



República Federativa do Brasil

Ministério do Desenvolvimento, Indústria,
Comércio e Serviços

Instituto Nacional da Propriedade Industrial

(11) PI 0815634-4 B1

(22) Data do Depósito: 19/08/2008

(45) Data de Concessão: 09/01/2024

(54) Título: RECEPTORES T2R HUMANOS QUE RESPONDEM A COMPOSTOS AMARGOS QUE CAUSAM GOSTO AMARGO NAS COMPOSIÇÕES E SEUS MÉTODOS DE PRODUÇÃO, BEM COMO MÉTODO DE REDUÇÃO OU ALÍVIO DO SABOR AMARGO EM UMA COMPOSIÇÃO, COMPOSIÇÃO DE ALIMENTO, BEBIDA OU MEDICAMENTO OU COMPOSIÇÃO DE UM PRODUTO NÃO-COMESTÍVEL

(51) Int.Cl.: G01N 33/53.

(30) Prioridade Unionista: 21/08/2007 US 60/957,129; 23/04/2008 US 61/047,187.

(73) Titular(es): FIRMENICH INCORPORATED.

(72) Inventor(es): XIAODONG LI; ANDREW PATRON; HONG XU; QING LI; ALEXEY PRONIN; GUY SERVANT; THOMAS BRADY; VINCENT DARMOHUSODO; MELISSA ARELLANO; VICTOR SELCHAU; BRETT WEYLAN CHING; DONALD S. KARANEWSKY; PAUL BRUST; JING LING; WEN ZHAO; CHAD PRIEST; LAN ZHANG; CATHERINE TACHDJIAN.

(86) Pedido PCT: PCT US2008009864 de 19/08/2008

(87) Publicação PCT: WO 2009/025793 de 26/02/2009

(85) Data do Início da Fase Nacional: 19/02/2010

(57) Resumo: IDENTIFICAÇÃO DE RECEPTORES T2R HUMANOS QUE RESPONDEM A COMPOSTOS AMARGOS QUE CAUSAM GOSTO AMARGO NAS COMPOSIÇÕES, E SEU USO EM ENSAIOS PARA IDENTIFICAR COMPOSTOS QUE INIBEM (BLOQUEIAM) O GOSTO AMARGO EM COMPOSIÇÕES E SEU USO. A presente invenção refere-se receptores humanos específicos de à descoberta de que sabor na família de receptores de sabor T2R respondem a particulares compostos amargos presentes em, por exemplo, café. Além disso, a invenção refere-se à descoberta de compostos e composições específicos contendo aquela função como bloqueadores de sabor amargo e o uso do mesmo como bloqueadores de sabor amargo ou moduladores de sabor em, por exemplo, café, alimentos, bebidas e medicamentos com sabor café. Além disso, a presente invenção refere-se à descoberta de um composto que antagoniza vários T2Rs humanos diferentes e o uso do em ensaios como bloqueadores de sabor amargo em composições para ingestão por humanos e animais.

**RECEPTORES T2R HUMANOS QUE RESPONDEM A COMPOSTOS AMARGOS QUE
CAUSAM GOSTO AMARGO NAS COMPOSIÇÕES E SEUS MÉTODOS DE
PRODUÇÃO, BEM COMO MÉTODO DE REDUÇÃO OU ALÍVIO DO SABOR
AMARGO EM UMA COMPOSIÇÃO, COMPOSIÇÃO DE ALIMENTO, BEBIDA OU
5 MEDICAMENTO OU COMPOSIÇÃO DE UM PRODUTO NÃO-COMESTÍVEL**

PEDIDOS RELACIONADOS

Este pedido reivindica o benefício do Pedido de Patente de Aplicação U.S. No. de Série 60/957.129, protocolado em 21 de agosto de 2007 e Pedido de Patente de Aplicação U.S. No. de Série 61/047.187, protocolado em 23 de abril de 2008 e refere-se ao Pedido de Patente de Aplicação U.S. No. de Série No. 11/766.974, que é uma prorrogação parcial do Pedido de Patente de Aplicação U.S. No. de Série 11/555.617 protocolado em 1 de novembro de 2006, que é uma prorrogação parcial do Pedido de Aplicação U. S. No. de Série 10/191.058 protocolado em 10 de julho de 2002, que ainda é um pedido de prorrogação do Pedido U. S. No. de Série 10/742.209 protocolado em 1 de dezembro de 2003, que é um Pedido de Patente de Divisão U. S. No. de Série 09/825.882 protocolado em 5 de abril de 2001, agora Patente No. 7.105.650, todos os pedidos estão incorporados para referência em suas totalidades.

CAMPO DA INVENÇÃO

Este pedido refere-se à identificação de receptores de sabor tipo 2 humanos (hT2Rs) e o uso dos mesmos em ensaios para a identificação de ligantes que ativam T2Rs específicos. Estes ligantes são úteis para modular a percepção de sabor, particularmente do sabor amargo. Em nossos pedidos de patentes anteriores, descrevemos a expressão funcional dos receptores de sabor amargo humanos incluindo hT2R8 e hT2R14. Neste pedido de patente, relatamos que hT2R8 e hT2R14 são ativados por uma fração amarga enriquecida de café, também relatamos a identificação de antagonistas de hT2R8 e hT2R14 usando um ensaio de triagem de alto rendimento, e as combinações dos antagonistas pode reduzir o sabor amargo do café e frações de café. Esta invenção fornece um método para modificar e melhorar o sabor de bebidas de café.

Especificamente, a presente invenção refere-se ao uso de hT2R8 e/ou hT2R14 em ensaios de triagem e testes de degustação para identificar compostos que inibem (bloqueiam) o sabor amargo do café e outros alimentos e bebidas.

5 Ainda, esta invenção refere-se à descoberta de um ligante que tem amplas propriedades de antagonista de amargor, ou seja, bloqueia ou inibe consideravelmente a ativação de muitos (13) receptores de amargor diferentes através de um conjunto de ligantes e bloqueia ou inibe a
10 ativação de outros seis receptores de amargor bem como inibe a amargura produzida por alguns compostos amargos para os quais o(s) receptor(es) que eles interagem ainda não foram elucidados.

Mais especificamente, esta invenção refere-se à
15 descoberta de um ligante referido aqui como composto C que tem amplas propriedades de antagonista de amargor, ou seja, bloqueia ou inibe consideravelmente a ativação dos receptores de sabor amargo hT2R3, 7, 10, 16, 44, 51, 55, 61, 63, 64, 65 e 71 através de um conjunto de ligantes de amargor e bloqueia
20 ou inibe a ativação de seis outros receptores de sabor amargo, ou seja, 5, 9, 13, 54, 67 e 75, bem como inibe a amargura produzida por alguns compostos para os quais o(s) receptor(es) que eles interagem ainda não foram elucidados.

Ainda, mais especificamente, a invenção fornece a
25 descoberta de que este composto antagonista reduz o sabor amargo da salicina, um antagonista de hT2R16, e feniltiourea, um agonista de hT2R51.

Ainda mais especificamente, esta invenção fornece a descoberta que estes mesmos compostos antagonistas bloqueiam
30 o sabor amargo produzido por compostos amargos que ativam múltiplos receptores de sabor amargo, incluindo omeprazol que ativa hT2R10, 14 e 75; Rebaudiosídeo A, um adoçante natural que ativa pelo menos 7 receptores de sabor amargo e que este mesmo antagonista ainda inibe também o sabor amargo produzido
35 por compostos amargos onde o(s) receptor(es) com os quais

interagem são desconhecidos incluindo dextrometorfano e difenidramina.

Baseado nisso, a invenção refere-se ao uso deste composto em alimentos, bebidas, medicamentos e outros
5 produtos ingestíveis com o objetivo de aliviar o sabor amargo dos mesmos, incluindo o sabor amargo produzido por ligantes ou compostos amargos não identificados onde o amargor envolve a ativação de múltiplos receptores de amargor ou para compostos amargos onde a especificidade do receptor do mesmo
10 não é determinada.

Ainda, com base nisso, a invenção refere-se ao uso deste antagonista para elucidar uma ideia presente conservada em diferentes T2Rs humanos que estão envolvidos em ligantes que fazem ligação e a ativação de T2R e o desenho de receptores
15 de proteína G acoplada (GPCRs) quiméricos e mutados que são projetados para conter esta ideia.

Além disso, a invenção refere-se a qualquer um dos compostos identificados usando estes testes de triagem e o uso dos mesmos em alimentos, bebidas e medicamentos incluindo
20 alimentos, bebidas e medicamentos com sabor de café.

DESCRIÇÃO DETALHADA DA TÉCNICA

Uma das modalidades básicas de sabor que o homem reconhece é o amargor. A fisiologia do sabor amargo até quase recentemente era muito pouco entendida. Estudos
25 recentes começaram a elucidar a biologia do sabor (Lindemann, Nature (2001)). Agora se sabe que muitos compostos amargos produzem sabor amargo ao interagirem com receptores de superfície celular. Estes receptores pertencem à família de sete receptores de domínio transmembranar que interagem com
30 as proteínas G intracelular. Uma nova família de GPCRs, chamada de T2Rs, foi identificada em humanos e roedores (Adler et al., Cell 100(6):693-702 (2000); Chandrashekar et al., Cell 100(6): 703-711 (2000); Matsunami H, Montmayeur J P, Buck L B. Nature 404(6778): 601-4 (2000)). Várias linhas
35 de evidência anteriores ao objeto da invenção sugeriram que T2Rs medeiam respostas a compostos amargos. Primeiro, os

genes T2R são especificamente expressos no sub-conjunto de receptores de sabor em células da língua e do epitélio do palato. Segundo, o gene para um dos T2Rs humanos (hT2R1) está localizado em um locus cromossomal que está ligado à

5 sensibilidade de compostos amargos 6-n-propil-2-tiouracila em humanos (Adler et al., (Id.) 2000)). Terceiro, um dos T2Rs do camundongo (mT2R5) está localizado em um locus cromossomal que está ligado à sensibilidade de compostos amargos cicloheximida em camundongos. Também foi demonstrado que

10 mT2R5 pode ativa gustducina, uma proteína G expressa especificamente em células de sabor e ligada à transdução de estímulos amargos (Wong et al., Nature 381:796-800 (1996)). A ativação de gustducina por mT2R5 ocorre somente em resposta à cicloheximida (Chandrashekar et al., (Id.) (2000)). Assim,

15 foi proposto que a família de mT2R media a resposta ao sabor amargo em camundongos, enquanto que a família de hT2R media dia Somente um T2R humano foi sugerido como tendo identificado o ligante de amargor— demonstrou-se que hT2R4 foi ativado por denatônio(Chandrashekar et al., (Id.) 2000)).

20 No entanto, concentrações efetivas de denatônio usadas no estudo (1,5 mM) foram extraordinariamente altas, ou seja foram 10^5 vezes maiores do que o limiar de amargor relatado para denatônio em humanos (Saroli, Naturwissenschaften 71:428-429 (1984)). Assim, nenhum ligante específico de

25 amargor foi convincentemente ligado a qualquer hT2R. Também foi sugerido que cada hT2R está apto a ligar a múltiplos ligantes de amargor. Esta hipótese está baseada no fato de que a família hT2R consiste em somente 25 membros identificados, enquanto que os humanos podem reconhecer

30 centenas de compostos diferentes como amargos. As sequências de hT2Rs foram anteriormente relatadas e são descritas nos pedidos de PCT publicados por Zuker et al. (WO 01/18050 A2, (2001)) e Adler et al. (WO 01/77676 A1 (2001)) ambos estão incorporados aqui em sua totalidade para

35 referência.

Uma das dificuldades de estudar as funções de T2R é que estes receptores não são prontamente expressos em linhagens celulares de mamíferos. Para melhorar a expressão de T2R em sequência N-terminal de GPCR bem expressa, a rodopsina foi ligada à sequências de T2R (Chandrashekar et al., (Id.) 2000). Esta ligação N-terminal também permitiu o fácil monitoramento da expressão de proteína devido à anticorpo disponível. Além disso, a ligação SSTR2 marcada (Bufe et al., Nat. Genet. 32: 397-400 (2002)), uma ligação N-terminal diferente tem sido usada para melhorar a expressão de T2R. Enquanto que a incorporação da ligação de rodopsina melhorou a expressão de alguns T2Rs em linhagens celulares de mamíferos, muitos deles ainda não foram expressos suficientemente bem para estudos funcionais. Em uma abordagem diferente, mT2R5 foi expresso com sucesso em células Sf9 de insetos e usado para estudos funcionais usando ensaio bioquímico de ligação GTPγS (Chandrashekar et al., (Id.) 2000).

Em pedidos de patentes mais recentes, Pedido U.S. No. de Série 09/825.882, agora Patete U.S. No. 7.105.650, os Requerentes identificaram e forneceram as sequências de ácido nucleico e sequências de polipeptídeo para um número de novos receptores de sabor humanos incluindo hT2R51, hT2R54, hT2R55, hT2R61, hT2R63, hT2R64, hT2R65, hT2R67, hT2R71 e hT2R75. Adicionalmente ao Pedido de Patente U.S. Nos. de Série 11/182.942 e 10/628.464, as totalidades dos quais estão incorporadas aqui para referência, os Requerentes forneceram a sequência de polipeptídeo e DNA para outro novo receptor de sabor humano identificado chamado aqui de hT2R76.

