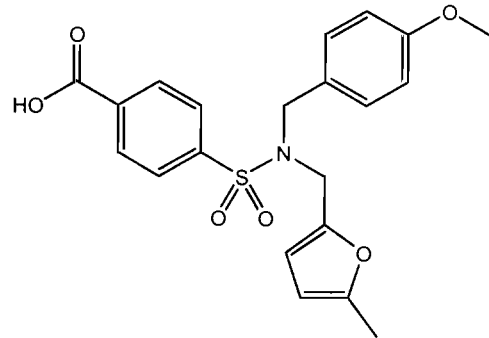
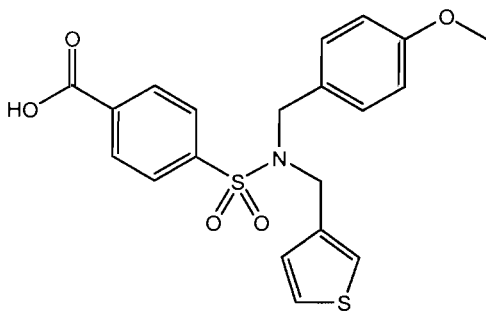
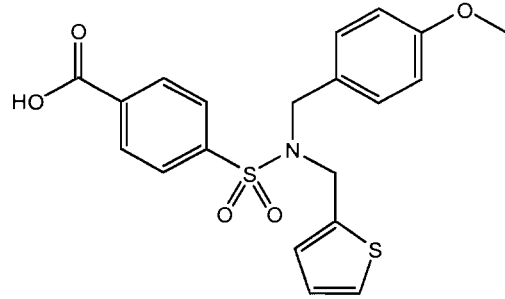
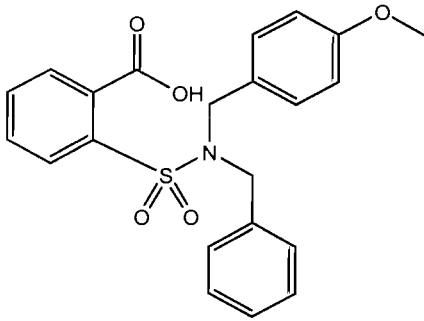
386

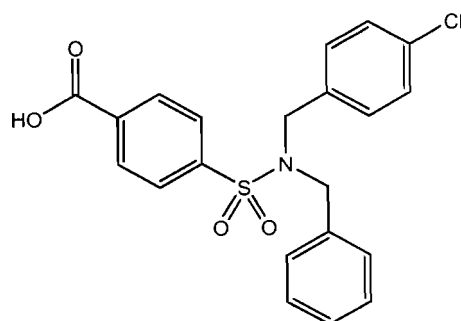
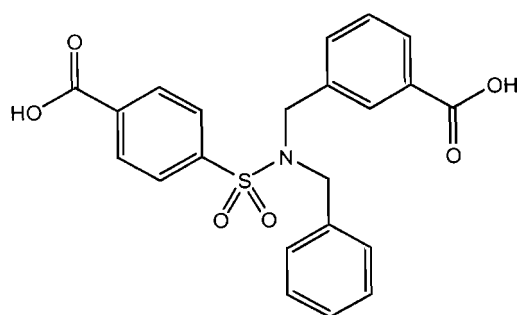
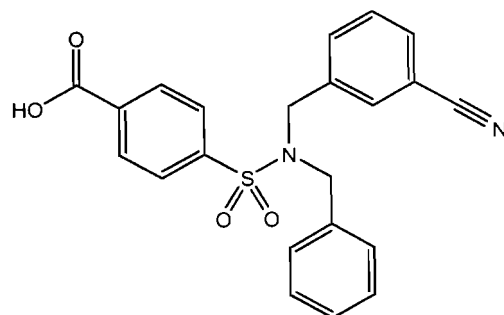
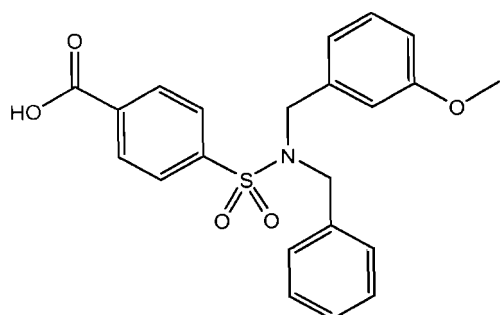
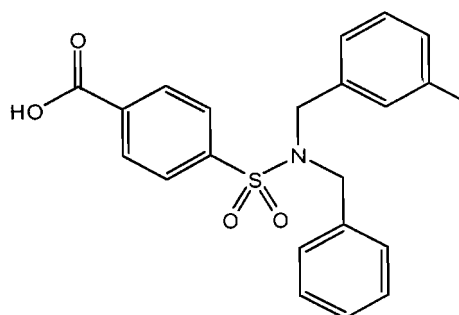
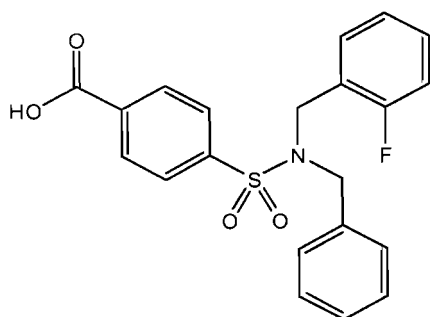
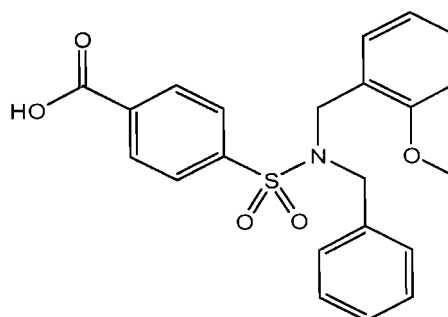
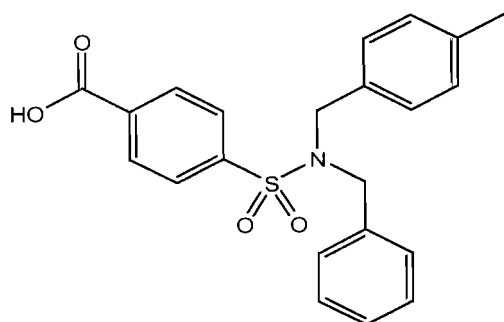
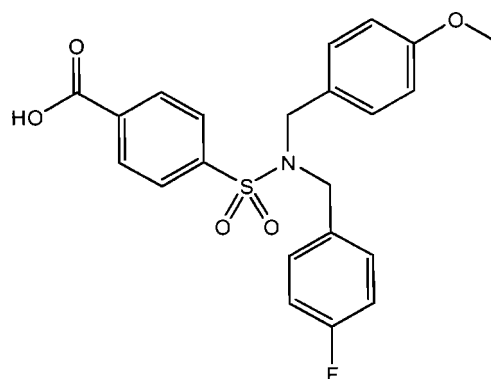
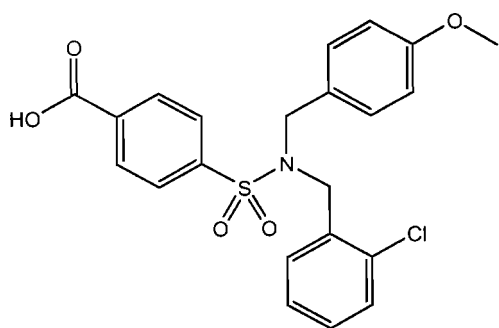


387

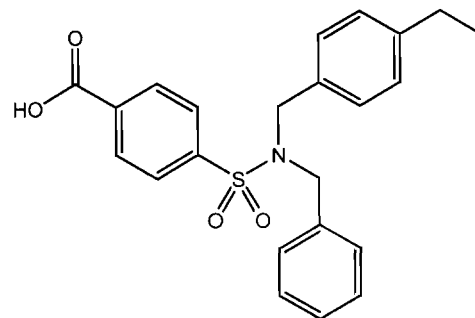
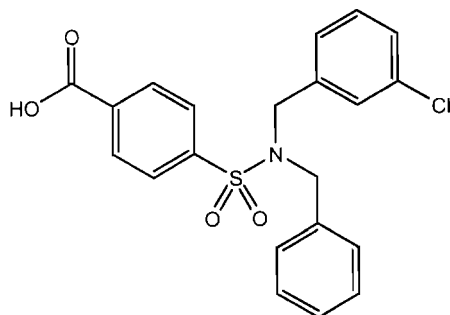
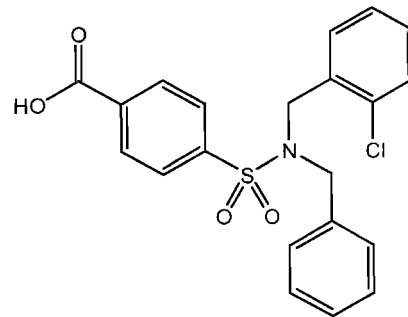
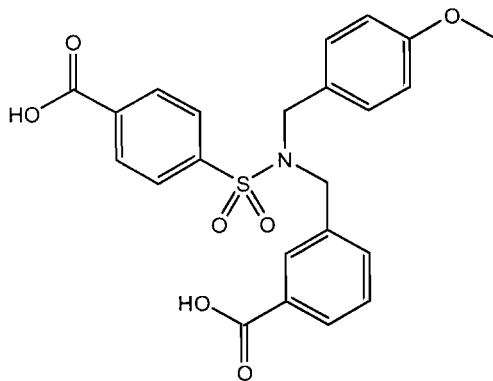
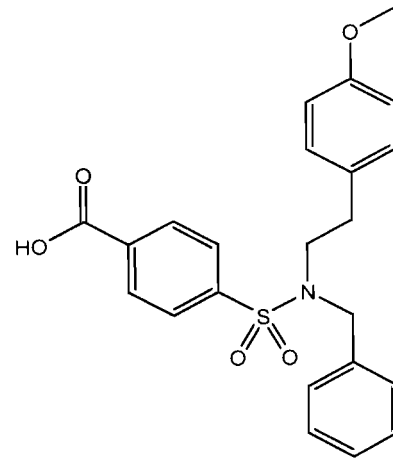
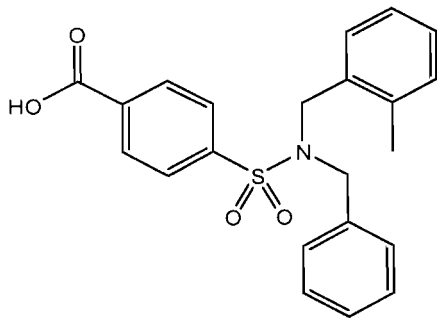
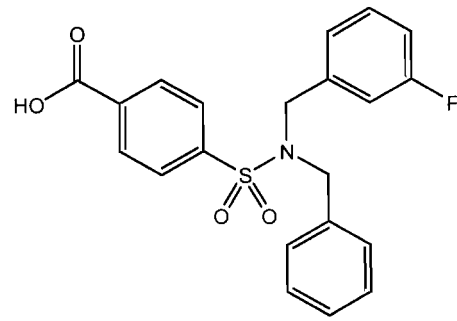
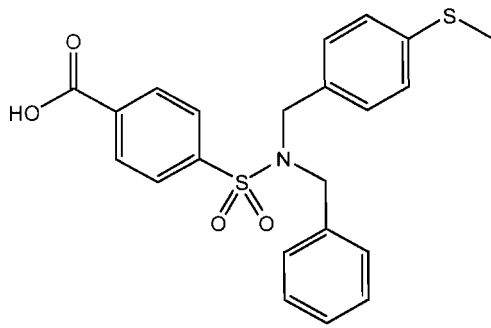


388

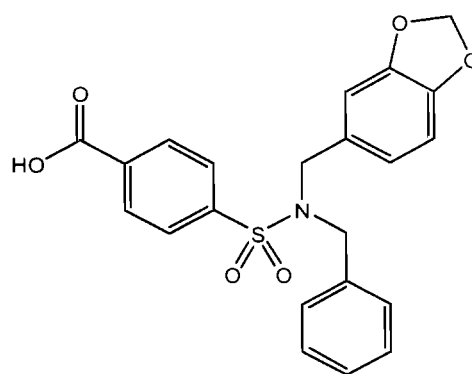
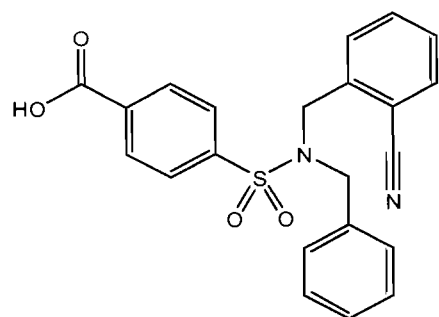
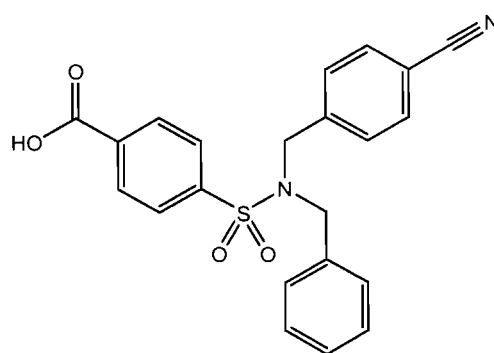
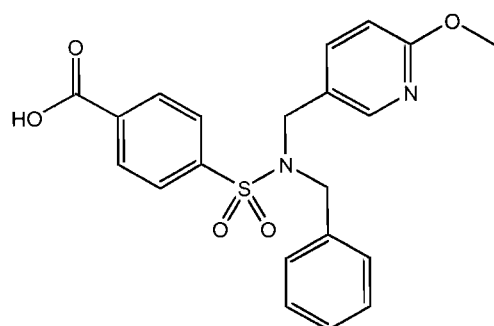
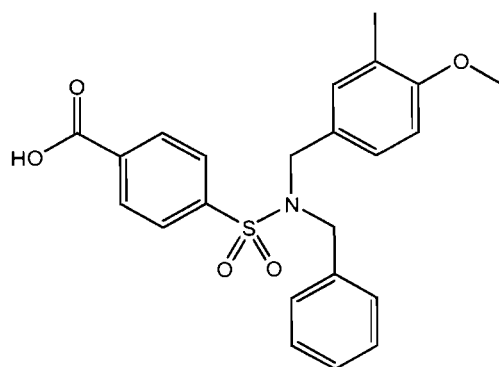
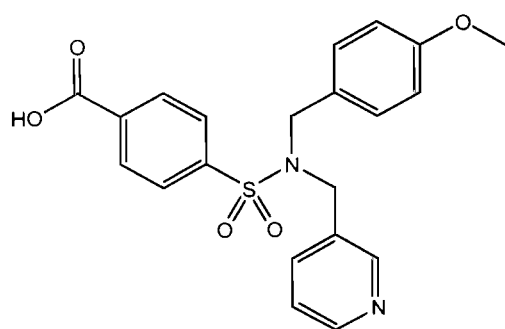
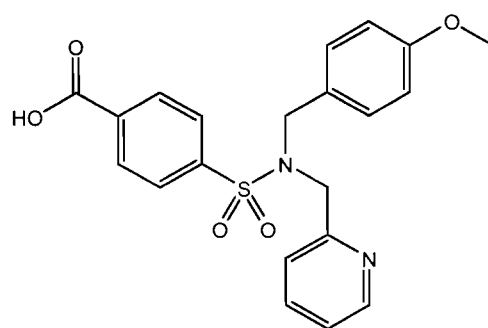
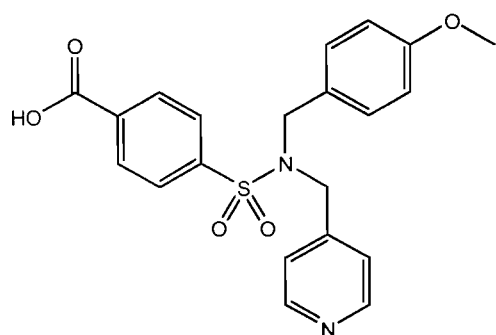