Ainda, o Pedido U.S. No. de Série 10/191.058 incorporado aqui para referência em sua totalidade, os Requerentes descobriram ligantes que ativam especificamente os diferentes T2Rs humanos. Adicionalmente, os Requerentes protocolaram recentemente o Pedido U.S. No. de Série 11/455.693, a totalidade do qual está incorporado aqui para referência, que identificou ainda ligantes amargos que se ligam

especificamente a outros T2Rs humanos e fornecem ensaios associados.

Ainda, referente às utilidades práticas da invenção, foi relatado que ambos os receptores T2Rs e T1Rs são expressos no sistema gastrointestinal. Por exemplo, Wu et al., Proc, Natl. Acad. Sci, USA 99(4): 2392-7(2002) relataram que os T2Rs são expressos em células enteroendócrinas (células STC1) bem como subunidades gustducina e transducina e estas células possivelmente respondem a ligantes amargos no trato gastrointestinal. Ainda, foi relatado por Chen et al., AM J. Physiol. Cell Physiol. 291(4): C726-39 (2006) que o estímulo de sabor amargo induz sinalização Ca^{++} e liberação de colecistocinina (CCK) em células STC-1 enteroendócrinas. Ainda, Rozengurt, A J Physiol Gastrointest Liver Physiol 291(2):G171-7 (2006) relataram que os receptores no intestino provavelmente desempenham um papel a nível molecular no controle das funções digestivas e vias hormonais e/ou neuronais e eles podem desempenhar um papel na detecção de drogas perigosas e respostas à sobrevivência. Além disso, Sternini Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol. 292(2): G457-61 (2007) relataram que os receptores de sabor no intestino podem estar envolvidos nas funções gastrointestinais como detecção molecular, absorção de nutrientes, proteção contra substâncias perigosas e ainda sugerem que um entendimento destes mecanismos pode ser relevante para estados de doenças e condições como distúrbios alimentares e inflamação. Ainda, tem sido recentemente sugerido por Mace et al., J Physiol. 2007 (Epub) que T2Rs e T1Rs ativam a fosfolipase C beta 2, PLC beta 2 e que provavelmente há sistema de detecção molecular intestinal no intestino semelhante ao presente em células da língua e que células gastrointestinais como as células em escova ou células quimiosensoras solitárias que expressam receptores podem resultar no aumento de GLUT2 e podem desempenhar um papel na detecção de nutrientes e nutrição no tratamento de obesidade e diabetes. Ainda, Cui et al, Curr Pharm Des. 12(35): 4591-

600 (2006) sugerem que T1Rs expressas no intestino podem ser usadas em ensaios para compostos no tratamento da obesidade e diabetes como adoçantes artificiais.

No entanto, não obstante o que foi relatado e o
5 entendimento de que membros T2R regulam o sabor amargo, e seus possíveis papéis nas funções gastrintestinais existe uma necessidade para a identificação de ligantes específicos que ativam os receptores de sabor amargo T2R humanos. Um maior entendimento das propriedades de ligação de diferentes T2Rs,
10 particularmente T2Rs humanos, seria altamente benéfico uma vez que irá melhorar a facilidade de uso dos mesmos em compostos selecionados contendo as propriedades modulatórias de sabor desejadas, ou seja, que bloqueiam ou inibam o sabor de compostos amargos específicos. Além disso, fornecerá a
15 identificação de compostos para tratar e modular as funções gastrintestinais e doenças relacionadas como obesidade, diabetes absorção de alimentos, detecção de alimentos, distúrbios alimentares e a regulação de hormônios e peptídeos relacionados como GLUT2, colecistocinina et al.

20 **RESUMO DA INVENÇÃO**

Nesta direção, a presente invenção refere-se à descoberta de que hT2R8 e hT2R14 são ativados por uma fração de café enriquecida em amargor.

Ainda, a presente invenção refere-se ao uso do mesmo
25 para a identificação de antagonistas para hT2R8 e hT2R14 que inibem ou bloqueiam o sabor amargo de café e alimentos, bebidas e medicamentos associados a sabor de café.

Além disso, a invenção refere-se a compostos antagonistas específicos (bloqueadores de amargor) que inibem
30 o sabor amargo do café e alimentos, bebidos e medicamentos com sabor de café.

Ainda, esta invenção refere-se à descoberta de um ligante que tem amplas propriedades de antagonista de amargor, ou seja, bloqueia ou inibe consideravelmente a
35 ativação de muitos (13) receptores de amargor diferentes através de um conjunto de ligantes e bloqueia ou inibe a

ativação de outros seis receptores de amargor bem como inibe a amargura produzida por alguns compostos amargos para os quais o(s) receptor(es) que eles interagem ainda não foram elucidados.

5 Mais especificamente, esta invenção refere-se à descoberta de um ligante referido aqui como composto C que tem amplas propriedades de antagonista de amargor, ou seja, bloqueia ou inibe consideravelmente a ativação dos receptores de sabor amargo hT2R3, 7, 10, 16, 44, 51, 55, 61, 63, 64, 65
10 e 71 através de um conjunto de ligantes de amargor e bloqueia ou inibe a ativação de seis outros receptores de sabor amargo, ou seja, 5, 9, 13, 54, 67 e 75, bem como inibe a amargura produzida por alguns compostos para os quais o(s) receptor(es) que eles interagem ainda não foram elucidados.

15 Ainda, mais especificamente, a invenção fornece a descoberta de que este composto antagonista reduz o sabor amargo da salicina, um antagonista de hT2R16, e feniltioureia, um agonista de hT2R51.

Ainda mais especificamente, esta invenção fornece a
20 descoberta de que estes mesmos compostos antagonistas bloqueiam o sabor amargo produzido por compostos amargos que ativam múltiplos receptores de sabor amargo, incluindo omeprazol, um composto que ativa hT2R10, 14 e 75; Rebaudiosídeo A, um adoçante natural que ativa pelo menos 7
25 receptores de sabor amargo e que este mesmo antagonista ainda inibe também o sabor amargo produzido por compostos amargos onde o(s) receptor(es) com os quais interagem são desconhecidos incluindo dextrometorfano e difenidramina.

Baseado nisso, a invenção refere-se ao uso deste e
30 composto relacionados, de acordo com a invenção, em alimentos, bebidas, medicamentos e outros produtos ingestíveis com o objetivo de aliviar o sabor amargo dos mesmo, incluindo o sabor amargo produzido por ligantes ou compostos amargos não identificados onde o amargor envolve a
35 ativação de múltiplos receptores de amargor ou por compostos

amargos onde a especificidade do receptor do mesmo não é determinada.

Ainda, a presente invenção refere-se a alimentos, bebidas e medicamentos que contêm uma quantidade de pelo
5 menos um dos compostos antagonistas de amargor identificados suficiente para inibir ou bloquear o sabor amargo dos mesmos.

As descobertas inventivas foram realizadas usando ensaios baseados em células que mediram a atividade de T2Rs usando células que expressam um T2R particular na presença ou
10 ausência de ligantes específicos de amargor. Em particular, como descrito abaixo em maiores detalhes, a linhagem de células HEK expressando os TT2Rs específicos acima identificados em suas superfícies e que ainda expressa uma proteína G quimérica que se acopla funcionalmente aos ditos
15 T2Rs foram usadas em ensaios baseados em células que detectaram alterações nas concentrações de cálcio intracelular e descobriu-se que são especificamente ativados por compostos amargos específicos enquanto que outros T2Rs não foram ativados sob condições semelhantes.

Portanto, a invenção engloba o uso destes receptores de
20 sabor humanos em ensaios, preferencialmente em ensaios de alto rendimento, para identificar outros compostos que modulem, preferencialmente bloqueando, a ativação destes receptores através destes outros compostos amargos presentes
25 no café e bebidas e alimentos relacionados.

Ainda, a invenção refere-se ao uso destes receptores para identificar compostos, particularmente aqueles presentes no café e bebidas, alimentos e medicamentos com sabor de café que produzam o sabor amargo.

Ainda, a invenção refere-se ao uso de um composto antagonista que possui uma ampla faixa de propriedades antagonistas para uso em ensaios e testes in vitro e in vivo para identificar composto(s) amargo(s) ou frações amargas para as quais este composto iniba o sabor amargo produzido
35 e/ou iniba a ativação de um ou mais receptores de sabor

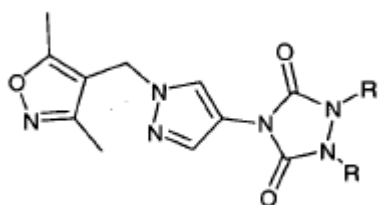
amargo pelo composto amargo ou uma fração contendo este composto amargo.

Além disso, a invenção refere-se especificamente ao uso deste antagonista de ampla ação em alimentos, bebidas e
5 medicamentos e outros produtos consumidos para ingestão por humanos e animais onde o sabor amargo é desejavelmente aliviado.

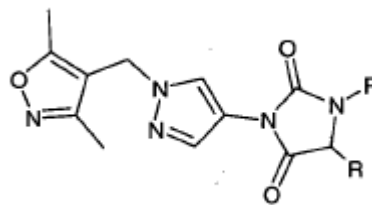
A invenção também engloba ensaios que incluem uma etapa adicional que avalia o efeito dos compostos identificados que
10 modulam em humanos ou outros testes de degustação e, que particularmente, avaliam o efeito dos compostos identificados em sabor amargo, principalmente em sabor amargo produzido por café e frações derivadas de café contendo um ou mais compostos que produzam percepção de sabor amargo.

Além disso, a invenção engloba a produção de café e
15 bebidas, alimentos e medicamentos com sabor de café que foram tratados para remover compostos que ativam especificamente estes receptores de sabor amargo, por exemplo, alimentos e bebidas que foram processados para remover ou reduzir a
20 quantidade de compostos amargos compreendidos ali.

Em alguns aspectos, a invenção também refere-se às classes estruturais de compostos representados pelas duas matrizes abaixo apresentadas. A Matriz 1 mostra uma matriz
representativa de urazol e a matriz 2 mostra uma matriz
25 representativa de hidantoína.



Matriz 1



Matriz 2

Em outro objeto específico da invenção, o uso destes compostos acima e análogos das matriz 1 e matriz 2 como
30 bloqueadores de amargor para reduzir o amargor em aplicações alimentares/farmacêuticas que seja mediadas por receptores

T2R8, principalmente café e alimentos, bebidas e medicamentos com sabor de café.

É um outro objeto da invenção conformar que os compostos identificados modula, preferencialmente inibem ou bloqueiam, o sabor amargo, por exemplo que é produzido pelo café e bebidas, alimentos e medicamentos com sabor de café em testes em humanos ou animais, preferencialmente em testes de degustação humanos. O Exemplo 1 mostra dados representativos de sensação para um destes compostos. Os dados demonstraram claramente uma diminuição significativa no amargor para um agonista específico e um aumento significativo na potência sobre um bloqueador de amargor de T2R8 conhecido.

É um outro objeto da invenção utilizar compostos descritos aqui como aditivos ou moduladores de sabor em composições com o objetivo de inibir ou bloquear o sabor amargo produzido por compostos que ativam especificamente estes receptores de sabor. Um objeto preferencial da invenção é usar um composto que inibe a ativação de receptores de T2R8 com o objetivo de bloquear o sabor amargo de compostos presentes no café e alimentos, bebidas e medicamentos com sabor de café.

Os compostos identificados, de acordo com a invenção, podem ser adicionados a alimentos, bebidas, cosméticos ou composições medicinais para modular, preferencialmente bloquear o sabor amargo disparado pela ativação de hT2R8 por compostos amargos na presença de café e alimentos, bebidas e medicamentos relacionados ou compostos estruturalmente relacionados ou outros compostos, por exemplo, compostos encontrados em alimentos bebidas ou medicamentos ou cosméticos que produzem uma percepção de sabor amargo.

OBJETOS DA INVENÇÃO

É um objeto da invenção fornecer ensaios que usem hT2R8 e/ou hT2R14 e quimeras e variantes do mesmo que identificam compostos e composições contendo o que produz ou bloqueia o sabor amargo associado com café e alimentos, bebidas e medicamentos com sabor de café.

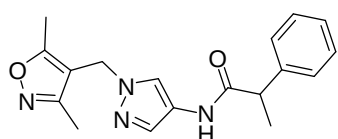
É um objeto específico da invenção fornecer ensaios que identificam compostos que ativam ou que bloqueiam ou modulam a ativação e/ou ligação de hT2R8 a compostos ou composições contendo os responsáveis pelo sabor amargo do café.

5 É um objeto específico da invenção fornecer ensaios que identificam compostos que ativam ou que bloqueiam ou modulam a ativação e/ou ligação de hT2R14 a compostos ou composições contendo os responsáveis pelo sabor amargo do café.

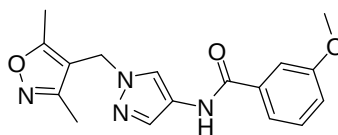
É outro objeto específico da invenção fornecer compostos
10 específicos identificados usando os ensaios inventivos e composições contendo principalmente café e bebidas, alimentos e medicamentos com sabor de café.

É um objeto específico da invenção fornecer os compostos apresentados abaixo que são antagonistas de T2R8 e T2R14 que
15 demonstraram bloquear o amargor do café.

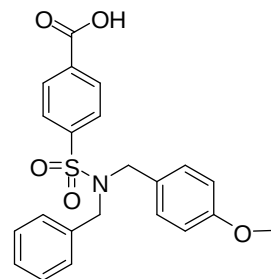
Em outro objeto específico da invenção, o uso destes compostos acima e análogos do Composto A, Composto B e Composto C como bloqueadores de amargor para reduzir o amargor em aplicações alimentares/farmacêuticas que sejam
20 mediadas por receptores T2R8, principalmente café e alimentos, bebidas e medicamentos com sabor de café.



Composto A
 $IC_{50}=0.3 \text{ uM (hT2R08)}$



Composto B
 $IC_{50}=0.4 \text{ uM (hT2R08)}$



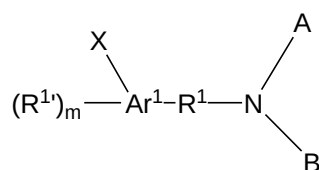
Composto C
 $IC_{50}=0.2 \text{ uM(hT2R14)}$

É outro objeto específico da invenção o uso do Composto C e análogos do mesmo como amplamente atuando como
25 bloqueadores de amargor para reduzir o amargor em aplicações alimentares/farmacêuticas que são medidas por um dos receptores humano T2R3, 7, 10, 14, 16, 44, 51, 55, 61, 63, 64, 65, ou 71 e/ou receptores humanos T2R5, 9, 13, 54, 67 ou

75, principalmente em alimentos, bebidas e medicamentos contendo múltiplos compostos amargos, compostos amargos que interagem com múltiplos receptores de sabor amargo ou composições que contêm compostos amargos ou compostos amargos onde a especificidade de seus receptores é desconhecida.

É outro objeto específico da invenção fornecer compostos que podem ser representados pelas seguintes fórmulas.

Em um primeiro aspecto, um composto de Fórmula estrutura (I) é fornecido:



(I)

ou um sal, hidrato, solvato ou N-óxido onde:

Ar^1 é um anel arila, heteroarila ou cicloalquila de cinco ou seis membros;

m é 0, 1, 2 ou 3;

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

X é selecionado a partir do grupo que consiste em hidrogênio, halogênio, alquila, alquila substituída, arila, arila substituída, arilalquila, arilalquila substituída, acila, acila substituída, heteroalquila, heteroalquila substituída, heteroarila, heteroarila substituída, heteroarilalquila, heteroarilalquila substituída, CN , NO_2 , OR^6 , $\text{S}(\text{O})_b\text{R}^6$, NR^6R^7 , CONR^6R^7 , CO_2R^6 , $\text{NR}^6\text{CO}_2\text{R}^7$, $\text{NR}^6\text{CONR}^7\text{R}^8$, $\text{NR}^6\text{CSNR}^7\text{R}^8$, $\text{NR}^6\text{C}(=\text{NH})\text{NR}^7\text{R}^8$, $\text{SO}_2\text{NR}^5\text{R}^6$, $\text{NR}^5\text{SO}_2\text{R}^6$, $\text{NR}^5\text{SO}_2\text{NR}^6\text{R}^7$, $\text{B}(\text{OR}^5)(\text{OR}^6)$, $\text{P}(\text{O})(\text{OR}^5)(\text{OR}^6)$, e $\text{P}(\text{O})(\text{R}^5)(\text{OR}^6)$;

cada $\text{R}^{1'}$ é selecionado a partir do grupo que consiste em hidrogênio, halogênio, alquila, alquila substituída, arila, arila substituída, arilalquila, arilalquila substituída, acila, acila substituída, heteroalquila, heteroalquila substituída, heteroarila, heteroarila substituída, heteroarilalquila, heteroarilalquila substituída, CN , NO_2 , OR^6 , $\text{S}(\text{O})_b\text{R}^6$, NR^6R^7 , CONR^6R^7 , CO_2R^6 , $\text{NR}^6\text{CO}_2\text{R}^7$, $\text{NR}^6\text{CONR}^7\text{R}^8$,

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

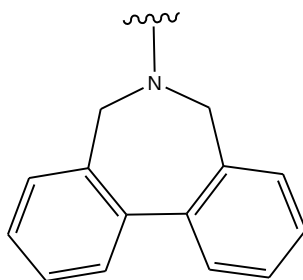
ou, de forma alternativa, X e/ou pelo menos $\text{R}^{1'}$ junto com os átomos aos quais está ligado formam um anel arila, heteroarila substituída, heteroarila substituída, cicloalquila, cicloalquila substituída, cicloheteroalquila ou cicloheteroalquila substituída onde o anel é opcionalmente fundido a outro anel arila, arila substituída, heteroarila, heteroarila substituída, cicloalquila, cicloalquila substituída, cicloheteroalquila ou cicloheteroalquila substituída;

$\text{R}^4\text{--R}^8$ são independentemente selecionados a partir do grupo que consiste em hidrogênio, alquila, alquila substituída, arila, arila substituída, arilalquila, arilalquila substituída, heteroalquila, heteroalquila substituída, heteroarila, heteroarila substituída, heteroarilalquila e heteroarilalquila substituída ou, de forma alternativa, R^5 e R^6 , R^6 e R^7 , R^7 e R^8 , juntos com os átomos aos quais estão ligados formam um anel cicloheteroalquila ou cicloheteroalquila substituída;

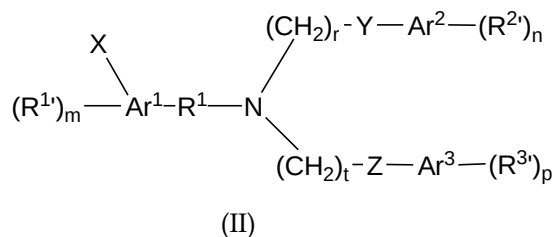
A e B são independentemente selecionados a partir do grupo que consiste em hidrogênio, alquila, alquila substituída, arila, arila substituída, arilalquila, arilalquila substituída, acila, acila substituída, heteroalquila, heteroalquila substituída, heteroarila, heteroarila substituída, heteroarilalquila, heteroarilalquila substituída; e

b é 0, 1, 2 ou 3.

Em algumas modalidades, A e B, junto com o átomo de nitrogênio ao qual estão ligados, formam um anel que pode ser fundido com anéis adicionais substituídos ou não e podem compreender pelo menos uma dupla ligação. Um exemplo não limitante de tal anel inclui um grupo que tem a fórmula:



Em um segundo aspecto, a invenção pode fornecer compostos de Fórmula estrutura (II) abaixo:



ou um sal, hidrato, solvato ou N-óxido do mesmo onde:

Ar^1 , Ar^2 e Ar^3 são independentemente um anel arila, heteroarila, ou cicloalquila de cinco ou seis membros;

m é 0, 1, 2 ou 3;

n e p são independentemente 0, 1, 2, 3 ou 4;

r e t são independentemente 0, 1 ou 2;

Y e Z são independentemente selecionados a partir do grupo que consiste em CR^6R^7 , C=O , C=S , C=NOR^6 , O , NR^6 , e S(O)_b ;

R^1 é selecionado a partir do grupo que consiste em SO_2 , C=O , C=S , e C=NOR^4 ;

X pode ser selecionado a partir do grupo que consiste em hidrogênio, alquila, alquila substituída, arila, arila substituída, arilalquila, arilalquila substituída, acila, acila substituída, heteroalquila, heteroalquila substituída, heteroarila, heteroarila substituída, heteroarilalquila, heteroarilalquila substituída, CN , NO_2 , $-\text{OR}^6$, $\text{S(O)}_b\text{R}^6$, NR^6R^7 , CONR^6R^7 , CO_2R^6 , $\text{NR}^6\text{CO}_2\text{R}^7$, $\text{NR}^6\text{CONR}^7\text{R}^8$, $\text{NR}^6\text{CSNR}^7\text{R}^8$, $\text{NR}^6\text{C(=NH)NR}^7\text{R}^8$, $\text{SO}_2\text{NR}^5\text{R}^6$, $\text{NR}^5\text{SO}_2\text{R}^6$, $\text{NR}^5\text{SO}_2\text{NR}^6\text{R}^7$, $\text{B(OR}^5)(\text{OR}^6)$, $\text{P(O)(OR}^5)(\text{OR}^6)$, e $\text{P(O)(R}^5)(\text{OR}^6)$;

X é preferencialmente selecionado a partir do grupo que consiste em hidrogênio, heteroalquila, heteroalquila substituída, heteroarila, heteroarila substituída,

heteroarilalquila, heteroarilalquila substituída, CN, $S(O)_bR^6$, $CONR^6R^7$, $-CO_2R^6$, $SO_2NR^5R^6$, $NR^5SO_2R^6$, $NR^5SO_2NR^6R^7$, $B(OR^5)(OR^6)$, $P(O)(OR^5)(OR^6)$, e $P(O)(R^5)(OR^6)$.

cada $R1'$ é selecionado a partir do grupo que consiste em
 5 hidrogênio, halogênio, alquila, alquila substituída, arila, arila substituída, arilalquila, arilalquila substituída, acila, acila substituída, heteroalquila, heteroalquila substituída, heteroarila, heteroarila substituída, heteroarilalquila, heteroarilalquila substituída, CN, NO_2 ,
 10 OR^6 , $S(O)_bR^6$, NR^6R^7 , $CONR^6R^7$, CO_2R^6 , $NR^6CO_2R^7$, $NR^6CONR^7R^8$, $NR^6CSNR^7R^8$, $NR^6C(=NH)NR^7R^8$, $SO_2NR^5R^6$, $NR^5SO_2R^6$, $NR^5SO_2NR^6R^7$, $B(OR^5)(OR^6)$, $P(O)(OR^5)(OR^6)$, e $P(O)(R^5)(OR^6)$;

cada $R2'$ é selecionado a partir do grupo que consiste em
 15 hidrogênio, halogênio, alquila, alquila substituída, arila, arila substituída, arilalquila, arilalquila substituída, acila, acila substituída, heteroalquila, heteroalquila substituída, heteroarila, heteroarila substituída, heteroarilalquila, heteroarilalquila substituída, CN, NO_2 ,
 20 OR^6 , $S(O)_bR^6$, NR^6R^7 , $CONR^6R^7$, CO_2R^6 , $NR^6CO_2R^7$, $NR^6CONR^7R^8$, $NR^6CSNR^7R^8$, $NR^6C(=NH)NR^7R^8$, $SO_2NR^5R^6$, $NR^5SO_2R^6$, $NR^5SO_2NR^6R^7$, $B(OR^5)(OR^6)$, e $P(O)(OR^5)(OR^6)$;

cada $R3'$ é selecionado a partir do grupo que consiste em
 hidrogênio, halogênio, alquila, alquila substituída, arila, arila substituída, arilalquila, arilalquila substituída,
 25 acila, acila substituída, heteroalquila, heteroalquila substituída, heteroarila, heteroarila substituída, heteroarilalquila, heteroarilalquila substituída, CN, NO_2 ,
 OR^6 , $S(O)_bR^6$, NR^6R^7 , $CONR^6R^7$, CO_2R^6 , $NR^6CO_2R^7$, $NR^6CONR^7R^8$, $NR^6CSNR^7R^8$, $NR^6C(=NH)NR^7R^8$, $SO_2NR^5R^6$, $NR^5SO_2R^6$, $NR^5SO_2NR^6R^7$,
 30 $B(OR^5)(OR^6)$, $P(O)(OR^5)(OR^6)$, e $P(O)(R^5)(OR^6)$;

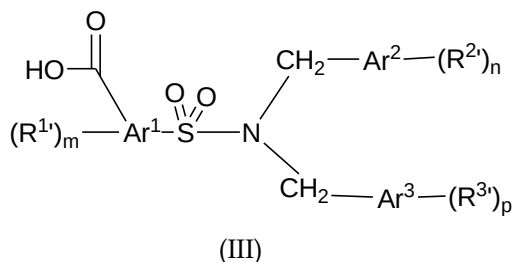
ou, de forma alternativa, X e/ou pelo menos $R1'$ junto com os átomos aos quais está ligado formam um anel arila, heteroarila substituída, heteroarila substituída, cicloalquila, cicloalquila substituída, cicloheteroalquila ou
 35 cicloheteroalquila substituída onde o anel é opcionalmente fundido a outro anel arila, arila substituída, heteroarila,

heteroarila substituída, cicloalquila, cicloalquila substituída, cicloheteroalquila ou cicloheteroalquila substituída;

R^4 - R^8 são independentemente selecionados a partir do grupo que consiste em alquila, alquila substituída, arila, arila substituída, arilalquila, arilalquila substituída, heteroalquila, heteroalquila substituída, heteroarila, heteroarila substituída, heteroarilalquila ou heteroarilalquila substituída ou, de forma alternativa, R^5 e R^6 , R^6 e R^7 , R^7 e R^8 , juntos com os átomos aos quais estão ligados formam um anel cicloheteroalquila ou cicloheteroalquila substituída;

b é 0, 1, 2 ou 3.