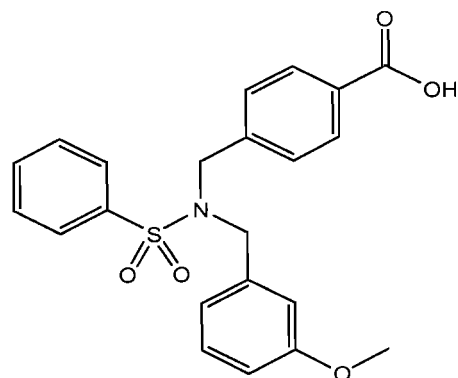
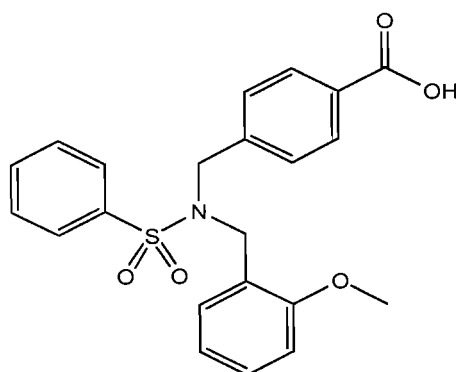
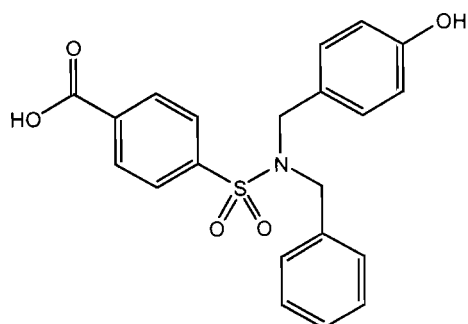
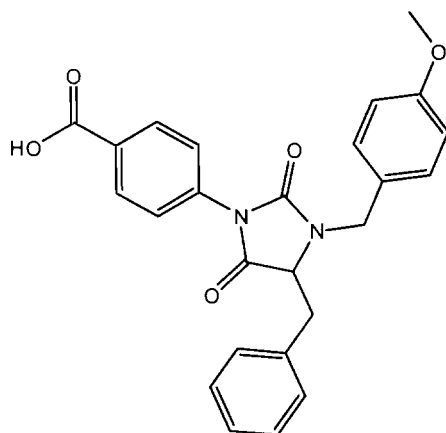
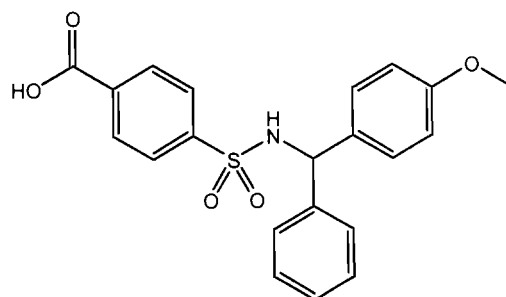
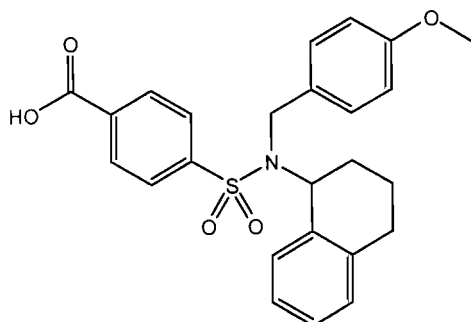
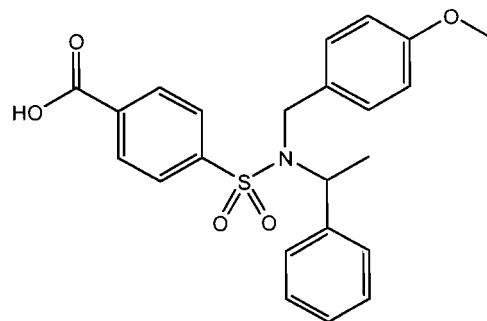
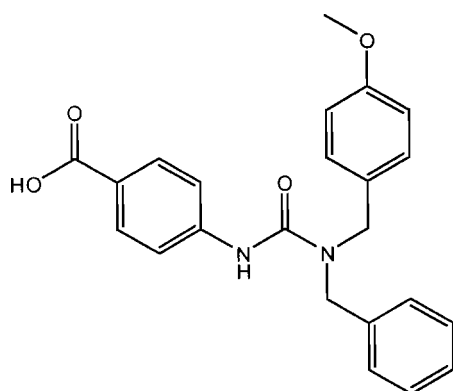
390



391

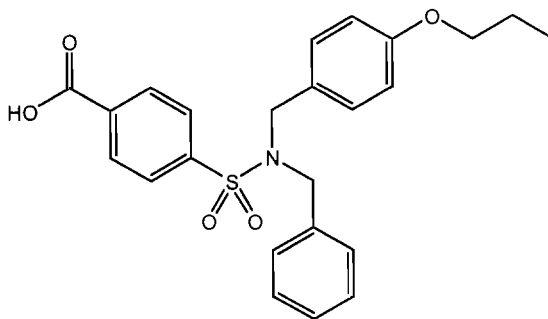
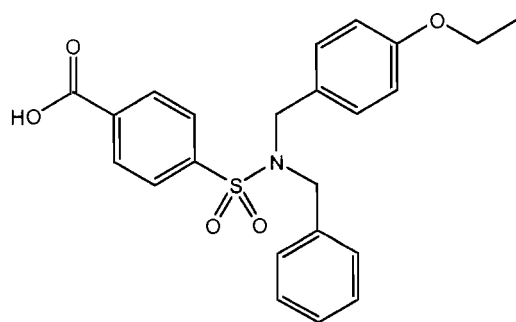
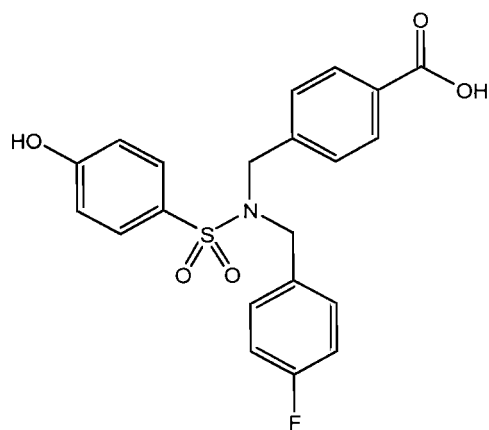
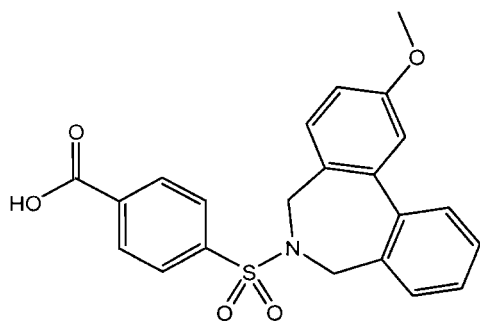
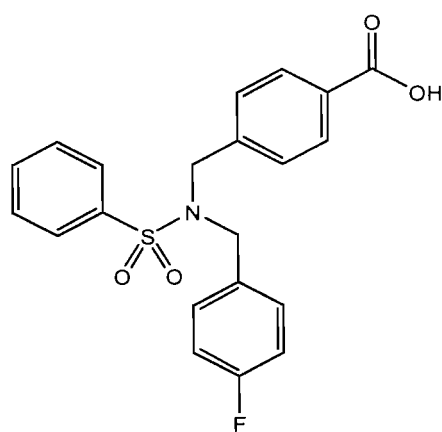
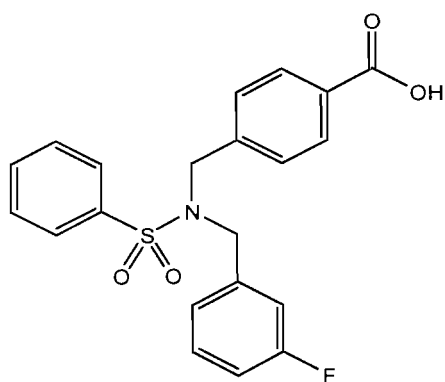
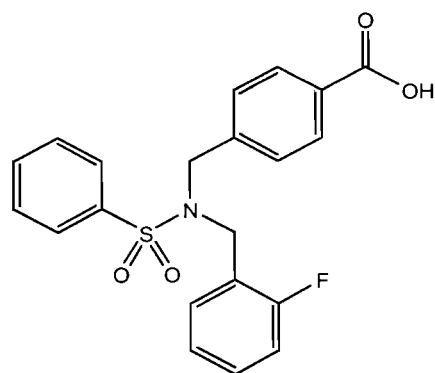
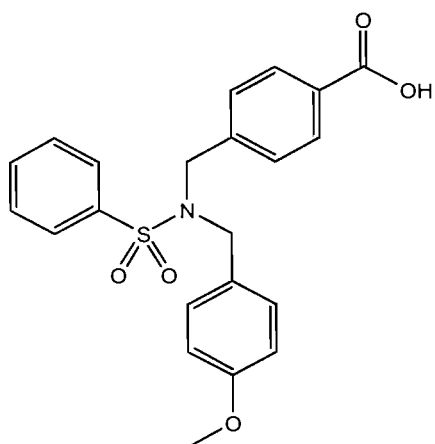