Em um outro aspecto, a invenção fornece compostos apresentando a Fórmula estrutural (III) abaixo:



ou um sal, hidrato, solvato ou N-óxido do mesmo onde:

Ar^1 , Ar^2 e Ar^3 são independentemente um anel arila, heteroarila, ou cicloalquila de cinco ou seis membros e Ar^2 e Ar^3 podem opcionalmente serem omitidos;

m é 0, 1, 2 ou 3;

n e p são independentemente 0, 1, 2, 3 ou 4;

cada $\text{R}^{1'}$ é selecionado a partir do grupo que consiste em hidrogênio, halogênio, alquila, alquila substituída, arila, arila substituída, arilalquila, arilalquila substituída, acila, acila substituída, heteroalquila, heteroalquila substituída, heteroarila, heteroarila substituída, heteroarilalquila, heteroarilalquila substituída, 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), e P(O)(R⁵)(OR⁶);

cada $R^{2'}$ é selecionado independentemente a partir do grupo que consiste em hidrogênio, halogênio, alquila, alquila substituída, arila, arila substituída, arilalquila, arilalquila substituída, acila, acila substituída, heteroalquila, heteroalquila substituída, heteroarila, heteroarila substituída, heteroarilalquila, heteroarilalquila substituída, CN , NO_2 , OR^6 , $S(O)_bR^6$, NR^6R^7 , $CONR^6R^7$, CO_2R^6 , $NR^6CO_2R^7$, $NR^6CONR^7R^8$, $NR^6CSNR^7R^8$, $NR^6C(=NH)NR^7R^8$, $SO_2NR^5R^6$, $NR^5SO_2R^6$, $NR^5SO_2NR^6R^7$, $B(OR^5)(OR^6)$, $P(O)(OR^5)(OR^6)$, e

10 $P(O)(R^5)(OR^6)$;

cada $R^{3'}$ é selecionado independentemente a partir do grupo que consiste em hidrogênio, halogênio, alquila, alquila substituída, arila, arila substituída, arilalquila, arilalquila substituída, acila, acila substituída, heteroalquila, heteroalquila substituída, heteroarila, heteroarila substituída, heteroarilalquila, heteroarilalquila substituída, CN , NO_2 , OR^6 , $S(O)_bR^6$, NR^6R^7 , $CONR^6R^7$, CO_2R^6 , $NR^6CO_2R^7$, $NR^6CONR^7R^8$, $NR^6CSNR^7R^8$, $NR^6C(=NH)NR^7R^8$, $SO_2NR^5R^6$, $NR^5SO_2R^6$, $NR^5SO_2NR^6R^7$, $B(OR^5)(OR^6)$, $P(O)(OR^5)(OR^6)$, e

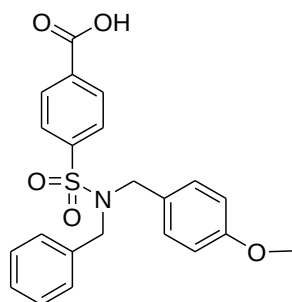
15 $P(O)(R^5)(OR^6)$;

R^5 - R^8 são independentemente selecionados a partir do grupo que consiste em alquila, alquila substituída, arila, arila substituída, arilalquila, arilalquila substituída, heteroalquila, heteroalquila substituída, heteroarila, heteroarila substituída, heteroarilalquila ou heteroarilalquila substituída ou, de forma alternativa, R^5 e R^6 , R^6 e R^7 , R^7 e R^8 , juntos com os átomos aos quais estão ligados formam um anel cicloheteroalquila ou cicloheteroalquila substituída;

25

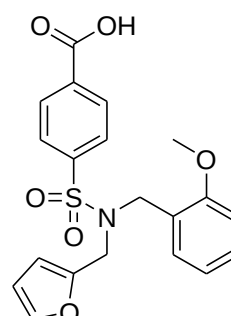
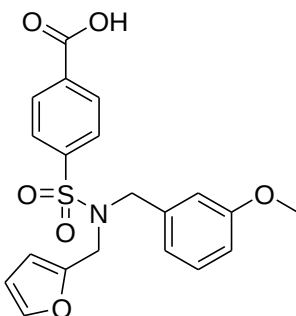
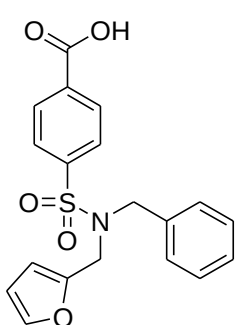
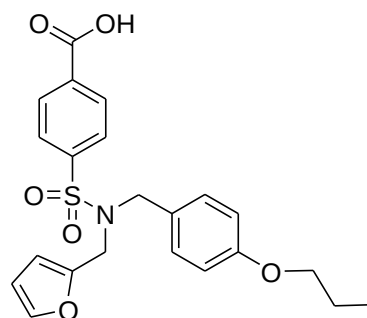
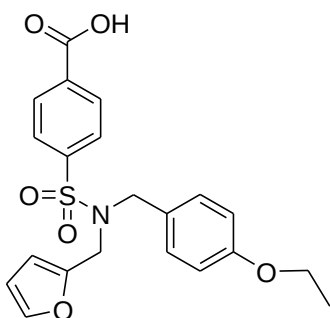
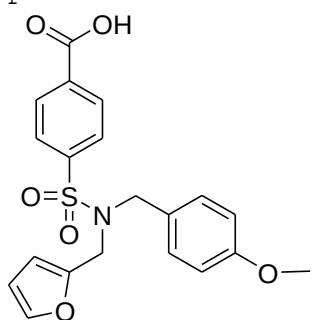
30 b é 0, 1, 2 ou 3.

Ainda em um outro aspecto, a invenção fornece compostos apresentando estrutura abaixo:



ou um sal, hidrato, solvato ou N-óxido do mesmo.

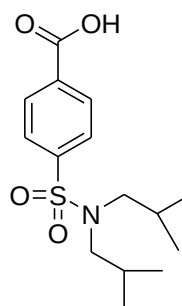
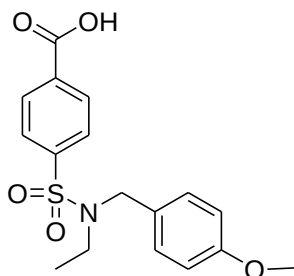
Ainda em um outro aspecto, a invenção fornece compostos apresentando estrutura abaixo:



5

ou um sal, hidrato, solvato ou N-óxido do mesmo.

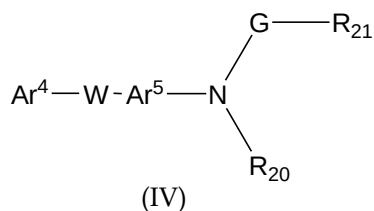
Ainda em uma outra modalidade, a invenção fornece compostos apresentando estrutura abaixo:



10

ou um sal, hidrato, solvato ou N-óxido do mesmo.

Em aspecto relacionado, um composto de Fórmula estrutural (IV) é fornecido:



ou um sal, hidrato, solvato ou N-óxido do mesmo onde:

Ar⁴ e Ar⁵ são independentemente um anel arila ou heteroarila de cinco ou seis membros;

5 W é selecionado a partir do grupo que consiste em CR⁶R⁷, C=O, C=S; C=NOR⁶; O, NR⁶, S, SO, SO₂, e (CH₂)_n;

n é 0, 1, 2 ou 3;

G é selecionado a partir do grupo que consiste em CR⁶R⁷, C=O, C=S, C=NOR⁶, e S(O)_b;

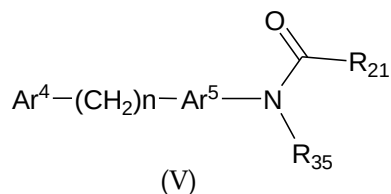
10 R²⁰ é selecionado a partir do grupo que consiste em hidrogênio, arilalquenila, heteroarilalquenila, arilalquila, heteroarilalquila, arila, heteroarila, alquila, alcóxi-alquila, alquenila, cicloalquila, cicloalquenila, e derivados substituídos;

15 R²¹ é selecionado a partir do grupo que consiste em uma arilalquenila, heteroarilalquenila, arilalquila, heteroarilalquila, arila, heteroarila, alquila, alcóxi-alquila, alquenila, cicloalquila, cicloalquenila, e derivados substituídos;

20 R⁶ e R⁷ são independentemente selecionados a partir do grupo que consiste em hidrogênio, alquila, alquila substituída, arila, arila substituída, arilalquila, arilalquila substituída, heteroalquila, heteroalquila substituída, heteroarila, heteroarila substituída, heteroarilalquila e heteroarilalquila substituída ou, de
25 forma alternativa, R⁶ e R⁷, juntos com os átomos aos quais estão ligados formam um anel cicloheteroalquila ou cicloheteroalquila substituída;

b é 0, 1, 2 ou 3.

30 Em outro aspecto relacionado, um composto de Fórmula estrutural (V) é fornecido:



ou um sal, hidrato, solvato ou N-óxido do mesmo onde:

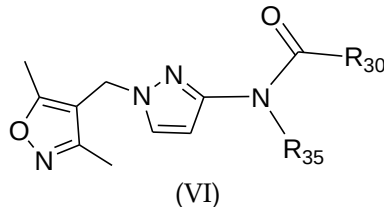
Ar^4 e Ar^5 são independentemente um anel arila ou heteroarila de cinco ou seis membros;

5 n é 0, 1, 2 ou 3;

R_{21} é selecionado a partir do grupo que consiste em uma arilalquenila, heteroarilalquenila, arilalquila, heteroarilalquila, arila, heteroarila, alquila, alcóxi-alquila, alquenila, cicloalquila, cicloalquenila, e derivados
10 substituídos;

R_{35} é selecionado a partir do grupo que consiste em hidrogênio, alquila, e alquila substituída.

Ainda em modalidades adicionais a invenção, o composto de Fórmula estrutural (VI) é fornecido



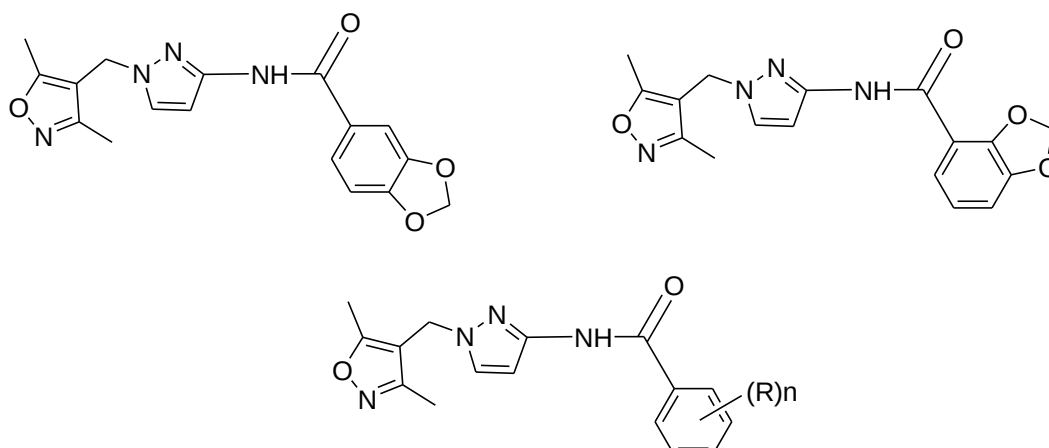
15

ou um sal, hidrato, solvato ou N-óxido do mesmo onde:

R_{30} é selecionado a partir do grupo que consiste em uma arilalquenila, heteroarilalquenila, arilalquila, heteroarilalquila, arila, heteroarila, alquila, alcóxi-alquila, alquenila, cicloalquila, cicloalquenila, e derivados
20 substituídos;

R_{35} é selecionado a partir do grupo que consiste em hidrogênio, alquila, e alquila substituída.

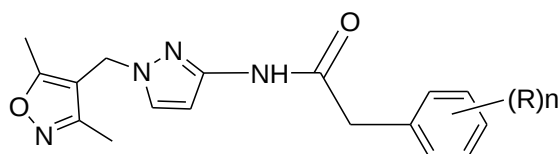
Ainda em modalidades adicionais, a invenção fornece
25 compostos apresentando estrutura abaixo:



ou um sal, hidrato, solvato ou N-óxido do mesmo,
onde cada R é independentemente Cl, MeO, CN, EtO, OH,
Me, -SO₂Me, F, ou H, e

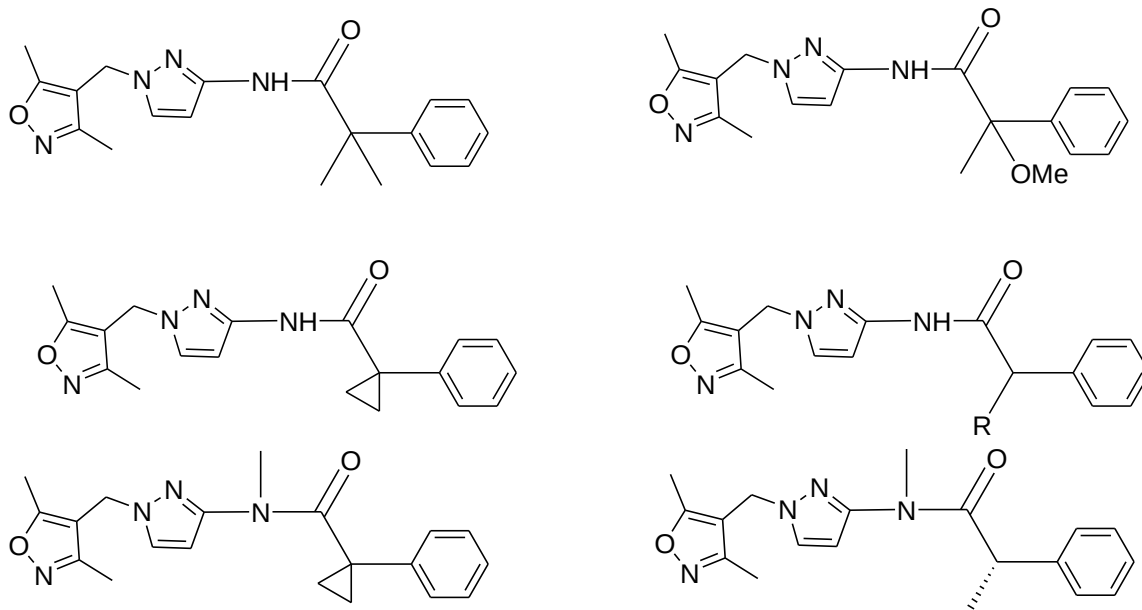
5 n é 0, 1, 2, 3 ou 4.

Ainda em outras modalidades, a invenção fornece
compostos apresentando estrutura abaixo:



ou um sal, hidrato, solvato ou N-óxido do mesmo,
onde cada R é independentemente MeO ou OH e
10 n é 0, 1, 2, 3 ou 4.

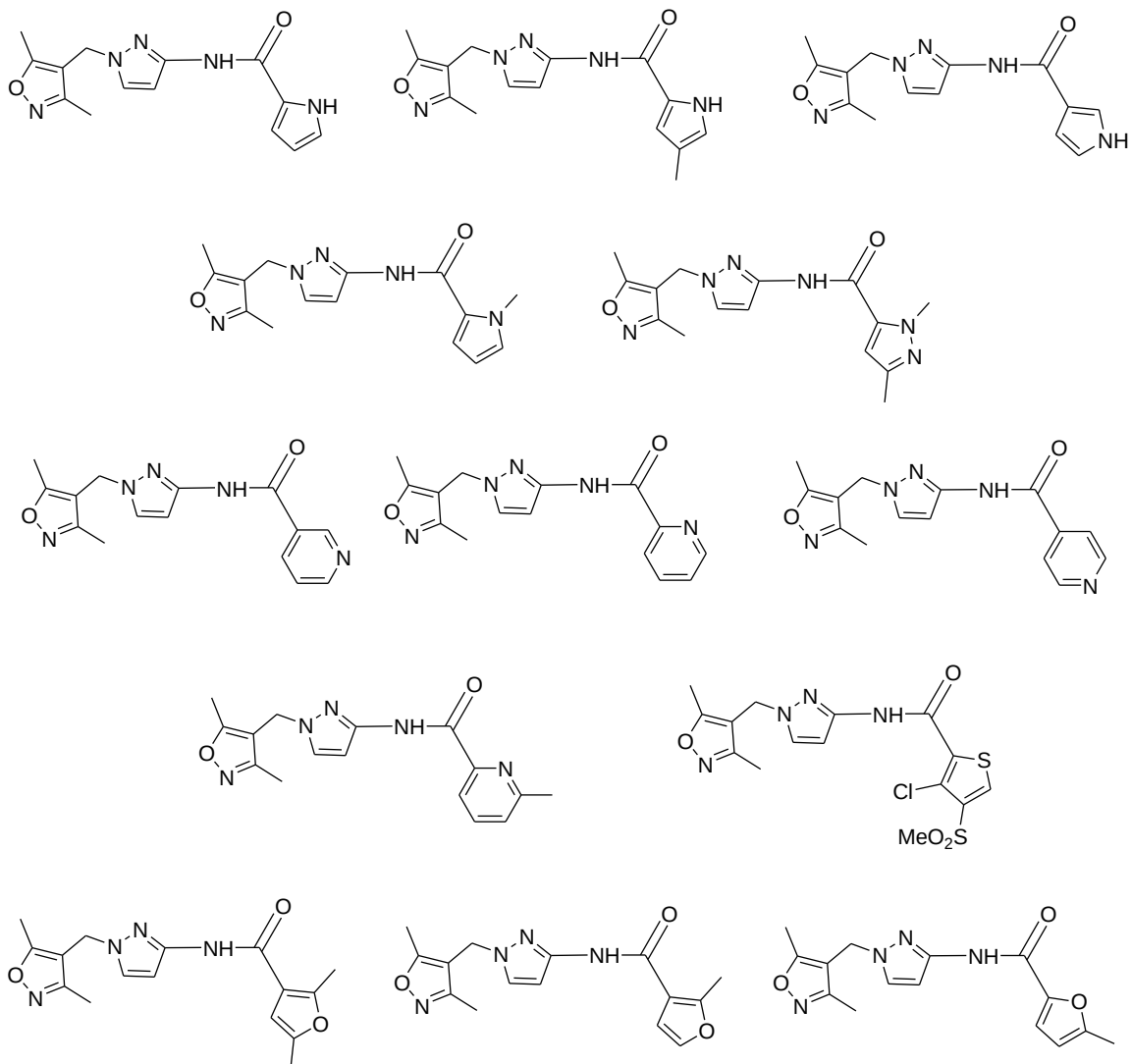
Ainda em outras modalidades, a invenção fornece
compostos apresentando estrutura abaixo:



15

ou um sal, hidrato, solvato ou N-óxido do mesmo,
onde cada R é H, Me, Et, OCOMe, CH₂OH, OMe, ou Ph.

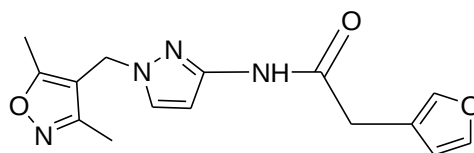
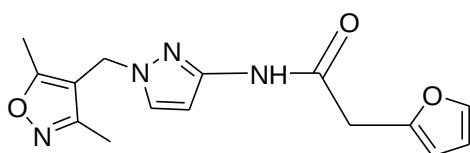
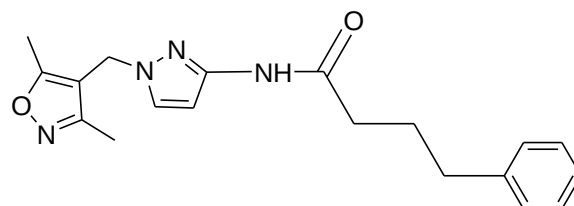
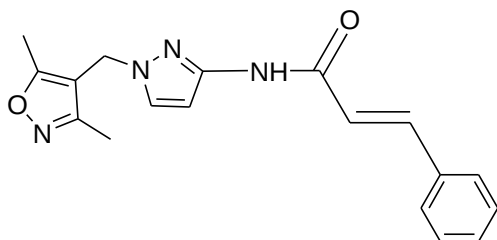
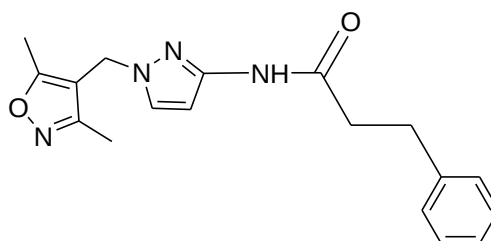
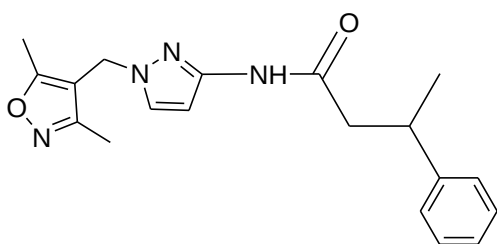
Ainda em outras modalidades, a invenção fornece
compostos apresentando estrutura abaixo:



5

ou um sal, hidrato, solvato ou N-óxido do mesmo.

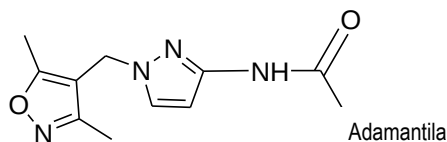
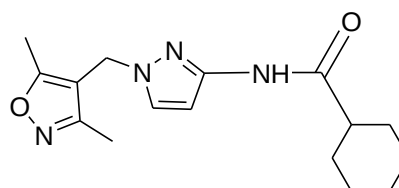
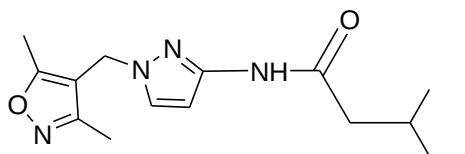
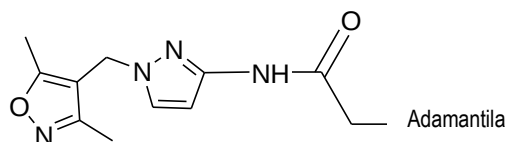
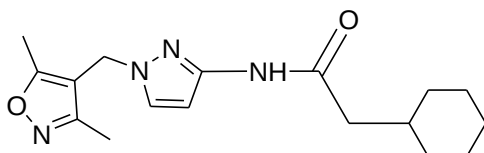
Ainda em outras modalidades, a invenção fornece
compostos apresentando estrutura abaixo:



ou um sal, hidrato, solvato ou N-óxido do mesmo.

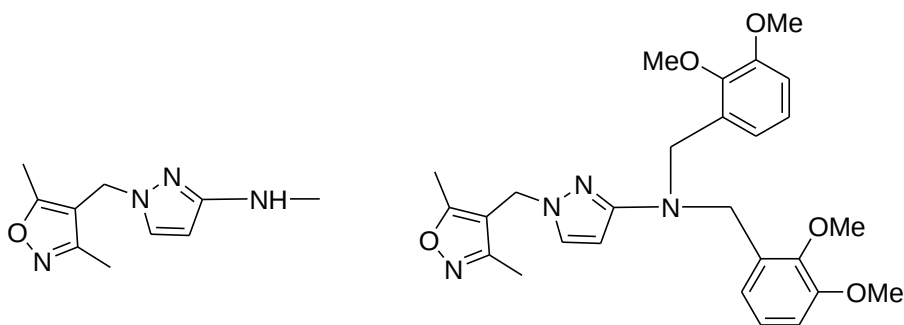
Ainda em outras modalidades, a invenção fornece

5 compostos apresentando estrutura abaixo:



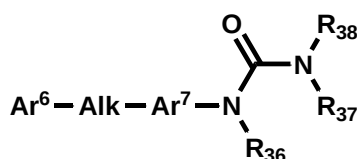
ou um sal, hidrato, solvato ou N-óxido do mesmo.

Ainda em outras modalidades, a invenção fornece compostos apresentando estrutura abaixo:



ou um sal, hidrato, solvato ou N-óxido do mesmo.

Em um aspecto a invenção refere-se ao composto de fórmula:



5

ou um sal, hidrato, solvato, N-óxido ou pró-droga do mesmo,

Onde Ar^6 e Ar^7 são o mesmo ou diferente independentemente um do outro, um grupo arila de cinco ou
10 seis membros ou um grupo heteroarila de cinco ou seis membros;

Alk é um grupo alquila, opcionalmente interrompido por um heteroátomo;

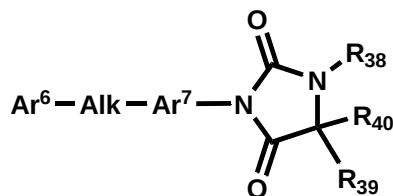
R_{36} e R_{37} são o mesmo ou diferente independentemente um
15 do outro, H, alquila, ou, R_{36} e R_{37} , junto com os átomos aos quais estão ligados, formam um heterociclo opcionalmente substituído de cinco ou seis membros; e

R_{38} é H, alquila substituída ou não substituída, alquila cicloalquila substituída ou não substituída,
20 heterocicloalquilalquila substituída ou não substituída, arila substituída ou não substituída, arilamidoalquila substituída ou não substituída, heteroarilamidoalquila substituída ou não substituída, arilalquila substituída ou não substituída, arilalcóxi substituída ou não substituída,
25 heteroarila substituída ou não substituída, heteroarilalquila substituída ou não substituída, ou haloalquila.

Em um aspecto os compostos da invenção contêm um heterociclo de cinco membros. Em uma modalidade, o

heterociclo de cinco membros é uma hidantoína ou uma ureia cíclica substituída ou não substituída.