392

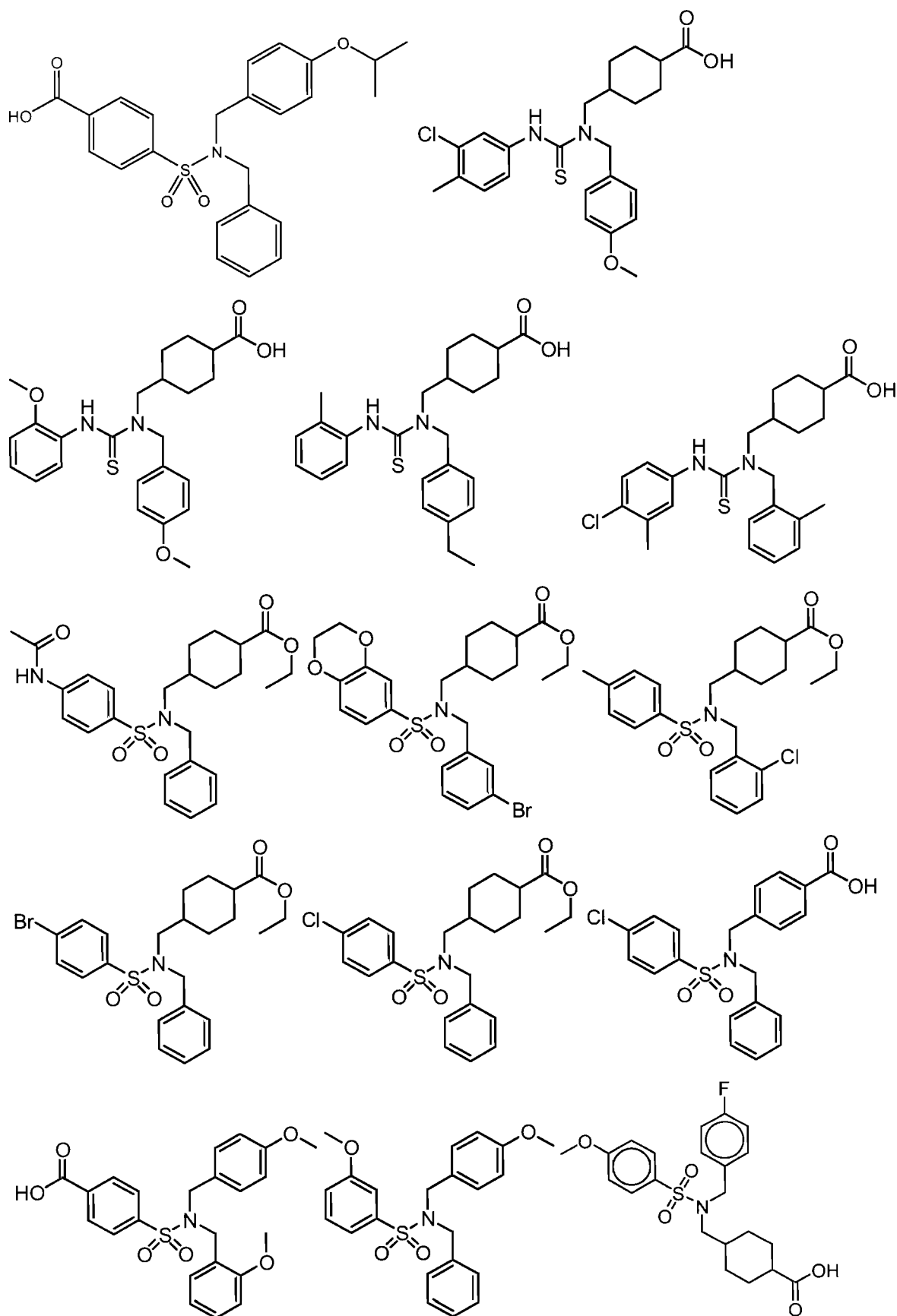


19-08-2008

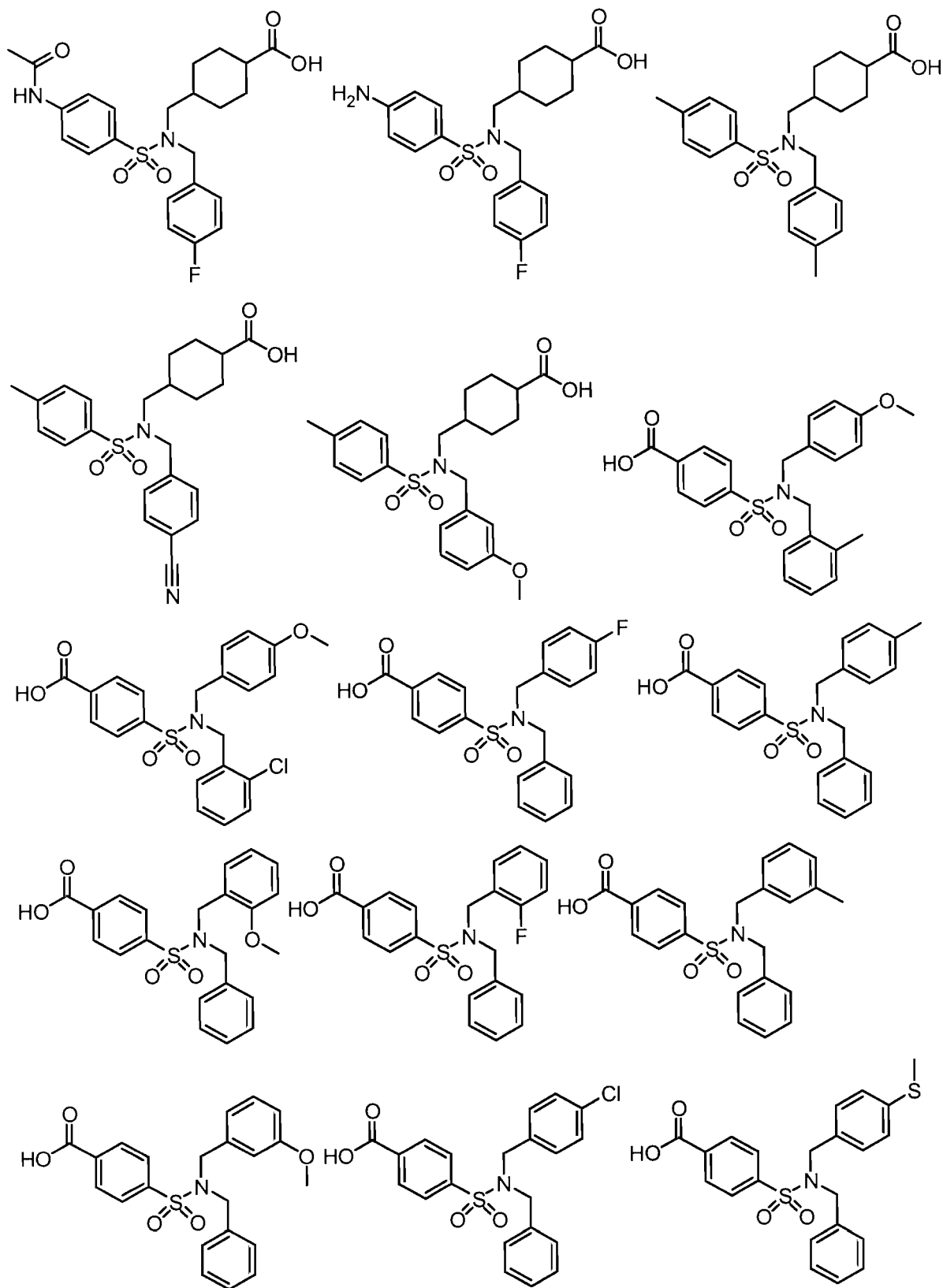
393



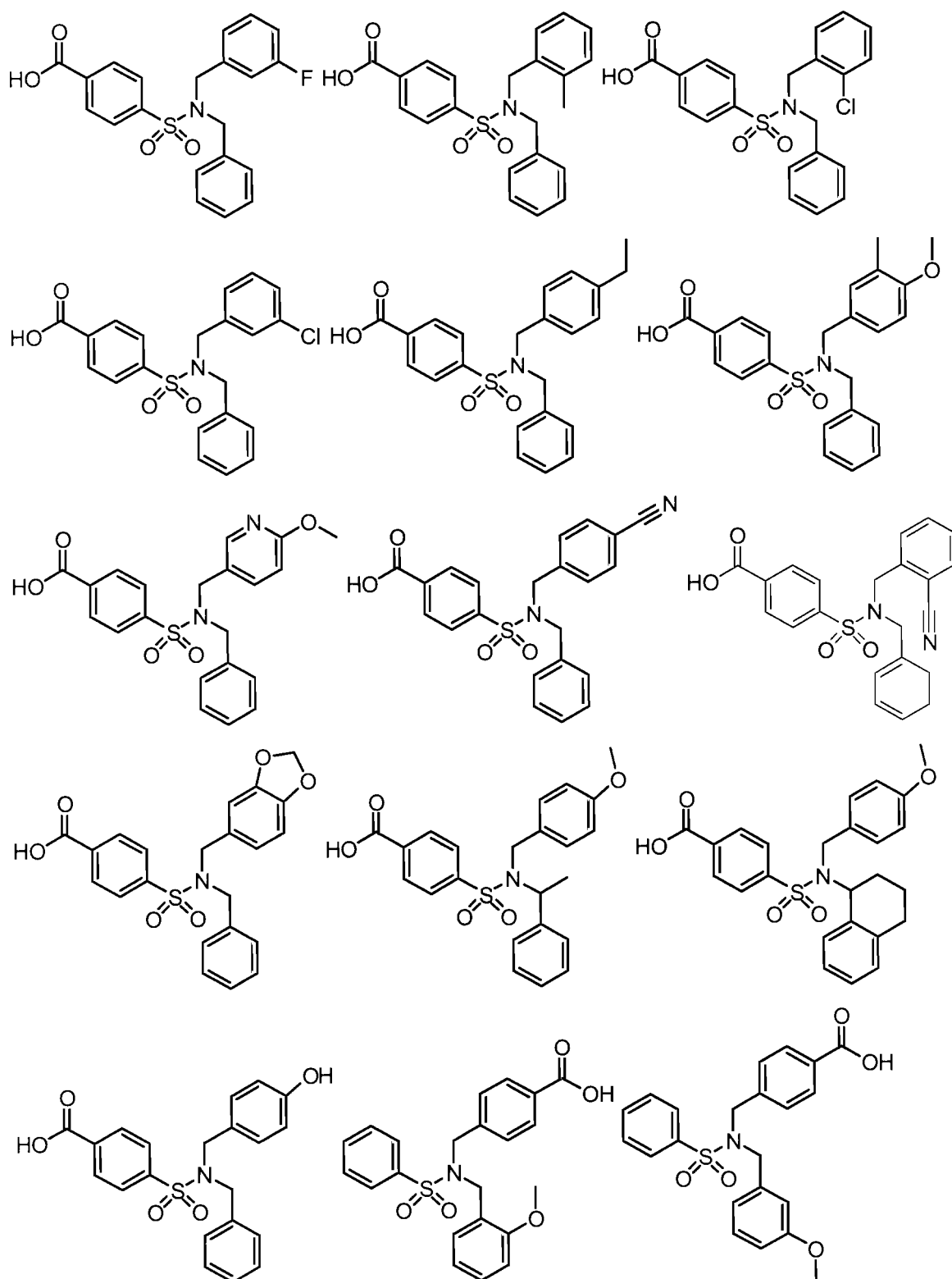
394



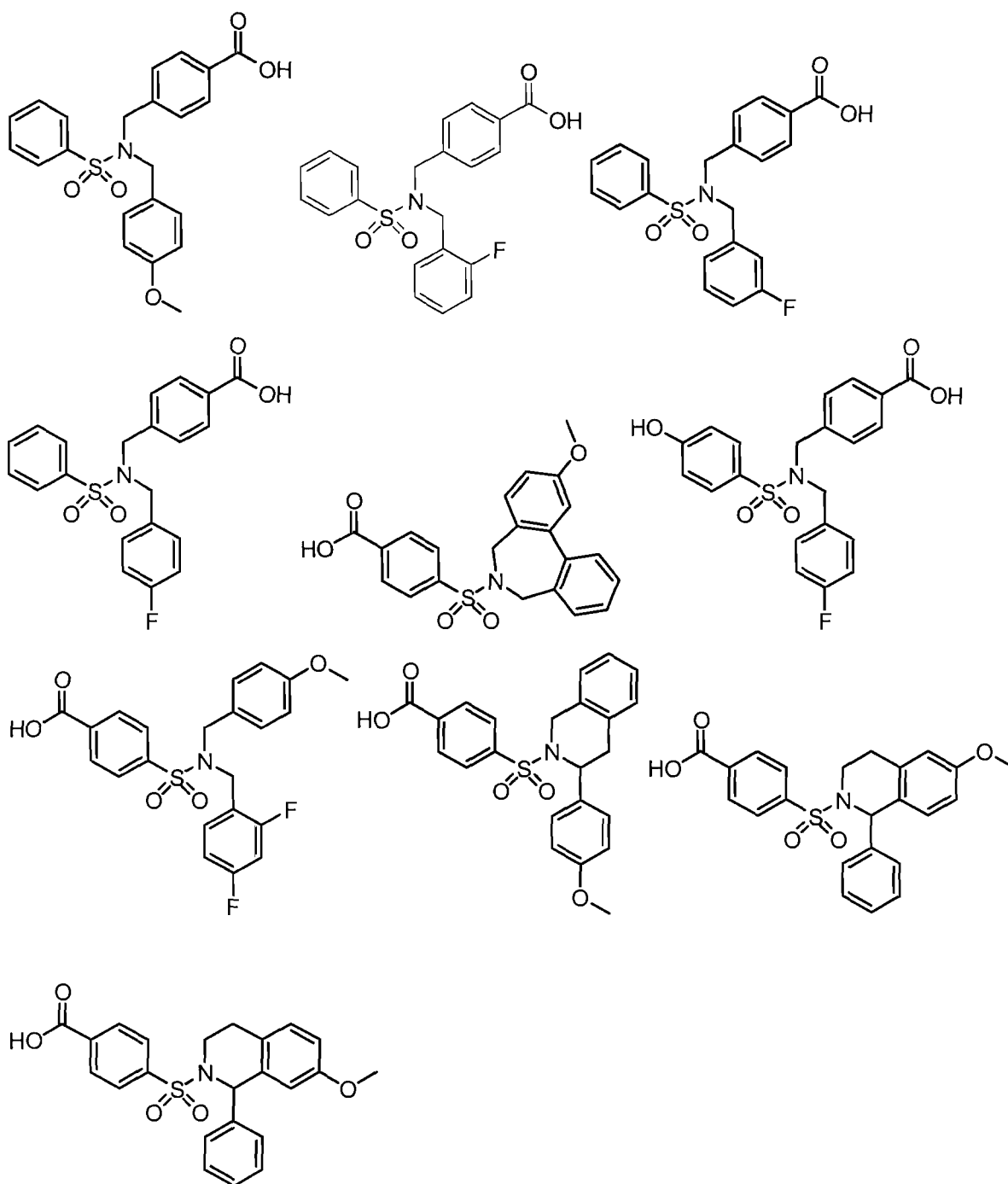
395



396



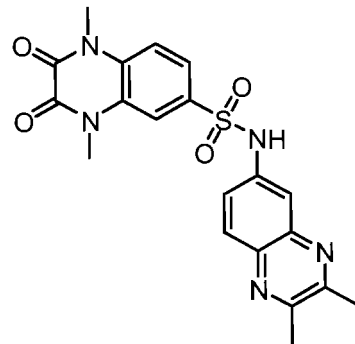
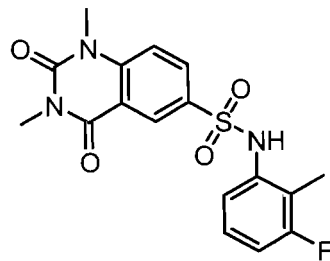
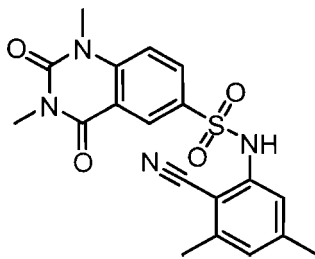
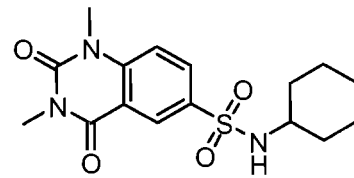
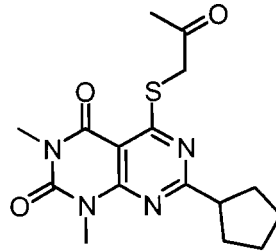
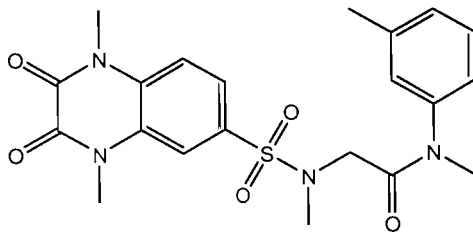
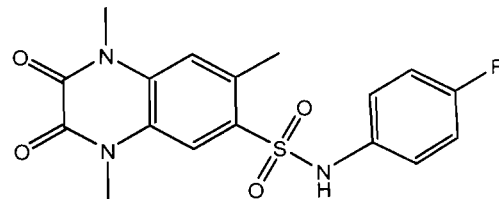
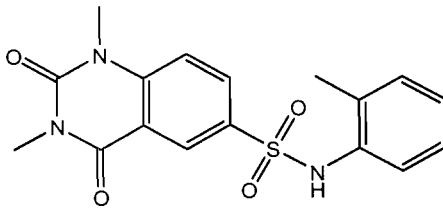
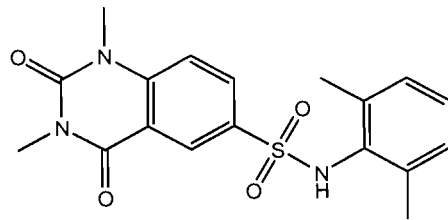
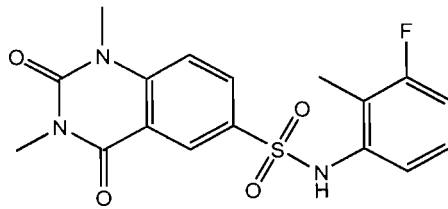
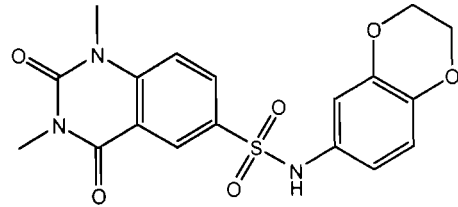
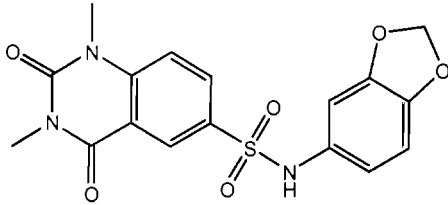
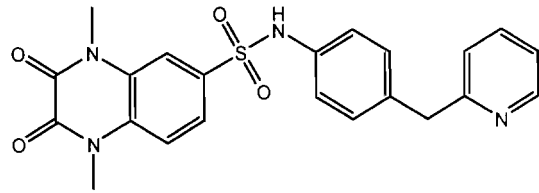
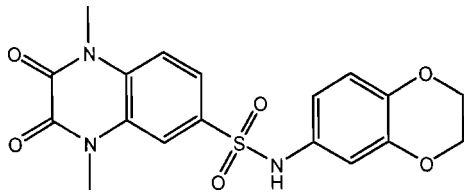
397