Em uma modalidade, a hidantoína é uma hidantoína de fórmula:



5

ou um sal, hidrato, solvato, N-óxido ou pró-droga do mesmo,

Onde Ar⁶ e Ar⁷ são o mesmo ou diferente independentemente um do outro, um grupo arila de cinco ou
10 seis membros ou um grupo heteroarila de cinco ou seis membros;

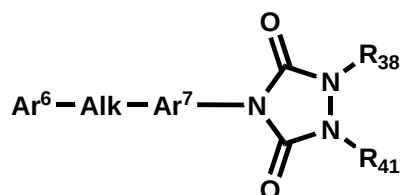
Alk é um grupo alquila, opcionalmente interrompido por um heteroátomo;

R₃₈ é H, alquila substituída ou não substituída, alquila
15 cicloalquila substituída ou não substituída, heterocicloalquilalquila substituída ou não substituída, arila substituída ou não substituída, arilamidoalquila substituída ou não substituída, heteroarilamidoalquila substituída ou não substituída, arilalquila substituída ou
20 não substituída, arilalcóxi substituída ou não substituída, heteroarila substituída ou não substituída, heteroarilalquila substituída ou não substituída, ou haloalquila; e

R₃₉ e R₄₀ são, o mesmo ou diferente independentemente um do outro, H, alquila substituída ou não substituída, alquila
25 cicloalquila substituída ou não substituída, heterocicloalquilalquila substituída ou não substituída, arila substituída ou não substituída, arilalquilamidoalquila substituída ou não substituída, heteroarilamidoalquila substituída ou não substituída, heteroarilalquilamidoalquila substituída ou não substituída, arilalquila substituída ou
30 não substituída, arilalcóxi substituída ou não substituída, heteroarila substituída ou não substituída, heteroarilalquila

substituída ou não substituída, haloalquila substituída ou não substituída, ou R₃₉ e R₄₀, junto com os átomos de carbono aos quais estão ligados, formam um grupo C=O ou um grupo alquenila substituída ou não substituída.

- 5 Em um aspecto os compostos da invenção contêm um heterociclo de cinco membros que é um urazol. Em uma modalidade, o urazol é um urazol de fórmula:



ou um sal, hidrato, solvato, N-óxido ou pró-droga do
10 mesmo,

Onde Ar₆ e Ar₇ são o mesmo ou diferente independentemente um do outro, um grupo arila de cinco ou seis membros ou um grupo heteroarila de cinco ou seis membros;

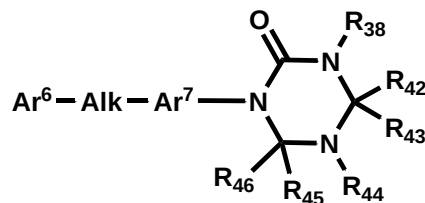
- 15 Alk é um grupo alquila, opcionalmente interrompido por um heteroátomo;

R₃₈ é H, alquila substituída ou não substituída, alquila cicloalquila substituída ou não substituída, heterocicloalquilalquila substituída ou não substituída,
20 arila substituída ou não substituída, arilamidoalquila substituída ou não substituída, heteroarilamidoalquila substituída ou não substituída, arilalquila substituída ou não substituída, arilalcóxi substituída ou não substituída, heteroarila substituída ou não substituída, heteroarilalquila
25 substituída ou não substituída, ou haloalquila; e

R₄₁ é H, alquila substituída ou não substituída, alquila cicloalquila substituída ou não substituída, heterocicloalquilalquila substituída ou não substituída,
30 arila substituída ou não substituída, arilamidoalquila substituída ou não substituída, heteroarilamidoalquila substituída ou não substituída, arilalquila substituída ou não substituída, arilalcóxi substituída ou não substituída,

heteroarila substituída ou não substituída, heteroarilalquila substituída ou não substituída, ou haloalquila.

Em um aspecto os compostos da invenção contêm um heterociclo de seis membros. Em uma modalidade, o
 5 heterociclo de seis membros é um heterociclo de seis membros de fórmula:

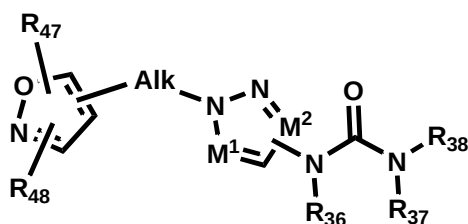


ou um sal, hidrato, solvato, N-óxido ou pró-droga do mesmo,

10 onde R₃₈ é H, alquila substituída ou não substituída, alquila cicloalquila substituída ou não substituída, heterocicloalquilalquila substituída ou não substituída, arila substituída ou não substituída, arilamidoalquila substituída ou não substituída, heteroarilamidoalquila
 15 substituída ou não substituída, arilalquila substituída ou não substituída, arilalcóxi substituída ou não substituída, heteroarila substituída ou não substituída, heteroarilalquila substituída ou não substituída, ou haloalquila; e

R₄₂, R₄₃, R₄₄, R₄₅, e R₄₆ são, o mesmo ou diferente
 20 independentemente um do outro, H, alquila substituída ou não substituída, alquila cicloalquila substituída ou não substituída, arilalquila substituída ou não substituída, arilalcóxi substituída ou não substituída, heteroarila substituída ou não substituída, heteroarilalquila substituída
 25 ou não substituída, ou R₄₂ e R₄₃, ou R₄₅ e R₄₆, junto com os átomos de carbono aos quais estão ligados, formam um grupo C=O.

Em outro aspecto a invenção refere-se ao composto de fórmula:



ou um sal, hidrato, solvato, N-óxido ou pró-droga do mesmo,

onde Alk é um grupo alquila, opcionalmente interrompido
5 por um heteroátomo;

M¹ é N ou CR₄₉, onde R₄₉ é H ou alquila substituída ou não substituída;

M² é N ou CR₅₀, onde R₅₀ é H ou alquila substituída ou não substituída;

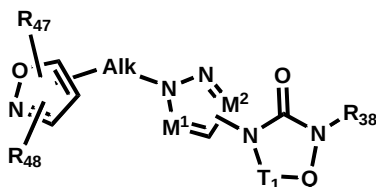
10 R₃₆ e R₃₇ são o mesmo ou diferente independentemente um do outro, H, alkyl, ou, R₃₆ e R₃₇, junto com os átomos aos quais estão ligados, formam um heterociclo opcionalmente substituído de cinco ou seis membros; e

R₃₈ é H, alquila substituída ou não substituída, alquila
15 cicloalquila substituída ou não substituída, heterocicloalquilalquila substituída ou não substituída, arila substituída ou não substituída, arilamidoalquila substituída ou não substituída, heteroarilamidoalquila substituída ou não substituída, arilalquila substituída ou
20 não substituída, arilalcóxi substituída ou não substituída, heteroarila substituída ou não substituída, heteroarilalquila substituída ou não substituída, ou haloalquila;

R₄₇ é H, alquila substituída ou não substituída, alcóxi substituída ou não substituída, arila substituída ou não
25 substituída, arilalquila ou halo; e

R₄₈ é H, alquila substituída ou não substituída, alcóxi substituída ou não substituída, arila substituída ou não substituída, arilalquila ou halo.

Ainda em outro aspecto, a invenção refere-se a um
30 composto de fórmula:



ou um sal, hidrato, solvato, N-óxido ou pró-droga do mesmo,

onde Alk é um grupo alquila, opcionalmente interrompido
5 por um heteroátomo;

T₁ é C=O e Q é CR₅₁R₅₂ ou NR₅₁, onde R₅₁ e R₅₂ são, o mesmo ou diferente independentemente um do outro, H, alquila substituída ou não substituída, alquila cicloalquila substituída ou não substituída, heterocicloalquilalquila
10 substituída ou não substituída, arila substituída ou não substituída, arilalquilamidoalquila substituída ou não substituída, heteroarilamidoalquila substituída ou não substituída, heteroarilalquilamidoalquila substituída ou não substituída, arilalquila substituída ou não substituída,
15 arilalcóxi substituída ou não substituída, heteroarila substituída ou não substituída, heteroarilalquila substituída ou não substituída, haloalquila substituída ou não substituída, ou R₅₁ e R₅₂, junto com os átomos de carbono aos quais estão ligados, formam um grupo C=O ou um grupo
20 alquenila substituída ou não substituída.

M¹ é N ou CR₄₉, onde R₄₉ é H ou alquila substituída ou não substituída;

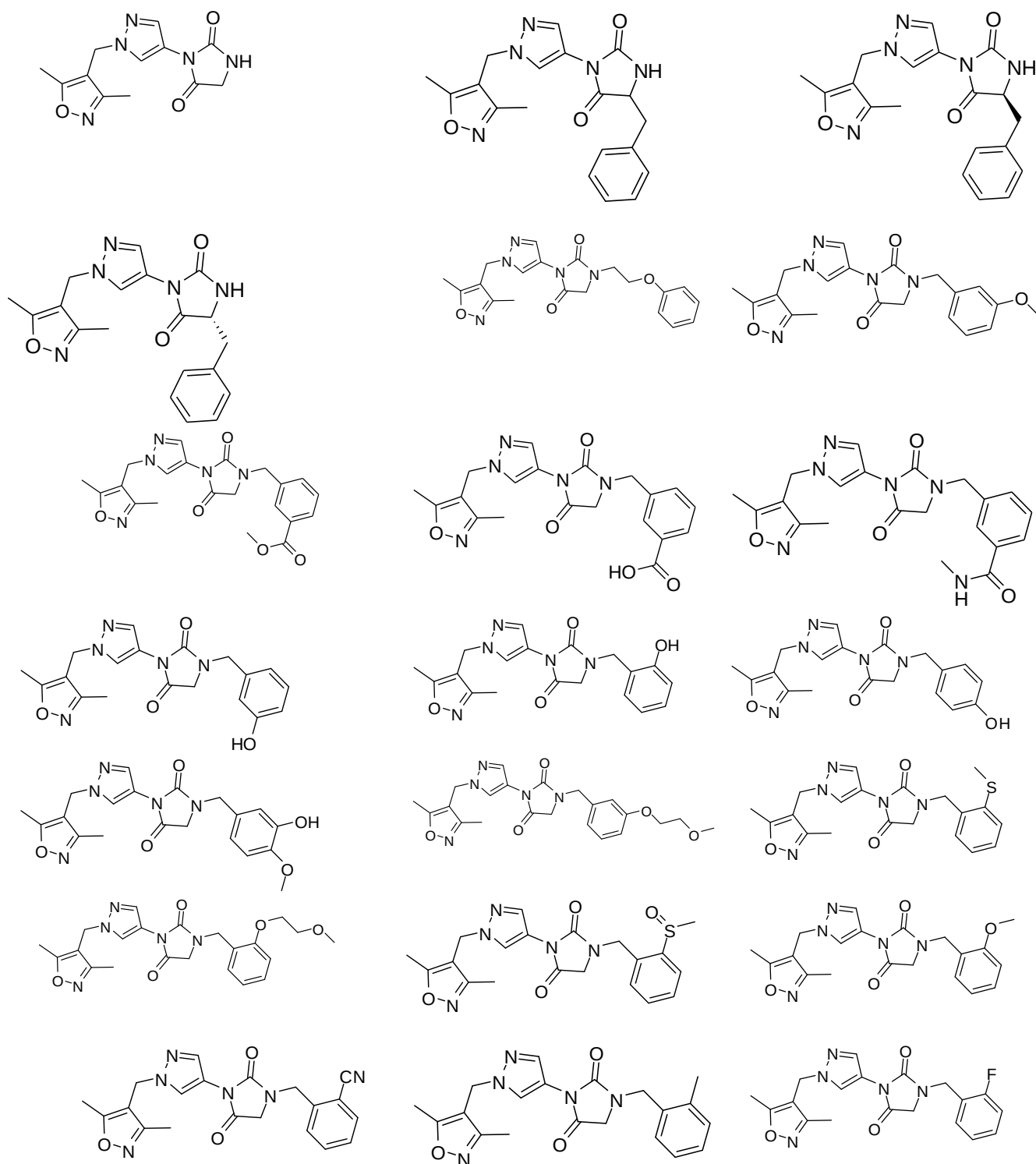
M² é N ou CR₅₀, onde R₅₀ é H ou alquila substituída ou não substituída;

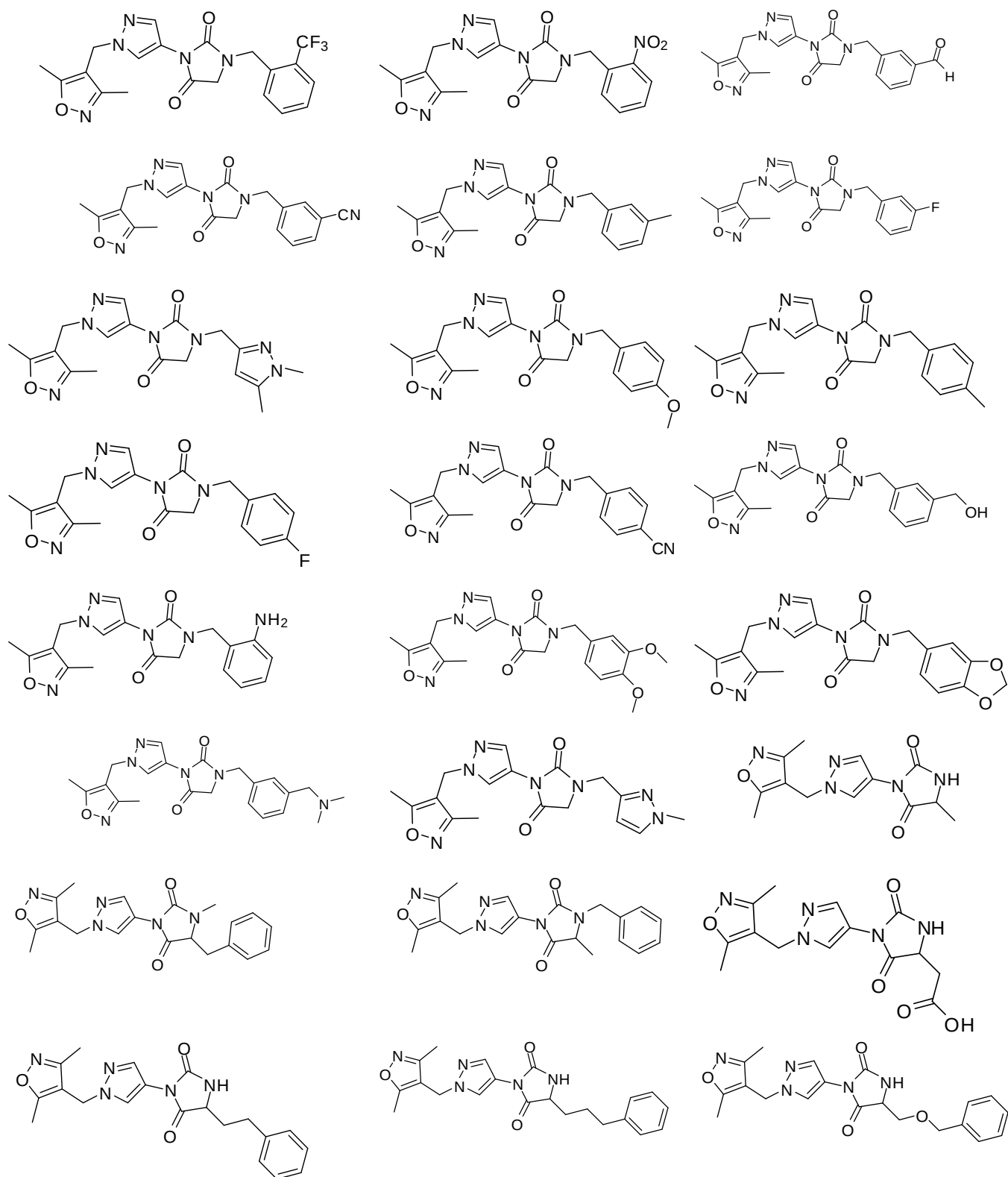
R₃₈ é H, alquila substituída ou não substituída, alquila cicloalquila substituída ou não substituída, heterocicloalquilalquila substituída ou não substituída, arila substituída ou não substituída, arilamidoalquila substituída ou não substituída, heteroarilamidoalquila
25 substituída ou não substituída, arilalquila substituída ou não substituída, arilalcóxi substituída ou não substituída, heteroarila substituída ou não substituída, heteroarilalquila substituída ou não substituída, ou haloalquila;

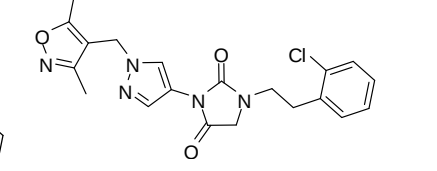
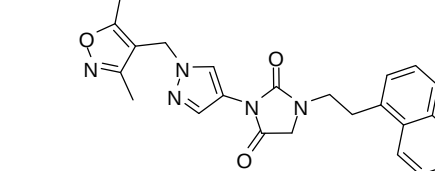
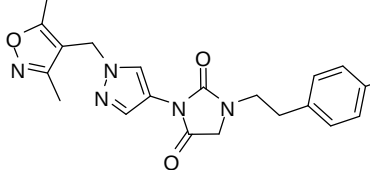
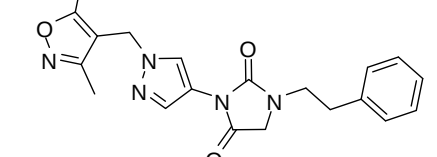
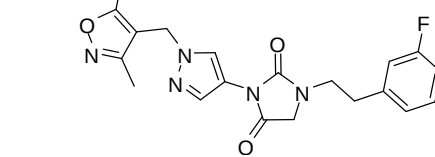
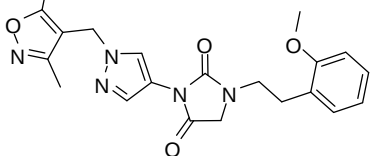
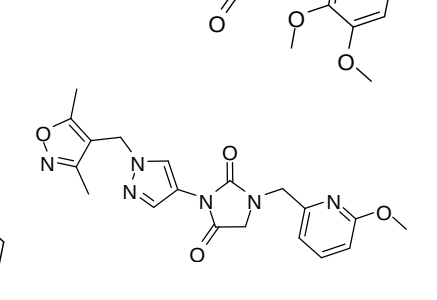
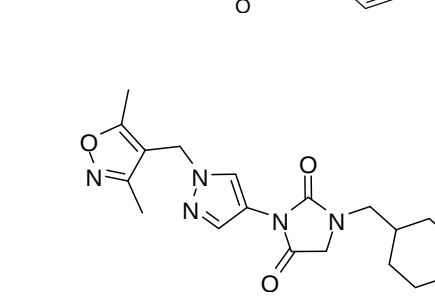
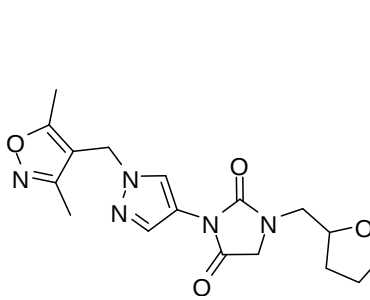
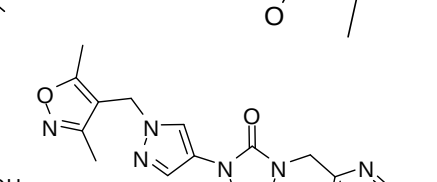
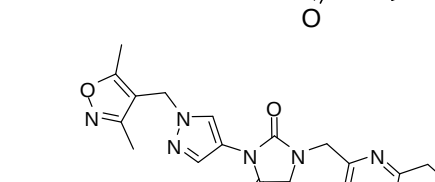
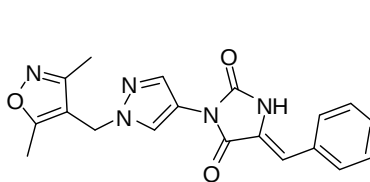
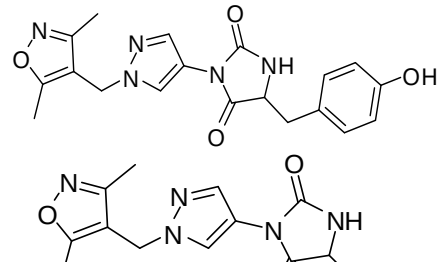
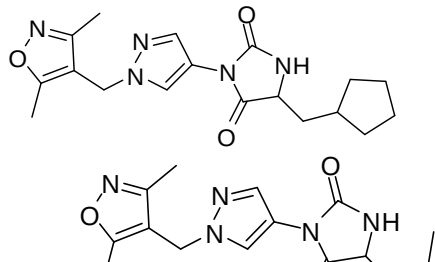
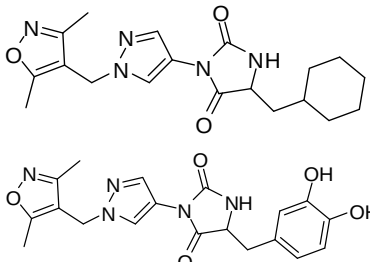
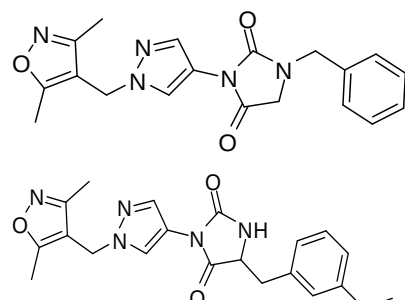
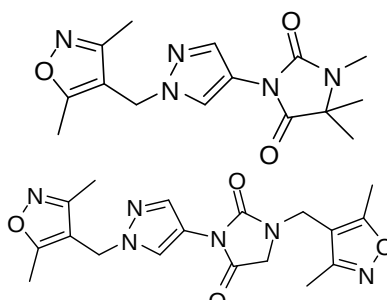
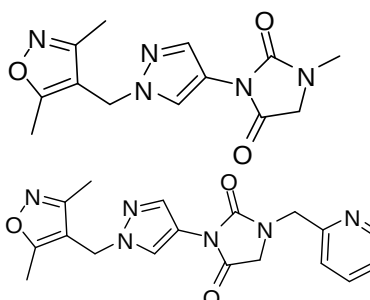
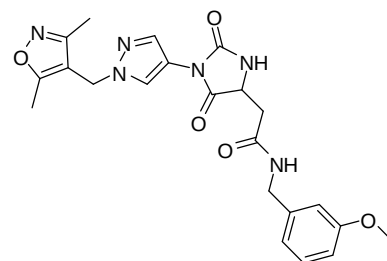
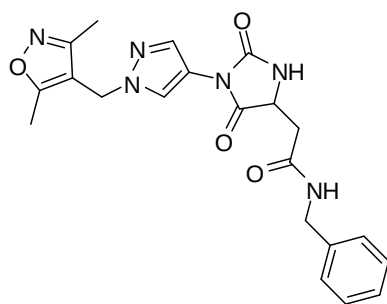
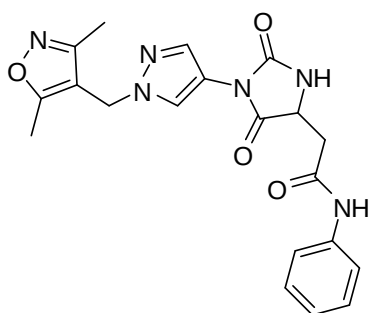
R₄₇ é H, alquila substituída ou não substituída, alcóxi
35 substituída ou não substituída, arila substituída ou não substituída, arilalquila ou halo; e

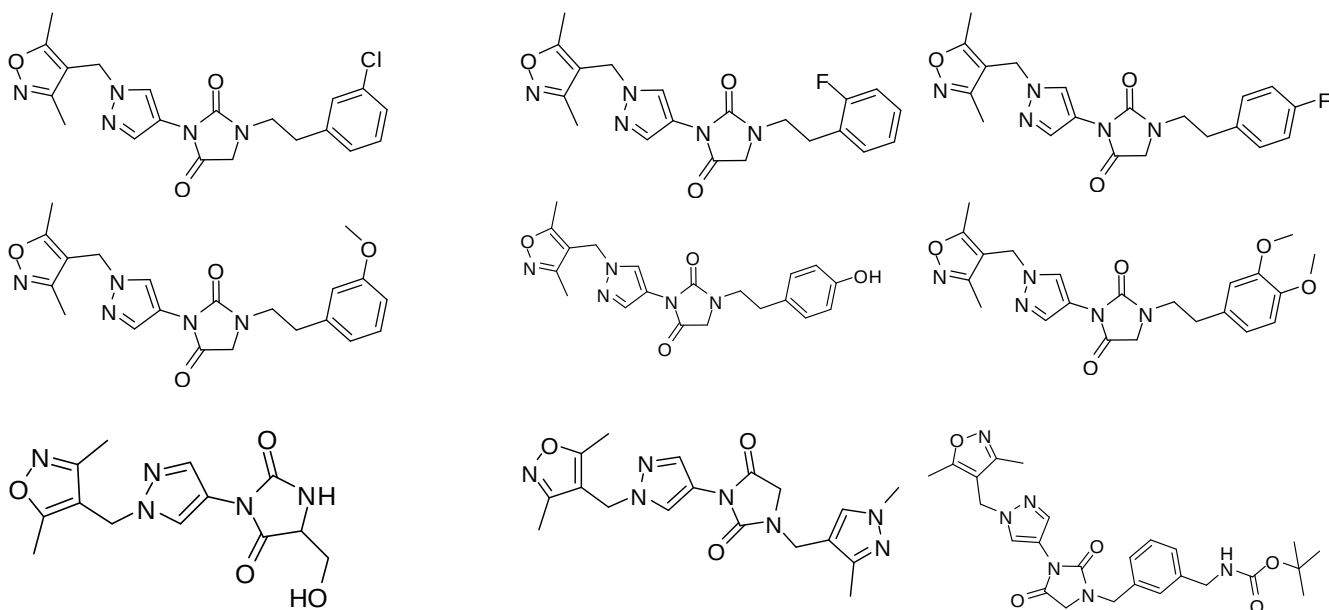
R_{48} é H, alquila substituída ou não substituída, alcóxi substituída ou não substituída, arila substituída ou não substituída, arilalquila ou halo.