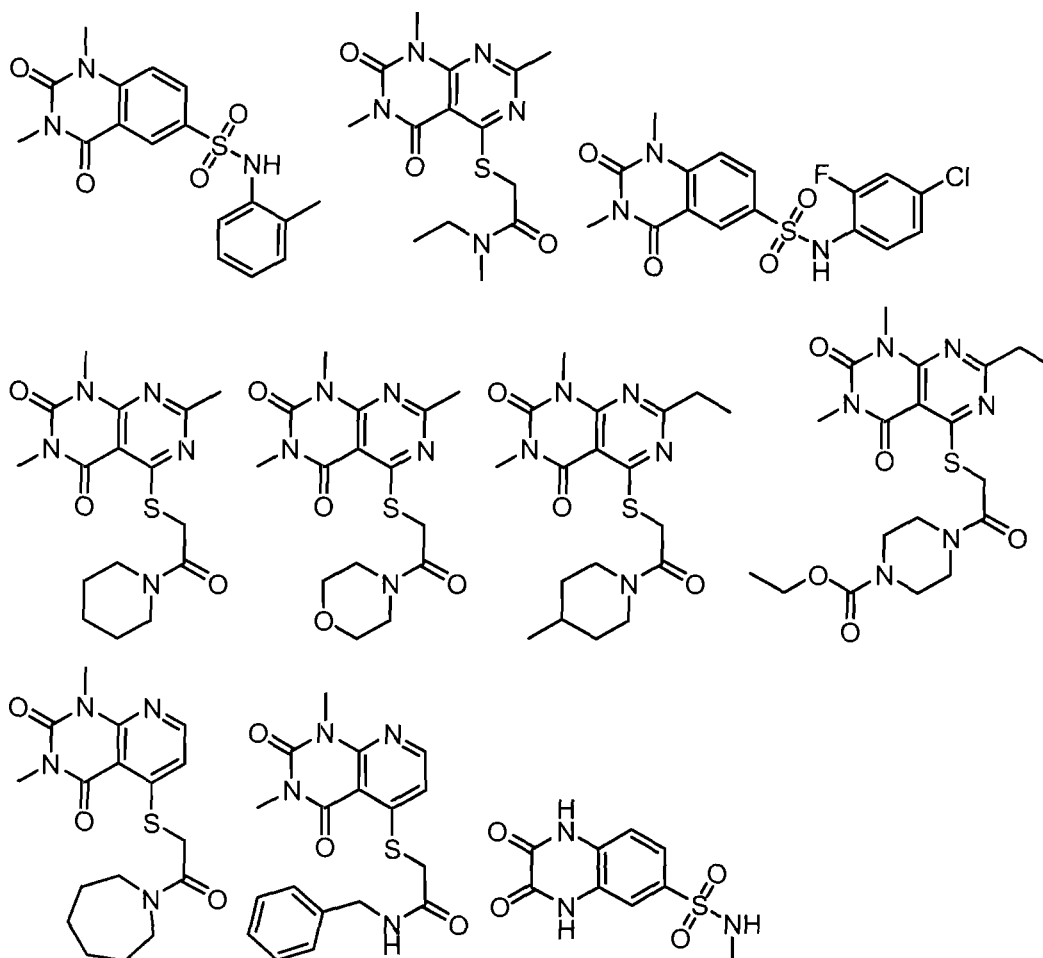


sau o sare, hidrat, solvat sau N-oxid al acestuia.

104. Compus cu formula:

398





sau o sare, hidrat, solvat sau N-oxid al acestuia.

105. Metodă de reducere sau atenuare a gustului amar într-o compoziție pentru ingestie de către oameni sau animale care cuprinde adăugarea unuia sau mai multor compuși din revendicările 33-50 sau 102-104 sau a unui analog al acestora la compoziție, la o concentrație eficientă pentru a atenua sau a reduce gustul amar asociat compoziției.

106. Metoda din revendicarea 105, în care concentrația unuia sau mai multor compuși este de la circa 0,1 ppm până la circa 100 ppm.

107. Metoda din revendicarea 105, în care concentrația unuia sau mai multor compuși este de la circa 1 ppm până la circa 25 ppm.

108. Compoziție pentru ingestia de către oameni sau animale care cuprinde unul sau

mai mulți compuși din una dintre revendicările 33-50 sau 102-104 sau un analog al acestora.

109. Compoziția din revendicarea 108, în care compoziția menționată este un produs alimentar sau o băutură.

110. Compoziția din revendicarea 109, în care produsul băutură este o băutură de cafea instant, solubilă și uscată, un amestec de băutură de cafea sau un concentrat de băutură de cafea.

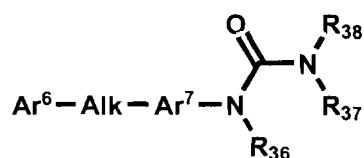
111. Compoziția din revendicarea 109, în care produsul băutură este un adaos pe bază de lapte, un adaos nelactat sau un lapte condensat pentru băuturile de cafea.

112. Compoziția din revendicarea 108, în care compoziția este un produs necomestibil.

113. Compoziția din revendicarea 112, în care produsul necomestibil este un supliment, un nutraceutic, un produs alimentar funcțional, un produs farmaceutic, un OTC, un produs de îngrijire orală sau un produs cosmetic.

114. Compoziția din revendicarea 113, în care produsul de îngrijire orală este o pastă de dinți, o apă de gură sau o gumă de mestecat.

115. Compus cu formula:



sau o sare, hidrat, solvat, N-oxid sau promedicament al acestuia, în care Ar^6 și Ar^7 sunt, aceleași sau diferite în mod independent una față de cealaltă, o grupare aril cu cinci sau șase atomi sau o grupare heteroaril cu cinci sau șase atomi;

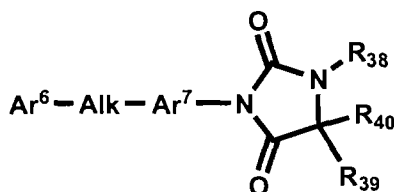
Alk este o grupare alchil, întreruptă opțional de un heteroatom;

R_{36} și R_{37} sunt, aceleași sau diferite în mod independent una față de cealaltă, H, alchil, sau R_{36} și R_{37} , împreună cu atomii la care sunt atașați, formează un heterociclu cu cinci sau șase atomi opțional substituit; și

R_{38} este H, alchil substituit sau nesubstituit, cicloalchil alchil substituit sau nesubstituit, heterocicloalchilalchil substituit sau nesubstituit, aril substituit sau nesubstituit, arilamidoalchil substituit sau nesubstituit, heteroarilamidoalchil substituit sau nesubstituit, arilalchil substituit sau nesubstituit, arilalcoxi substituit sau nesubstituit, heteroaril substituit sau nesubstituit, heteroarilalchil substituit sau nesubstituit sau haloalchil.

116. Compusul din revendicarea 115, în care heterociclul cu cinci atomi format de R_{36} și R_{37} este o hidantoină sau o uree ciclică substituită sau nesubstituită.

117. Compusul din revendicarea 116, în care hidantoina este o hidantoină cu formula:



sau o sare, hidrat, solvat, N-oxid sau promedicament al acestuia, în care Ar^6 și Ar^7 sunt, aceleași sau diferite în mod independent una față de cealaltă, o grupare aril cu cinci sau șase atomi sau o grupare heteroaril cu cinci sau șase atomi;

Alk este o grupare alchil, întreruptă opțional de un heteroatom;

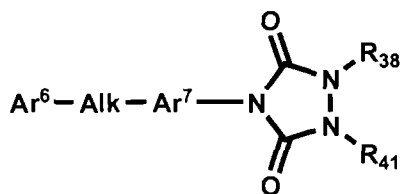
R_{38} este H, alchil substituit sau nesubstituit, cicloalchil alchil substituit sau nesubstituit, heterocicloalchilalchil substituit sau nesubstituit, aril substituit sau nesubstituit, arilamidoalchil substituit sau nesubstituit, heteroarilamidoalchil substituit sau nesubstituit, arilalchil substituit sau nesubstituit, arilalcoxi substituit sau nesubstituit, heteroaril substituit sau nesubstituit, heteroarilalchil substituit sau nesubstituit sau haloalchil; și

R_{39} și R_{40} sunt, aceleași sau diferite în mod independent una față de cealaltă, H, alchil substituit sau nesubstituit, cicloalchil alchil substituit sau nesubstituit,

heterocicloalchilalchil substituit sau nesubstituit, aril substituit sau nesubstituit, arilamidoalchil substituit sau nesubstituit, arilalchilamidoalchil substituit sau nesubstituit, heteroarilamidoalchil substituit sau nesubstituit, heteroarilalchilamidoalchil substituit sau nesubstituit, arilalchil substituit sau nesubstituit, arilalcoxi substituit sau nesubstituit, heteroaril substituit sau nesubstituit, heteroarilalchil substituit sau nesubstituit, haloalchil sau R_{39} și R_{40} , împreună cu atomul de carbon la care sunt atașați, formează o grupare C=O sau o grupare alchenil substituit sau nesubstituit.

118. Compusul din revendicarea 115, în care heterociclul cu cinci atomi format de R_{36} și R_{37} este un urazol.

119. Compusul din revendicarea 118, în care urazolul este un urazol cu formula:



sau o sare, hidrat, solvat, N-oxid sau promedicament al acestuia,

în care Ar^6 și Ar^7 sunt, aceleași sau diferite în mod independent una față de cealaltă, o grupare aril cu cinci sau șase atomi sau o grupare heteroaril cu cinci sau șase atomi;

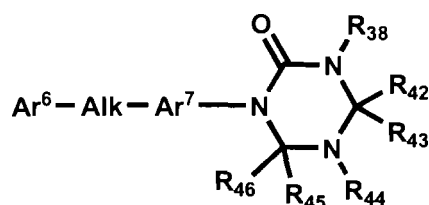
Alk este o grupare alchil, întreruptă opțional de un heteroatom;

R_{38} este H, alchil substituit sau nesubstituit, cicloalchil alchil substituit sau nesubstituit, heterocicloalchilalchil substituit sau nesubstituit, aril substituit sau nesubstituit, arilamidoalchil substituit sau nesubstituit, heteroarilamidoalchil substituit sau nesubstituit, arilalchil substituit sau nesubstituit, arilalcoxi substituit sau nesubstituit, heteroaril substituit sau nesubstituit, heteroarilalchil substituit sau nesubstituit sau haloalchil; și

R_{41} este H, alchil substituit sau nesubstituit, cicloalchil alchil substituit sau nesubstituit, heterocicloalchilalchil substituit sau nesubstituit, aril substituit sau nesubstituit, arilamidoalchil substituit sau nesubstituit, arilalchilamidoalchil substituit sau nesubstituit, heteroarilamidoalchil substituit sau nesubstituit, heteroarilalchilamidoalchil substituit sau nesubstituit, arilalchil substituit sau

nesubstituit, arilalcoxi substituit sau nesubstituit, heteroaril substituit sau nesubstituit, heteroarilalchil substituit sau nesubstituit sau haloalchil.

120. Compusul din revendicarea 115, în care heterociclul cu șase atomi format de R_{36} și R_{37} este un heterociclu cu șase atomi cu formula:

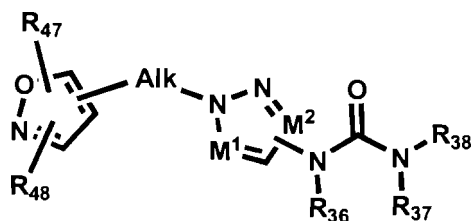


sau o sare, hidrat, solvat, N-oxid sau promedicament al acestuia,

în care R_{38} este H, alchil substituit sau nesubstituit, cicloalchil alchil substituit sau nesubstituit, heterocicloalchilalchil substituit sau nesubstituit, aril substituit sau nesubstituit, arilamidoalchil substituit sau nesubstituit, heteroarilamidoalchil substituit sau nesubstituit, arilalchil substituit sau nesubstituit, arilalcoxi substituit sau nesubstituit, heteroaril substituit sau nesubstituit, heteroarilalchil substituit sau nesubstituit sau haloalchil; și

R_{42} , R_{43} , R_{44} , R_{45} și R_{46} sunt, aceleași sau diferite în mod independent una față de cealaltă, H, alchil substituit sau nesubstituit, cicloalchil alchil substituit sau nesubstituit, arilalchil substituit sau nesubstituit, arilalcoxi substituit sau nesubstituit, heteroaril substituit sau nesubstituit, heteroarilalchil substituit sau nesubstituit sau R_{42} și R_{43} , sau R_{45} și R_{46} , împreună cu atomii de carbon la care sunt atașați fiecare, formează o grupare C=O.

121. Compus cu formula:



sau o sare, hidrat, solvat, N-oxid sau promedicament al acestuia,

în care Alk este o grupare alchil, întreruptă opțional de un heteroatom;

M^1 este N sau CR_{49} , în care R_{49} este H sau alchil substituit sau nesubstituit;

M^2 este N sau CR_{50} , în care R_{50} este H sau alchil substituit sau nesubstituit;

R_{36} și R_{37} sunt, aceleași sau diferite în mod independent una față de cealaltă, H, alchil sau R_{36} și R_{37} , împreună cu atomii la care sunt atașați, formează un heterociclu cu cinci sau șase atomi opțional substituit; și

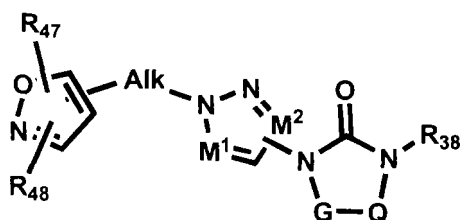
R_{38} este H, alchil substituit sau nesubstituit, cicloalchil alchil substituit sau nesubstituit, heterocicloalchilalchil substituit sau nesubstituit, aril substituit sau nesubstituit, arilamidoalchil substituit sau nesubstituit, heteroarilamidoalchil substituit sau nesubstituit, arilalchil substituit sau nesubstituit, arilalcoxi substituit sau nesubstituit, heteroaril substituit sau nesubstituit, heteroarilalchil substituit sau nesubstituit sau haloalchil;

R_{47} este H, alchil substituit sau nesubstituit, alcoxi substituit sau nesubstituit, aril substituit sau nesubstituit, arilalchil substituit sau nesubstituit sau halo; și

R_{48} este H, alchil substituit sau nesubstituit, alcoxi substituit sau nesubstituit, aril substituit sau nesubstituit, arilalchil substituit sau nesubstituit sau halo.

122.

Compus cu formula:



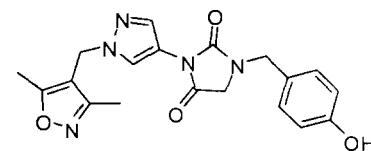
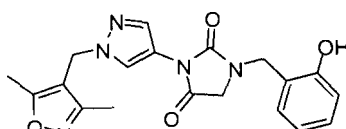
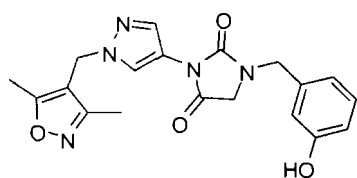
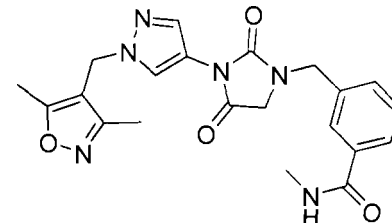
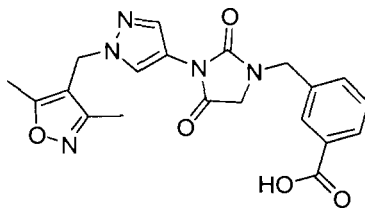
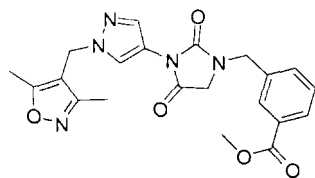
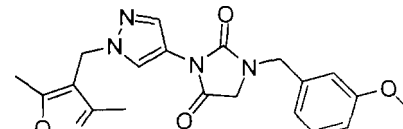
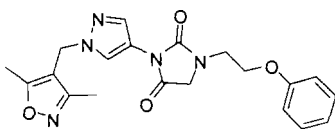
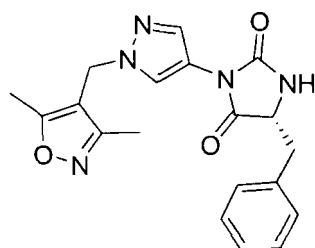
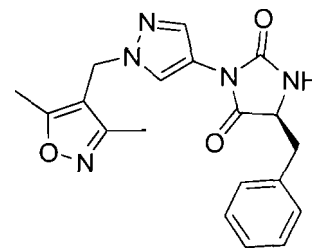
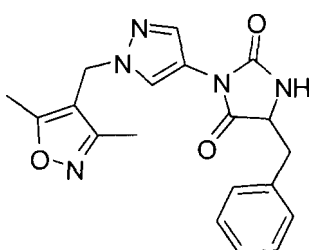
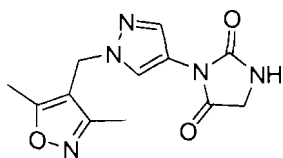
sau o sare, hidrat, solvat, N-oxid sau promedicament al acestuia,

în care Alk este o grupare alchil, întreruptă opțional de un heteroatom;

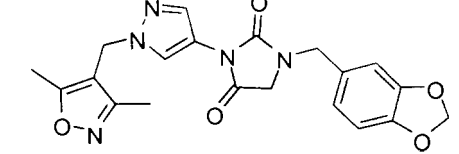
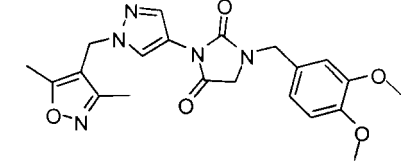
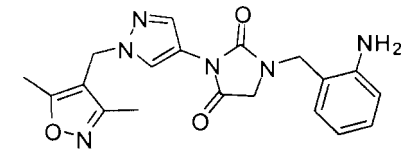
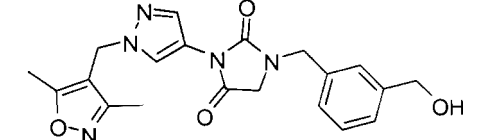
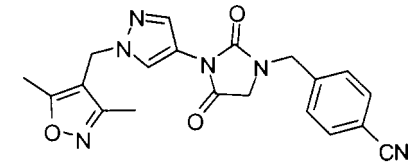
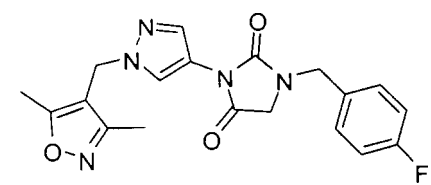
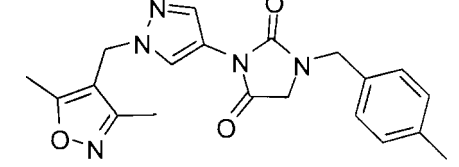
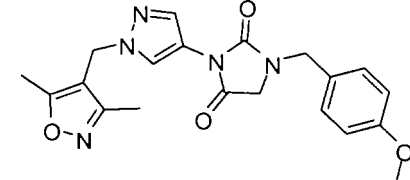
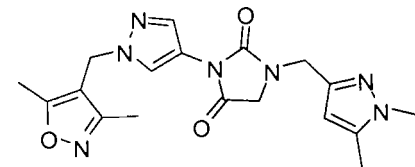
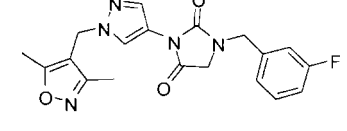
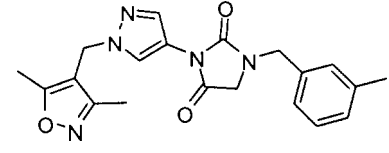
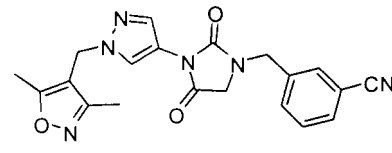
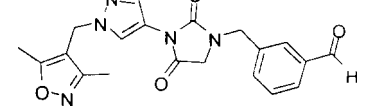
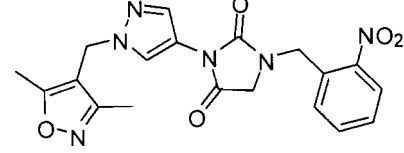
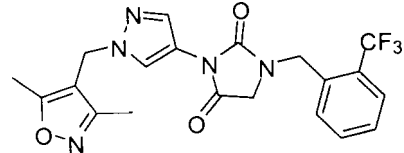
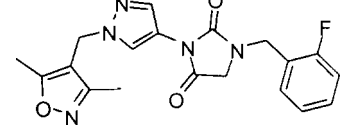
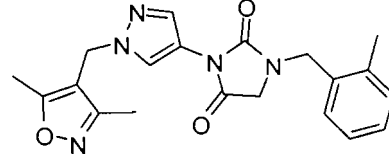
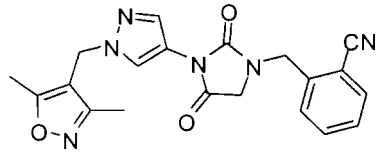
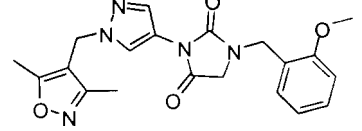
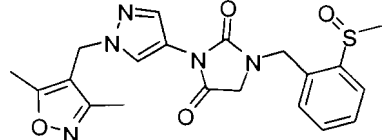
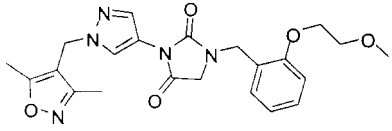
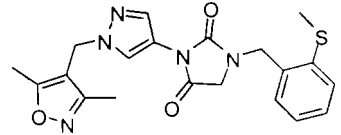
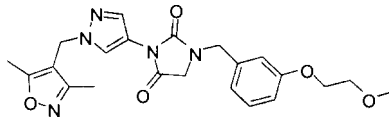
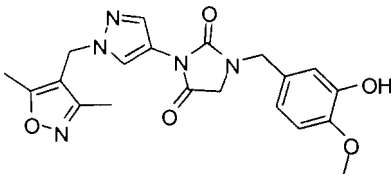
G este C=O și Q este $CR_{51}R_{52}$ sau NR_{51} , în care R_{51} și R_{52} sunt, aceleași sau diferite în mod independent una față de cealaltă, H, alchil substituit sau nesubstituit, cicloalchil alchil substituit sau nesubstituit, heterocicloalchilalchil substituit sau nesubstituit, aril substituit sau nesubstituit, arilamidoalchil substituit sau nesubstituit, arilalchilamidoalchil substituit sau nesubstituit, heteroarilamidoalchil substituit sau nesubstituit, heteroarilalchilamidoalchil substituit sau nesubstituit, arilalchil substituit sau nesubstituit, arilalcoxi substituit sau nesubstituit, heteroaril substituit sau nesubstituit, heteroarilalchil substituit sau nesubstituit, haloalchil sau R_{51} și R_{52} , împreună cu atomul de carbon la care sunt atașați, formează o grupare C=O sau o grupare alchenil substituit sau nesubstituit;

M^1 este N sau CR_{49} , în care R_{49} este H sau alchil substituit sau nesubstituit;
 M^2 este N sau CR_{50} , în care R_{50} este H sau alchil substituit sau nesubstituit;
 R_{38} este H, alchil substituit sau nesubstituit, cicloalchil alchil substituit sau nesubstituit, heterocicloalchilalchil substituit sau nesubstituit, aril substituit sau nesubstituit, arilamidoalchil substituit sau nesubstituit, heteroarilamidoalchil substituit sau nesubstituit, arilalchil substituit sau nesubstituit, arilalcoxi substituit sau nesubstituit, heteroaril substituit sau nesubstituit, heteroarilalchil substituit sau nesubstituit sau haloalchil;
 R_{47} este H, alchil substituit sau nesubstituit, alcoxi substituit sau nesubstituit, aril substituit sau nesubstituit, arilalchil substituit sau nesubstituit sau halo; și
 R_{48} este H, alchil substituit sau nesubstituit, alcoxi substituit sau nesubstituit, aril substituit sau nesubstituit, arilalchil substituit sau nesubstituit sau halo.

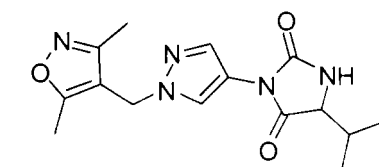
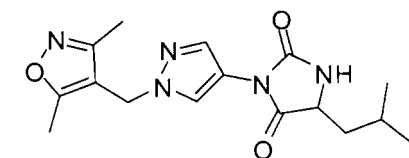
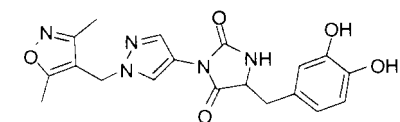
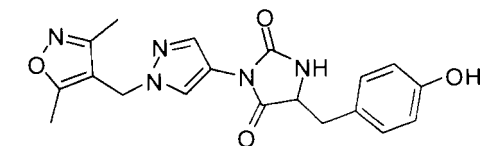
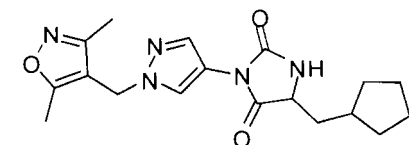
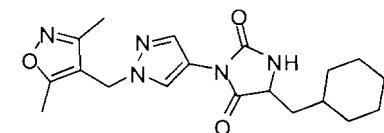
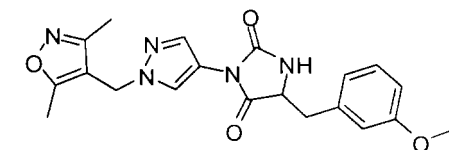
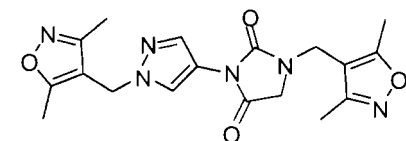
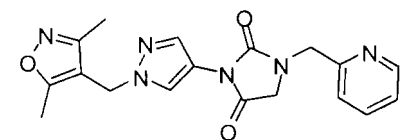
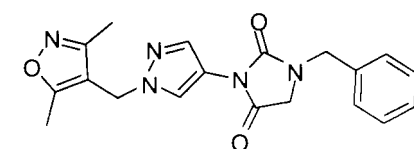
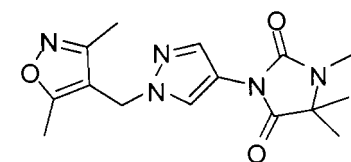
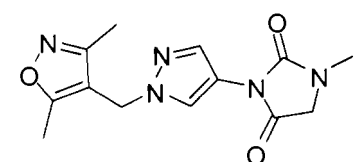
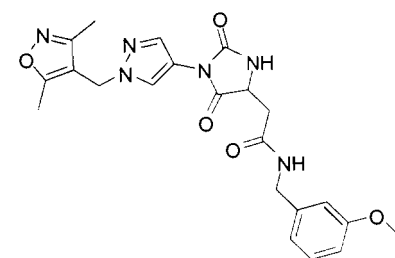
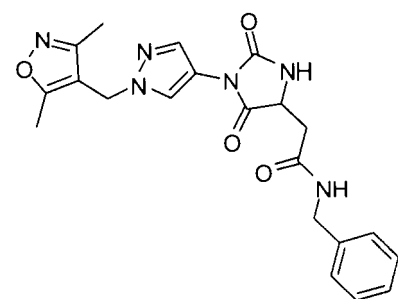
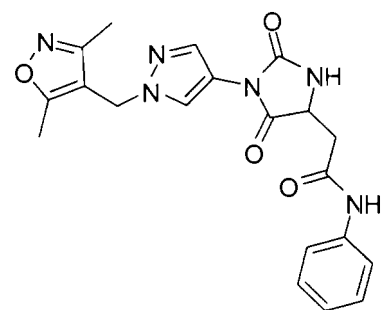
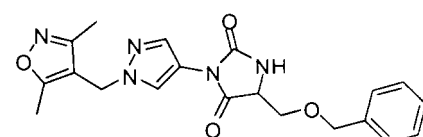
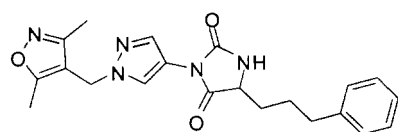
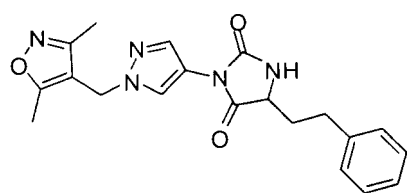
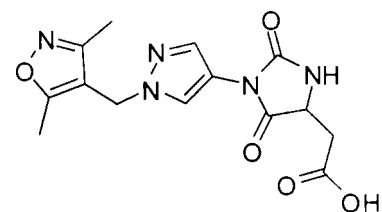
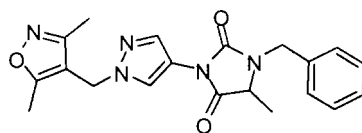
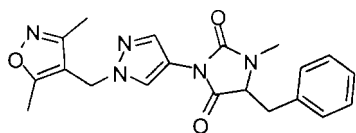
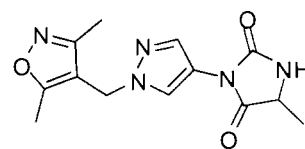
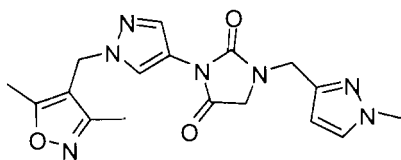
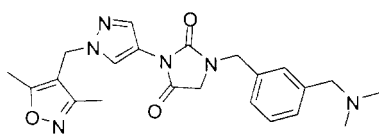
123. Compus cu formula:



406

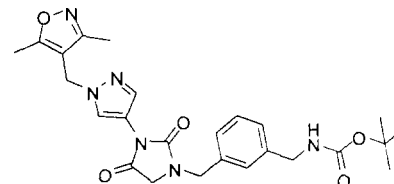
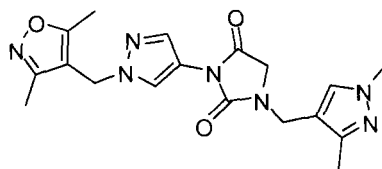
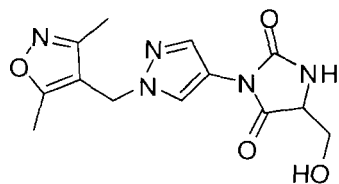
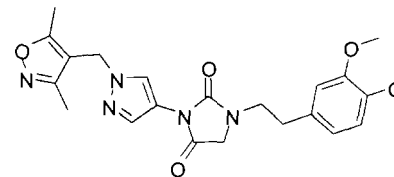
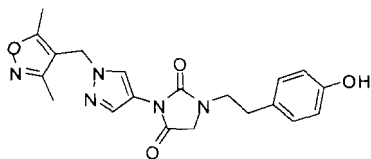
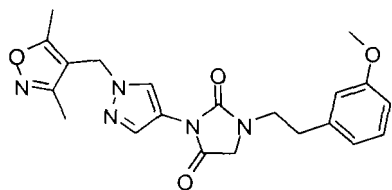
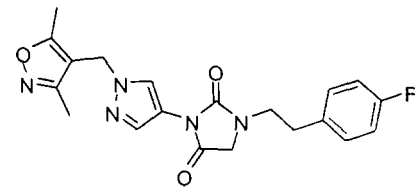
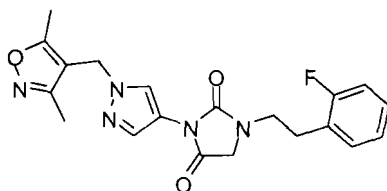
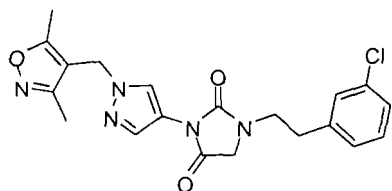
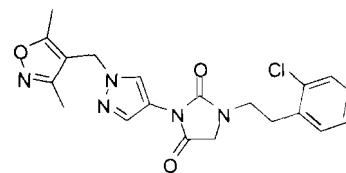
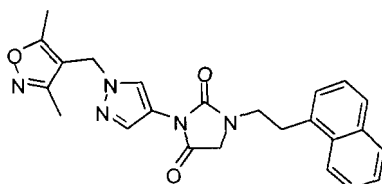
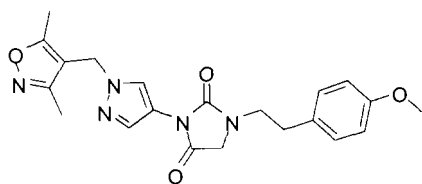
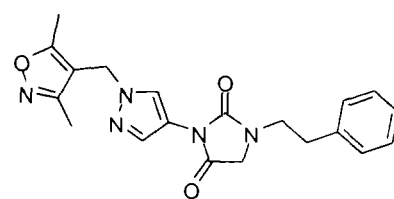
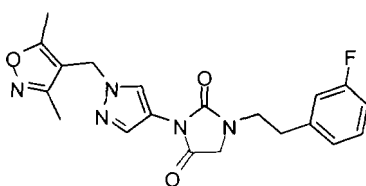
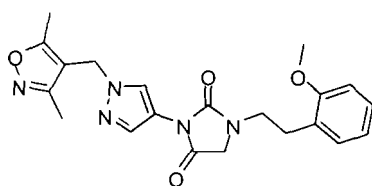
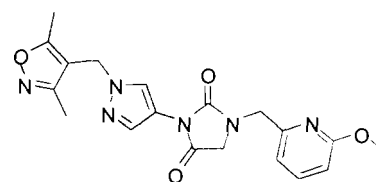
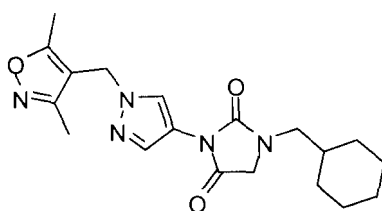
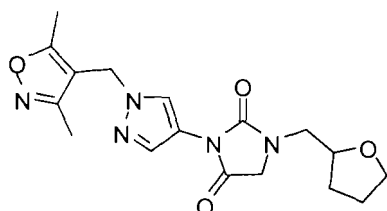
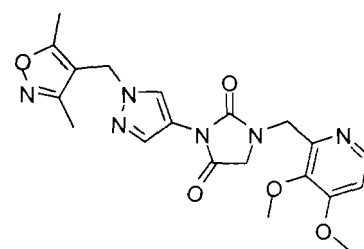
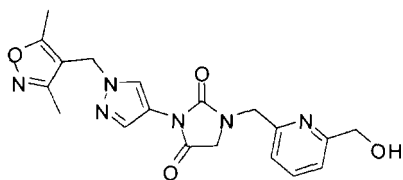
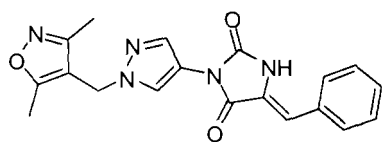


407



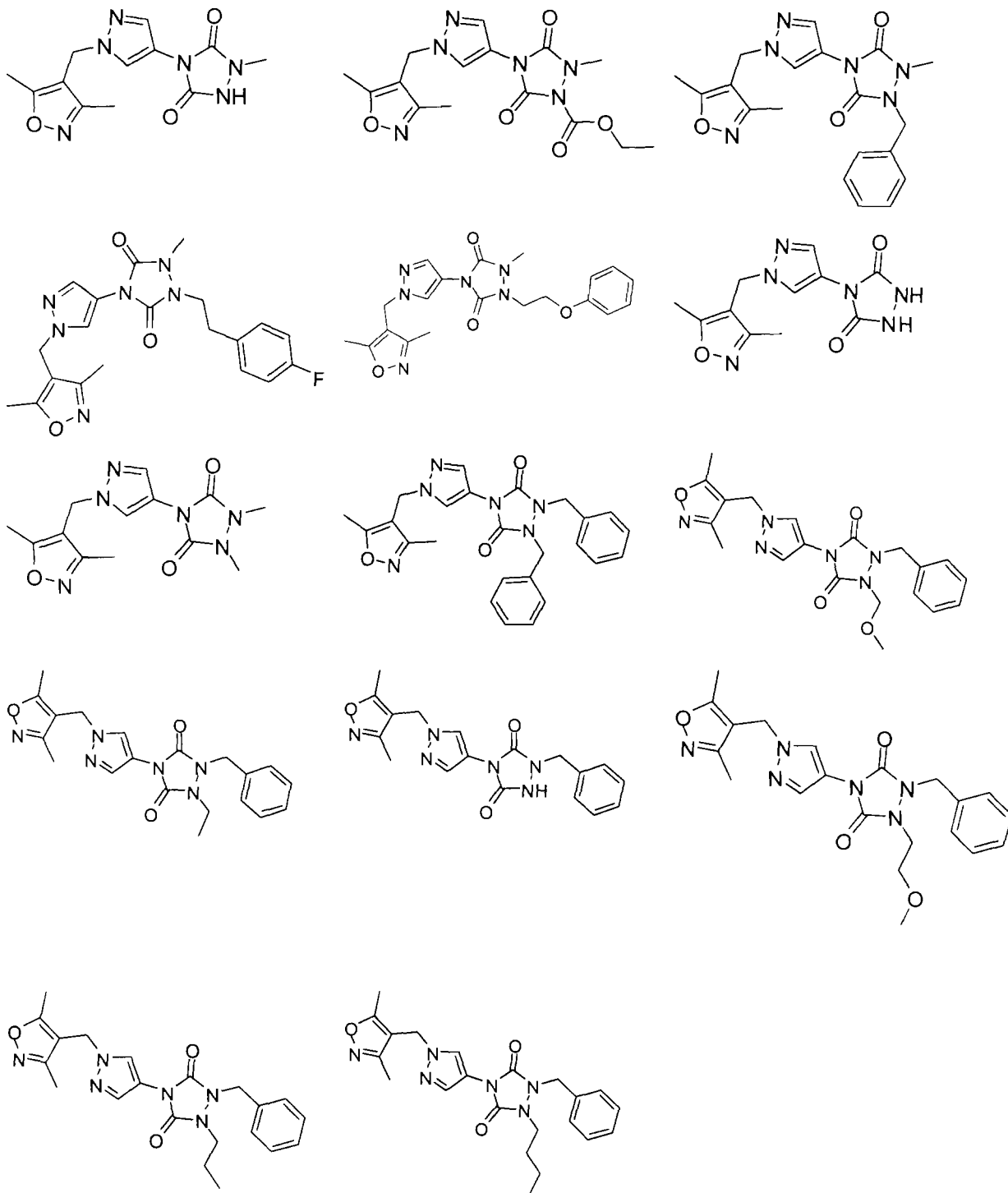
19-08-2008

408



sau o sare, hidrat, solvat, N-oxid sau promedicament al acestuia.

124. Compus cu formula:



sau o sare, hidrat, solvat, N-oxid sau promedicament al acestuia.

125. Metodă de reducere sau atenuare a gustului amar care cuprinde administrarea unei compoziții care cuprinde o cantitate eficace din unul sau a mai mulți compuși ai

uneia dintre revendicările 115-124 sau o sare, hidrat, solvat, N-oxid sau promedicament al acestora.

126. Metoda din revendicarea 125, în care compoziția este un aliment, o băutură sau un medicament.

127. Metoda din revendicarea 125, în care compusul activează cel puțin hT2R8.

128. Metoda din revendicarea 125, în care gustul amar este asociat cu cafeaua sau cu un aliment, băutură sau medicament cu aromă de cafea.

129. Metoda din revendicarea 128, în care cafeaua este o cafea instant sau cafea preparată.

130. Metoda din revendicarea 125, în care cel puțin un compus este un antagonist al hT2R8.

131. Compoziție care cuprinde unul sau mai mulți compuși din una dintre revendicările 115-124 sau o sare, hidrat, solvat, N-oxid sau promedicament al acestuia și unul sau mai mulți purtători acceptabili farmaceutic.

132. Compoziția din revendicarea 131 care este un aliment, băutură sau medicament pentru consumul uman.

133. Cafea sau compoziție de aliment sau băutură sau medicament cu aromă de cafea care cuprinde cel puțin un compus al uneia dintre revendicările 115-124 sau o sare, hidrat, solvat, N-oxid sau promedicament al acestuia.

134. Compoziția din revendicarea 133, în care cel puțin un compus este un antagonist al hT2R8.

135. Compoziția din revendicarea 133, care este cafea instant, cafea măcinată sau cafea preparată.

136. Compoziția din revendicarea 133, care este cafea instant.

137. Compoziție de aliment, băutură sau medicament având un gust amar în care gustul amar menționat este atenuat sau eliminat prin adăugarea unei cantități eficiente dintr-un compus al uneia dintre revendicările 115-124 sau o sare, hidrat, solvat, N-oxid sau promedicament al acestuia.

138. Compoziția din revendicarea 137, în care cel puțin un compus este un antagonist al hT2R8.

139. Compoziția din revendicarea 137, în care băutura menționată este o băutură de cafea instant, o băutură de cafea măcinată sau o băutură de cafea preparată.

140. Compoziția din revendicarea 137, în care băutura menționată este o băutură de cafea instant.

141. Metodă de analiză pentru a detecta sau determina cantitativ dacă gustul amar al unui compus amar dintr-o compoziție este blocat de un compus al uneia dintre revendicările 115-124 sau o sare, hidrat, solvat, N-oxid sau promedicament al acestuia, metoda menționată cuprinzând:

aducerea în contact a unui receptor de gust amar hT2R8 cu o compoziție care conține cel puțin un compus amar care activează cel puțin receptorul de gust amar hT2R8 și

detectarea dacă activarea receptorului hT2R8 menționat este blocat sau inhibat de compusul din una din revendicările 115-124 sau de o sare, hidrat, solvat, N-oxid sau promedicament al acestuia, în care blocarea sau inhibarea menționată indică faptul că gustul amar al compusului menționat sau al unei compoziții care conține compusul poate fi atenuat prin adăugarea unei cantități eficiente dintr-un compus al uneia dintre revendicările 115-124 sau de o sare, hidrat, solvat, N oxid sau pro-medicament al acestuia.

142. Analiza din revendicarea 141, care mai cuprinde un test de gust în care

compusul amar și compusul antagonist menționat sunt testați prin gustare separat și în combinație, pentru a confirma faptul că gustul amar este atenuat de antagonist.

143. Analiza din revendicarea 141, în care receptorul de gust menționat este exprimat pe o membrană celulară.

144. Analiza din revendicarea 141, în care receptorul de gust menționat este exprimat pe o membrană celulară izolată.

145. Analiza din revendicarea 141, în care receptorul de gust menționat este exprimat pe o celulă intactă.

146. Analiza din revendicarea 141, în care receptorul de gust menționat este exprimat pe o celulă eucariotă.

147. Analiza din revendicarea 141, în care receptorul de gust menționat este exprimat de o celulă de amfibian, de mamifer sau de insectă.

148. Analiza din revendicarea 141, în care receptorul de gust menționat este exprimat pe o celulă selectată dintre HEK293, BHK, COS, HEK293T, CHO și ovocitul de *Xenopus*.

149. Analiza din revendicarea 141, care este o analiză fluorimetrică.

150. Analiza din revendicarea 141, care este o analiză de legare.

151. Analiza din revendicarea 141, care detectează efectul asupra compusului menționat prin analizarea efectului său asupra unei concentrații de ioni intracelulari.

152. Analiza din revendicarea 141, care detectează efectul compusului menționat asupra sodiului sau calciului intracelular.

153. Analiza din revendicarea 141, care detectează efectul compusului menționat asupra potențialului de membrană celulară.

154. Analiza din revendicarea 141, care detectează efectul compusului menționat asupra transcrierii unei gene reporter.

155. Analiza din revendicarea 141, care detectează efectul compusului menționat asupra cAMP, cGMP sau IP3 intracelular.

156. Analiza din revendicarea 141, în care receptorul de gust menționat cuprinde domeniul extracelular sau regiunea transmembranară a receptorului de gust menționat.

157. Analiza din revendicarea 141, în care testul menționat detectează modificările calciului folosind un colorant fluorescent specific calciului.

158. Analiza din revendicarea 141, în care testul menționat detectează modificările calciului intracelular folosind un colorant selectat dintre Fluo-3, Fluo-4 și Fura-2.

159. Analiza din revendicarea 141, în care receptorul de gust menționat este în soluție.

160. Analiza din revendicarea 141, care este o analiză de legare ce detectează modificările caracteristicilor spectroscopice, ale caracteristicilor hidrodinamice sau ale solubilității.

161. Analiza din revendicarea 141, care detectează efectul compusului menționat asupra complexării receptorului de gust menționat cu o proteină G.

162. Analiza din revendicarea 141, care detectează efectul compusului menționat asupra complexării receptorului de gust menționat cu o proteină G selectată dintre transducină, gustducină, $G_{\alpha 15}$, $G_{\alpha 16}$ sau o himeră a acestora.

173. Compoziția din revendicarea 172, în care compoziția menționată este un produs alimentar sau de băut.

174. Compoziția din revendicarea 173, în care produsul de băut este o băutură de cafea gata de băut, solubilă și uscată, un amestec de cafea de băut sau un concentrat de cafea de băut.

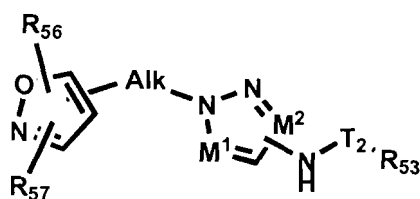
175. Compoziția din revendicarea 173, în care produsul de băut este un adaos pe bază de lapte, un adaos nelactat sau un lapte condensat pentru băuturile de cafea.

176. Compoziția din revendicarea 172, în care compoziția este un produs necomestibil.

177. Compoziția din revendicarea 176, în care produsul necomestibil este un supliment, un nutraceutic, un produs alimentar funcțional, un produs farmaceutic, un OTC, un produs de îngrijire orală sau un produs cosmetic.

178. Compoziția din revendicarea 177, în care produsul de îngrijire orală este o pastă de dinți, apă de gură sau gumă de mestecat.

179. Metodă de obținere a unui compus cu formula:



sau o sare, hidrat, solvat, N-oxid sau promedicament al acestuia,

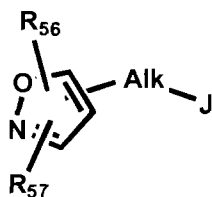
în care Alk este o grupare alchil, întreruptă opțional de un heteroatom;

T₂ este C=S, C=O, sau S(O)₂;

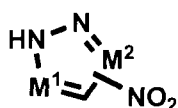
R₅₃ este alchil substituit sau nesubstituit, cicloalchil substituit sau nesubstituit, heteroaril substituit sau nesubstituit, aril substituit sau nesubstituit sau arilalchil substituit sau nesubstituit;

M¹ este N sau CR₅₄, în care R₅₄ este H sau alchil substituit sau nesubstituit;

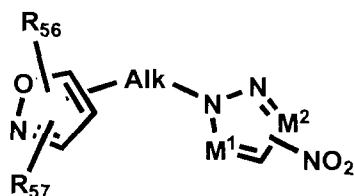
M^2 este N sau CR_{55} , în care R_{55} este H sau alchil substituit sau nesubstituit;
 R_{56} este H, alchil substituit sau nesubstituit, alcoxi substituit sau nesubstituit,
 aril substituit sau nesubstituit, arilalchil substituit sau nesubstituit sau halo; și
 R_{57} este H, alchil substituit sau nesubstituit, alcoxi substituit sau nesubstituit,
 aril substituit sau nesubstituit, arilalchil substituit sau nesubstituit, sau halogen;
 în care metoda cuprinde reacția unui compus cu formula:



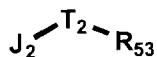
în care R_{56} , R_{57} și Alk sunt definite mai sus și J este o grupare fugace;
 cu un compus cu formula:



în care M^1 și M^2 sunt definite mai sus pentru a da un compus cu formula

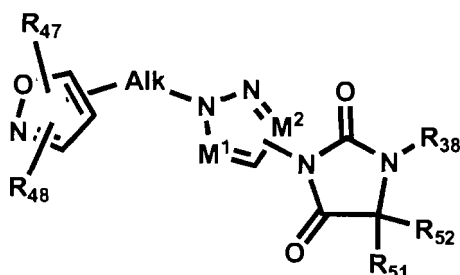


având o grupare NO_2 ;
 reducerea grupării NO_2 pentru a da un compus având o grupare NH_2 ; și
 reacția compusului având o grupare NH_2 cu un compus cu formula

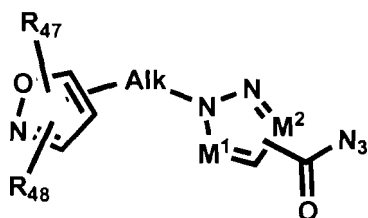


în care J_2 este o grupare fugace și T_2 și R_{53} sunt definite mai sus.

180. Metodă de obținere a compusului cu formula:

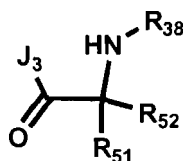


sau o sare, hidrat, solvat, N-oxid sau promedicament al acestuia, în care Alk este o grupare alchil, întreruptă opțional de un heteroatom; R₅₁ și R₅₂ sunt, aceleași sau diferite în mod independent una față de cealaltă, H, alchil substituit sau nesubstituit, cicloalchil alchil substituit sau nesubstituit, heterocicloalchilalchil substituit sau nesubstituit, aril substituit sau nesubstituit, arilamidoalchil substituit sau nesubstituit, arilalchilamidoalchil substituit sau nesubstituit, heteroarilamidoalchil substituit sau nesubstituit, heteroarilalchilamidoalchil substituit sau nesubstituit, arilalchil substituit sau nesubstituit, arilalcoxi substituit sau nesubstituit, heteroaril substituit sau nesubstituit, heteroarilalchil substituit sau nesubstituit, haloalchil sau R₅₁ și R₅₂, împreună cu atomul de carbon la care sunt atașați, formează o grupare alchenil substituit sau nesubstituit; M¹ este N sau CR₄₉, în care R₄₉ este H sau alchil substituit sau nesubstituit; M² este N sau CR₅₀, în care R₅₀ este H sau alchil substituit sau nesubstituit; R₃₈ este H, alchil substituit sau nesubstituit, cicloalchil alchil substituit sau nesubstituit, heterocicloalchilalchil substituit sau nesubstituit, aril substituit sau nesubstituit, arilamidoalchil substituit sau nesubstituit, heteroarilamidoalchil substituit sau nesubstituit, arilalchil substituit sau nesubstituit, arilalcoxi substituit sau nesubstituit, heteroaril substituit sau nesubstituit, heteroarilalchil substituit sau nesubstituit sau haloalchil; R₄₇ este H, alchil substituit sau nesubstituit, alcoxi substituit sau nesubstituit, aril substituit sau nesubstituit, arilalchil substituit sau nesubstituit sau halo; și R₄₈ este H, alchil substituit sau nesubstituit, alcoxi substituit sau nesubstituit, aril substituit sau nesubstituit, arilalchil substituit sau nesubstituit sau halo; în care metoda cuprinde încălzirea unui compus cu formula:



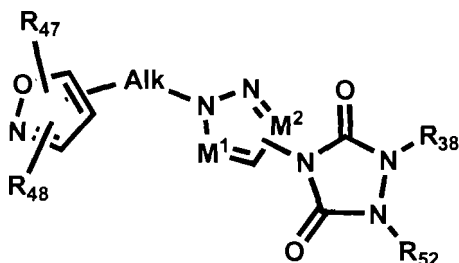
în care R_{47} , R_{48} , Alk, M^1 și M^2 sunt definite mai sus;

pentru a transforma gruparea $-\text{CON}_3$ într-o grupare $-\text{N}=\text{C}=\text{O}$ și apoi reacția cu un compus cu formula:



în care J_3 este o grupare fugace și R_{38} , R_{51} și R_{52} sunt definite mai sus.

181. Metodă de obținere a unui compus cu formula:



sau o sare, hidrat, solvat, N-oxid sau promedicament al acestuia,

în care Alk este o grupare alchil, întreruptă opțional de un heteroatom;

R_{52} este H, alchil substituit sau nesubstituit, cicloalchil alchil substituit sau nesubstituit, heterocicloalchilalchil substituit sau nesubstituit, aril substituit sau nesubstituit, arilamidoalchil substituit sau nesubstituit, arilalchilamidoalchil substituit sau nesubstituit, heteroarilamidoalchil substituit sau nesubstituit, heteroarilalchilamidoalchil substituit sau nesubstituit, arilalchil substituit sau nesubstituit, arilalcoxi substituit sau nesubstituit, heteroaril substituit sau heteroarilalchil nesubstituit, substituit sau nesubstituit, haloalchil;

M^1 este N sau CR_{49} , în care R_{49} este H sau alchil substituit sau nesubstituit;

M^2 este N sau CR_{50} , în care R_{50} este H sau alchil substituit sau nesubstituit;

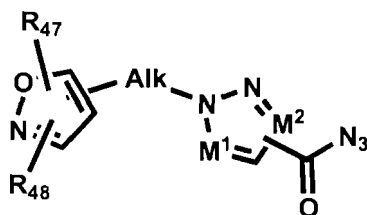
R_{38} este H, alchil substituit sau nesubstituit, cicloalchil alchil substituit sau nesubstituit, heterocicloalchilalchil substituit sau nesubstituit, aril substituit sau nesubstituit, arilamidoalchil substituit sau nesubstituit, heteroarilamidoalchil

substituit sau nesubstituit, arilalchil substituit sau nesubstituit, arilalcoxi substituit sau nesubstituit, heteroaril substituit sau nesubstituit, heteroarilalchil substituit sau nesubstituit sau haloalchil;

R₄₇ este H, alchil substituit sau nesubstituit, alcoxi substituit sau nesubstituit, aril substituit sau nesubstituit, arilalchil substituit sau nesubstituit sau halo; și

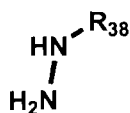
R₄₈ este H, alchil substituit sau nesubstituit, alcoxi substituit sau nesubstituit, aril substituit sau nesubstituit, arilalchil substituit sau nesubstituit sau halo;

în care metoda cuprinde încălzirea unui compus cu formula:



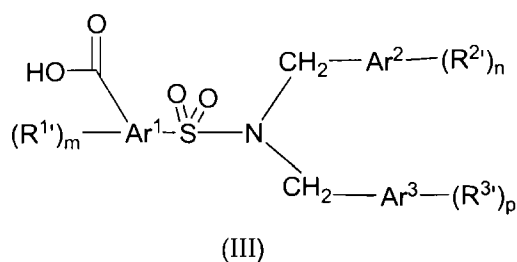
în care R₄₇, R₄₈, Alk, M¹ și M² sunt definite mai sus;

pentru a transforma gruparea –CON₃ într-o grupare –N=C=O și apoi reacția cu o hidrazină cu formula:



în care R₃₈ este definită mai sus.

182. Metodă de obținere a unui compus cu formula:



sau a unei sări, hidrat, solvat sau N-oxid al acestuia în care:

Ar¹, Ar² și Ar³ sunt în mod independent un ciclu aril, heteroaril sau cicloalchil cu cinci sau șase atomi și Ar² și Ar³ pot fi omiși în mod opțional;

m este 0, 1, 2 sau 3;

n și p sunt în mod independent 0, 1, 2, 3 sau 4;

fiecare R^{1'} este selectat în mod independent din grupul constând din hidrogen, halogen, alchil, alchil substituit, aril, substituit aril, arilalchil, arilalchil substituit,

163. Analiza din revendicarea 141, care este o analiză de polarizare a fluorescenței.

164. Analiza din revendicarea 141, în care receptorul de gust menționat este atașat la un substrat în fază solidă.

165. Analiza din revendicarea 141, care este o analiză cu grad ridicat de procesare.

166. Analiza din revendicarea 141, în care receptorul de gust este exprimat printr-o celulă HEK293.

167. Metodă pentru identificarea unui motiv de legare conservat prezent în diferite T2R umane care cuprinde expunerea membranei celulare a unei celule la un compus al uneia dintre revendicările 115-124 sau la o sare, hidrat, solvat, N-oxid sau promedicament al acestuia.

168. Un GPCR himeră proiectat să conțină motivul identificat prin metoda din revendicarea 167.

169. Metodă de reducere sau atenuare a gustului amar într-o compoziție pentru ingestia de către oameni sau animale, care cuprinde adăugarea unuia sau mai multor compuși ai uneia dintre revendicările 115-124 sau a unei sări, hidrat, solvat, N-oxid sau promedicament al acestuia la compoziție, la o concentrație eficientă pentru a atenua sau a reduce gustul amar asociat cu compoziție.

170. Metoda din revendicarea 169, în care concentrația unuia sau mai multor compuși este de la circa 0,1 ppm la circa 100 ppm.

171. Metoda din revendicarea 169, în care concentrația unuia sau mai multor compuși este de la circa 1 ppm la circa 25 ppm.

172. Compoziție pentru ingestia de către oameni sau animale care cuprinde unul sau mai mulți compuși ai uneia dintre revendicările 115-124 sau o sare, hidrat, solvat, N-oxid sau promedicament al acestuia.

acil, acil substituit, heteroalchil, heteroalchil substituit, heteroaril, substituit heteroaril, heteroarilalchil, heteroarilalchil substituit, 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) și P(O)(R⁵)(OR⁶);

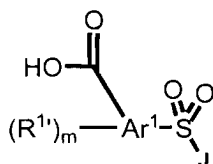
fiecare R^{2'} este selectat în mod independent din grupul constând din hidrogen, halogen, alchil, alchil substituit, aril, aril substituit, arilalchil, arilalchil substituit, acil, acil substituit, heteroalchil, heteroalchil substituit, heteroaril, heteroaril substituit, heteroarilalchil, heteroarilalchil substituit, 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) și P(O)(R⁵)(OR⁶);

fiecare R^{3'} este selectat în mod independent din grupul constând din hidrogen, halogen, alchil, alchil substituit, aril, aril substituit, arilalchil, arilalchil substituit, acil, acil substituit, heteroalchil, heteroalchil substituit, heteroaril, heteroaril substituit, heteroarilalchil, heteroarilalchil substituit, 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) și P(O)(R⁵)(OR⁶);

R⁵-R⁸ sunt în mod independent hidrogen, alchil, alchil substituit, aril, aril substituit, arilalchil, arilalchil substituit, heteroalchil, heteroalchil substituit, heteroaril, heteroaril substituit, heteroarilalchil sau heteroarilalchil substituit sau, în mod alternativ, R⁶ și R⁷, R⁷ și R⁸ împreună cu atomii de care sunt legați formează un ciclu cicloheteroalchil sau cicloheteroalchil substituit;

b este 0, 1, sau 2;

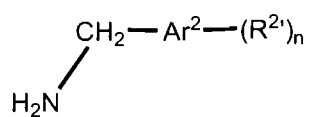
în care metoda cuprinde reacția unui compus cu formula:



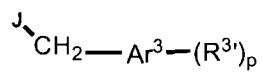
în care J este o grupare fugace;

cu un compus cu formula:

421



pentru a da un produs; și
reacția produsului cu un compus cu formula:



în care J este o grupare fugace.

Fig. 1 Frațiunea de cafea amară care activează hT2R8 și hT2R14

[Frațiunea de cafea] = 1 mg/mL

Colorant albastru = 1.9 mM FD&C 1

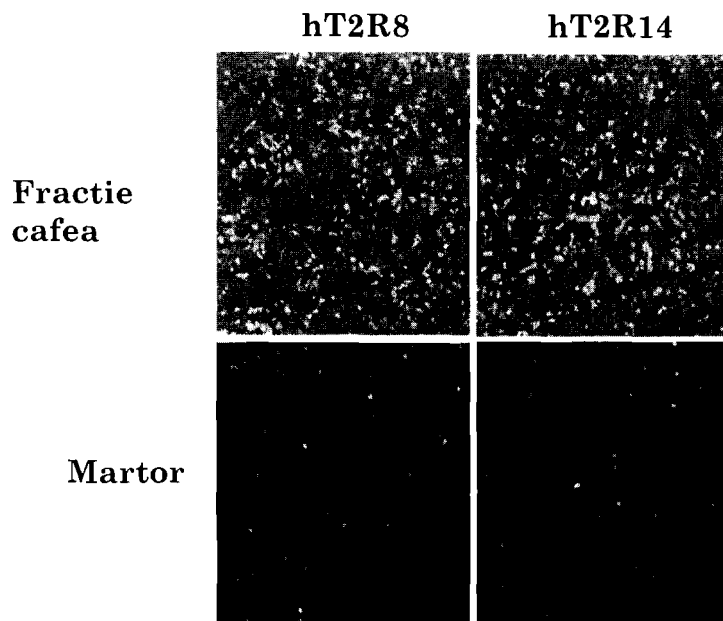


Fig. 2 Răspunsul dependent de doză al hT2R8 și hT2R14 față de fracțiunea de cafea

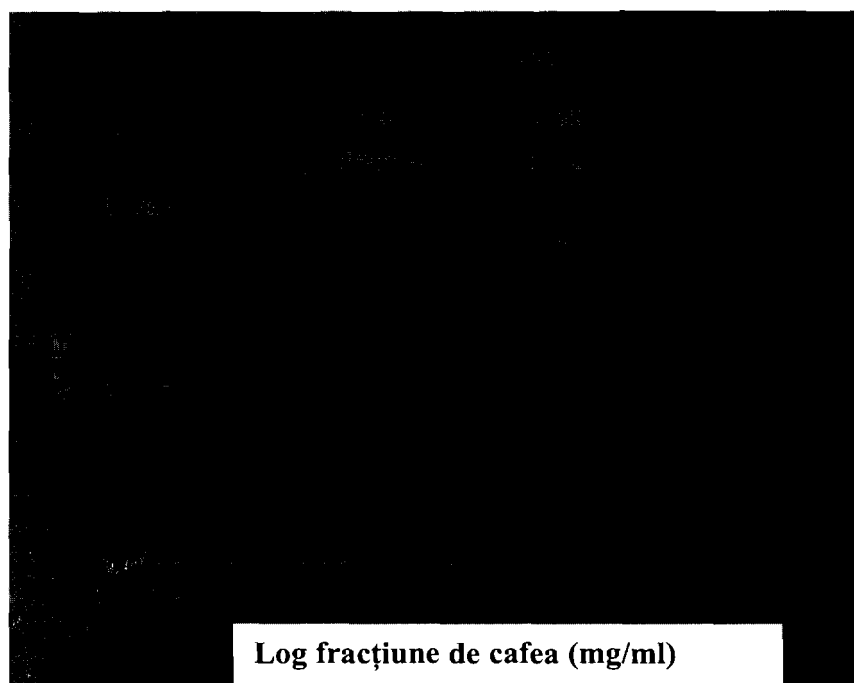


Fig. 3 Curbele de inhibare dependentă de doză pentru compusul A și B asupra liniei celulare stabile hT2R8

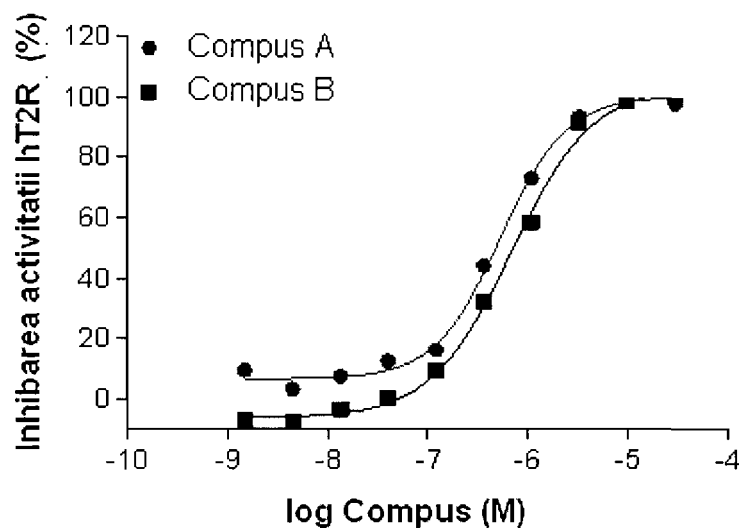


Fig. 4 Curbele de inhibare dependentă de doză pentru compusul C asupra liniei celulare stabile hT2R14

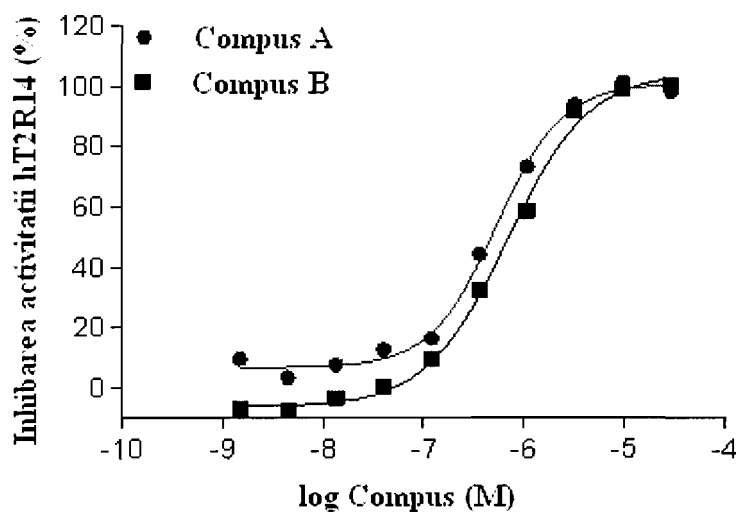


Figura 5 Activitatea inhibitoare a S5105 asupra 22hT2R

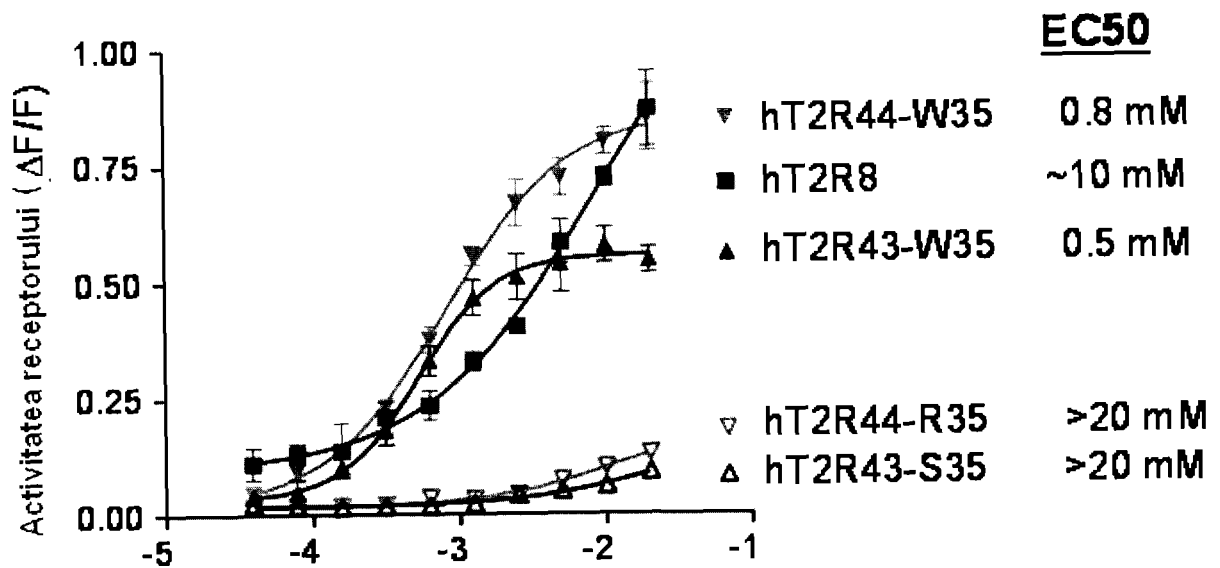
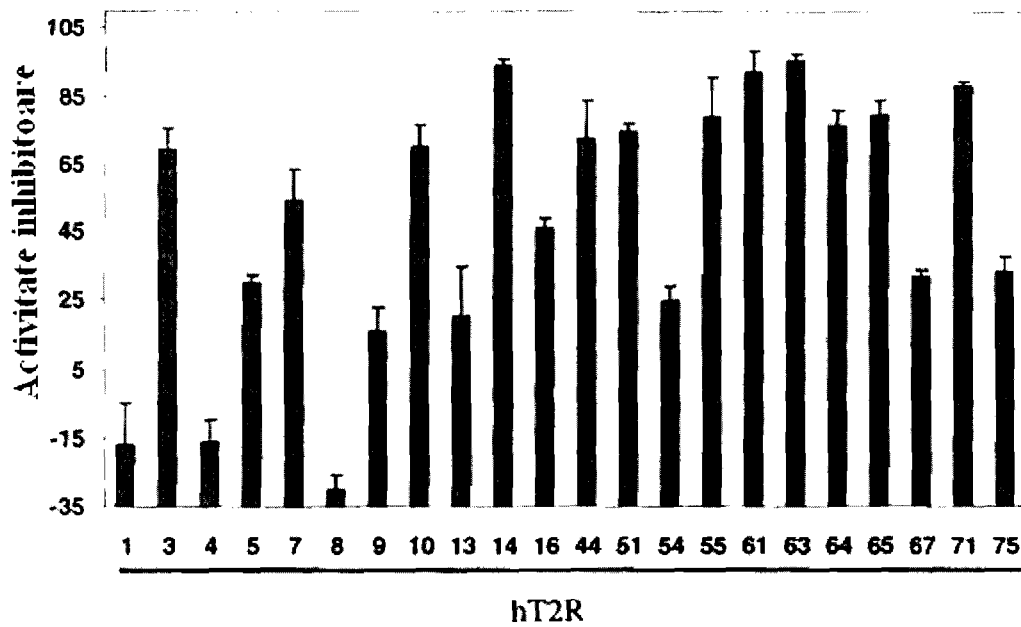


FIG. 6