Em outra modalidade a invenção refere-se ao composto de
5 fórmula:



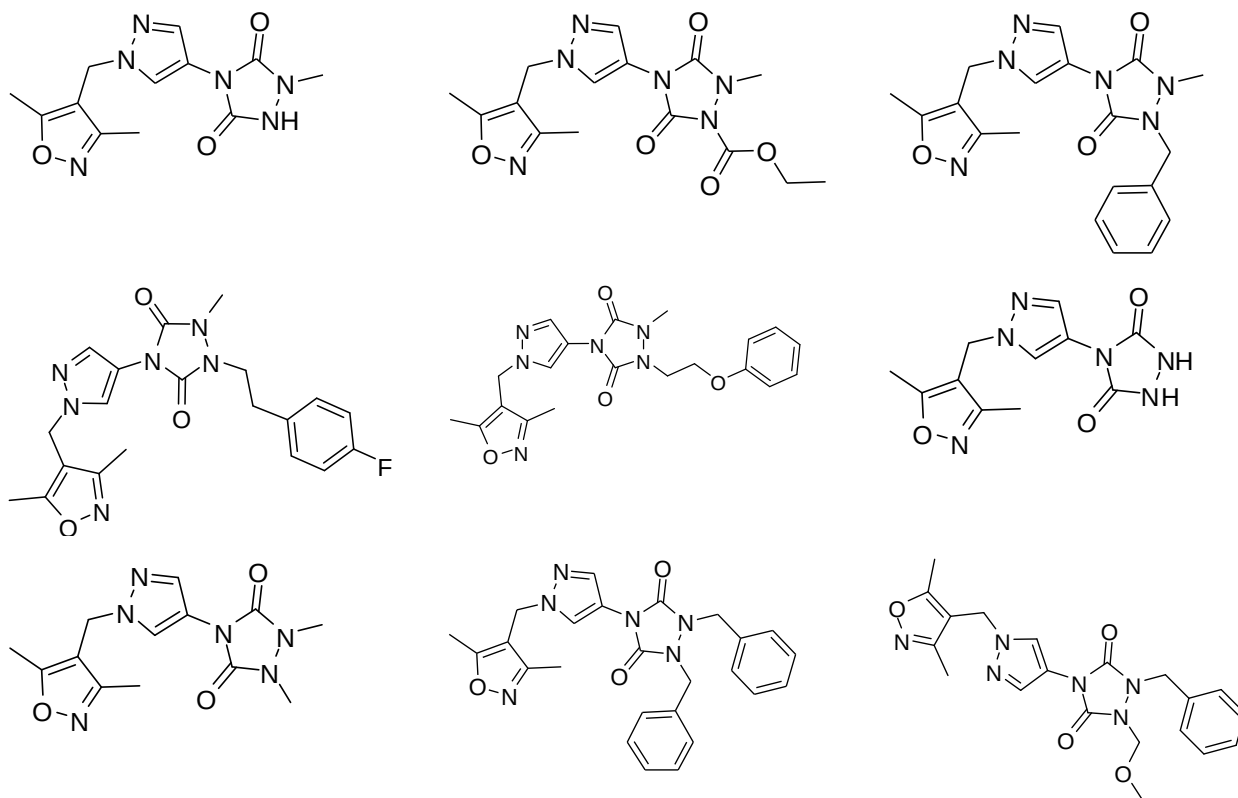


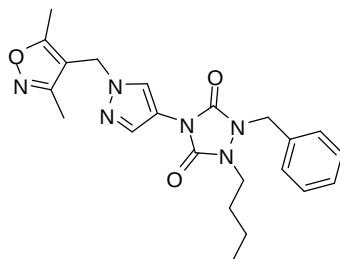
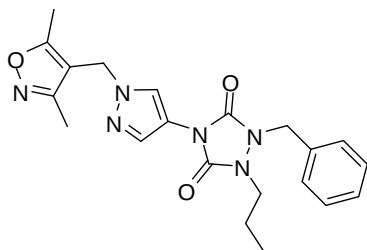
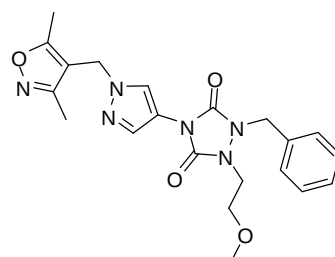
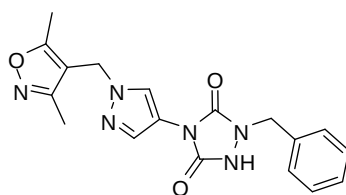
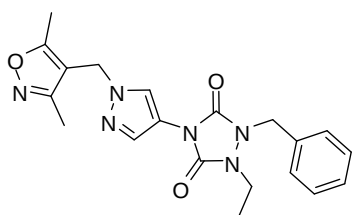




ou um sal, hidrato, solvato, N-óxido ou pró-droga do mesmo.

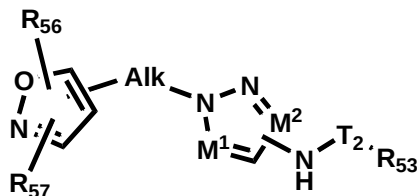
Em outro aspecto a invenção refere-se a um composto de
5 fórmula:





ou um sal, hidrato, solvato, N-óxido ou pró-droga do mesmo.

Ainda em outro aspecto, a invenção refere-se a um método
5 de fazer o composto de fórmula:



ou um sal, hidrato, solvato, N-óxido ou pró-droga do mesmo,

onde Alk é um grupo alquila, opcionalmente interrompido
10 por um heteroátomo;

T₂ é C=S, C=O, ou S(O)₂;

R₅₃ é alquila substituída ou não substituída, cicloalquila substituída ou não substituída, heteroarila substituída ou não substituída, arila substituída ou não substituída ou arilaquila substituída ou não substituída;
15

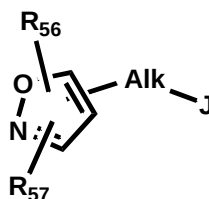
M¹ é N ou CR₅₄, onde R₅₄ é H ou alquila substituída ou não substituída;

M₂ é N ou CR₅₅, onde R₅₅ é H ou alquila substituída ou não substituída;

R_{56} é H, alquila substituída ou não substituída, alcóxi substituída ou não substituída, arila substituída ou não substituída, arilalquila ou halo; e

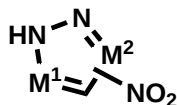
R_{57} é H, alquila substituída ou não substituída, alcóxi substituída ou não substituída, arila substituída ou não substituída, arilalquila ou halo;

onde o método compreende a reação de um composto de fórmula:

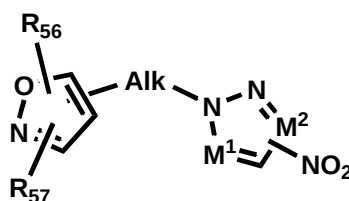


onde R_{56} , R_{57} , e Alk são definidos acima e J é um grupo de partida;

com um composto de fórmula:



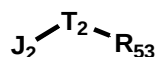
onde M^1 e M^2 são definidos acima para gerar um composto de fórmula



contendo um grupo NO_2 ;

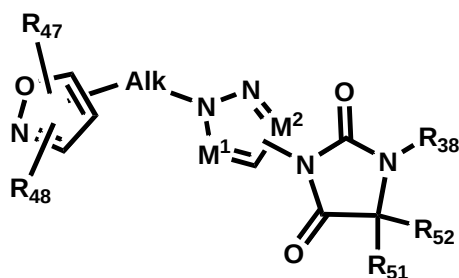
reduzindo o grupo NO_2 apara gerar um composto contendo um NH_2 ; e

reagindo o composto contendo um grupo NH_2 com um composto de fórmula



onde J é um grupo de partida e T_2 e R_{53} são definidos acima.

Ainda em outro aspecto, a invenção refere-se a um método de fazer o composto de fórmula:



ou um sal, hidrato, solvato, N-óxido ou pró-droga do mesmo,

onde Alk é um grupo alquila, opcionalmente interrompido
5 por um heteroátomo;

R₅₁ e R₅₂ são, o mesmo ou diferente independentemente um do outro, H, alquila substituída ou não substituída, alquila cicloalquila substituída ou não substituída, heterocicloalquilalquila substituída ou não substituída,
10 arila substituída ou não substituída, arilalquilamidoalquila substituída ou não substituída, heteroarilamidoalquila substituída ou não substituída, heteroarilalquilamidoalquila substituída ou não substituída, arilalquila substituída ou não substituída, arilalcóxi substituída ou não substituída,
15 heteroarila substituída ou não substituída, heteroarilalquila substituída ou não substituída, haloalquila substituída ou não substituída, ou R₅₁ e R₅₂, junto com os átomos de carbono aos quais estão ligados, formam um grupo C=O ou um grupo alquenila substituída ou não substituída;

20 M¹ é N ou CR₄₉, onde R₄₉ é H ou alquila substituída ou não substituída;

M² é N ou CR₅₀, onde R₅₀ é H ou alquila substituída ou não substituída;

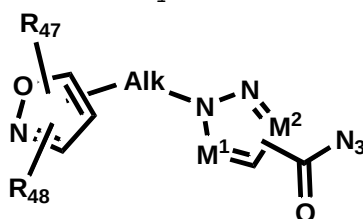
R₃₈ é H, alquila substituída ou não substituída, alquila
25 cicloalquila substituída ou não substituída, heterocicloalquilalquila substituída ou não substituída, arila substituída ou não substituída, arilamidoalquila substituída ou não substituída, heteroarilamidoalquila substituída ou não substituída, arilalquila substituída ou
30 não substituída, arilalcóxi substituída ou não substituída,

heteroarila substituída ou não substituída, heteroarilalquila substituída ou não substituída, ou haloalquila;

R_{47} é H, alquila substituída ou não substituída, alcóxi substituída ou não substituída, arila substituída ou não substituída, arilalquila ou halo; e

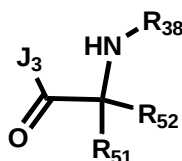
R_{48} é H, alquila substituída ou não substituída, alcóxi substituída ou não substituída, arila substituída ou não substituída, arilalquila ou halo;

onde o método compreende aquecer um composto de fórmula:



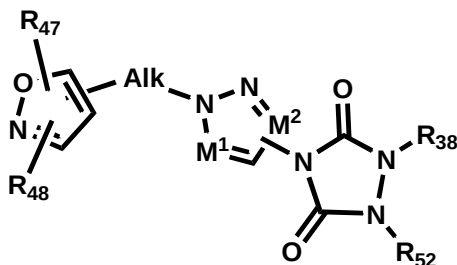
onde R_{47} , R_{48} , Alk, M^1 , e M^2 são definidos acima;

para converter o grupo $-\text{CON}_3$ em um grupo $-\text{N}=\text{C}=\text{O}$, e em seguida reagindo com um composto de fórmula:



onde J_3 é um grupo de partida e R_{38} , R_{51} , e R_{52} são definidos acima.

Ainda em outro aspecto, a invenção refere-se a um método de fazer o composto de fórmula:



ou um sal, hidrato, solvato, N-óxido ou pró-droga do mesmo,

onde Alk é um grupo alquila, opcionalmente interrompido por um heteroátomo;

R_{52} é H, alquila substituída ou não substituída, alquila cicloalquila substituída ou não substituída,

heterocicloalquilalquila substituída ou não substituída, arila substituída ou não substituída, arilamidoalquila substituída ou não substituída, heteroarilamidoalquila substituída ou não substituída, arilalquila substituída ou não substituída, arilalcóxi substituída ou não substituída, heteroarila substituída ou não substituída, heteroarilalquila substituída ou não substituída, haloalquila;

M^1 é N ou CR_{49} , onde R_{49} é H ou alquila substituída ou não substituída;

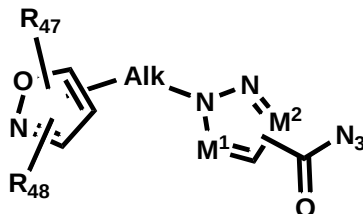
M^2 é N ou CR_{50} , onde R_{50} é H ou alquila substituída ou não substituída;

R_{38} é H, alquila substituída ou não substituída, alquila cicloalquila substituída ou não substituída, heterocicloalquilalquila substituída ou não substituída, arila substituída ou não substituída, arilamidoalquila substituída ou não substituída, heteroarilamidoalquila substituída ou não substituída, arilalquila substituída ou não substituída, arilalcóxi substituída ou não substituída, heteroarila substituída ou não substituída, heteroarilalquila substituída ou não substituída, ou haloalquila;

R_{47} é H, alquila substituída ou não substituída, alcóxi substituída ou não substituída, arila substituída ou não substituída, arilalquila ou halo; e

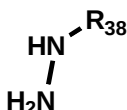
R_{48} é H, alquila substituída ou não substituída, alcóxi substituída ou não substituída, arila substituída ou não substituída, arilalquila ou halo;

onde o método compreende aquecer um composto de fórmula:



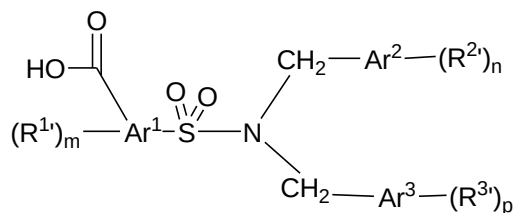
onde R_{47} , R_{48} , Alk, M^1 , e M^2 são definidos acima;

para converter o grupo $-CON_3$ em um grupo $-N=C=O$, e em seguida reagir com uma hidrazina de fórmula:



onde R_{38} é definido acima.

Ainda em outro aspecto, a invenção refere-se a um método de fazer o composto de fórmula:



(III)

5

ou um sal, hidrato, solvato ou N-óxido do mesmo onde:

Ar¹, Ar² e Ar³ são independentemente um anel arila, heteroarila, ou cicloalquila de cinco ou seis membros e Ar² e Ar³ podem opcionalmente serem omitidos;

10 $m \in 0, 1, 2$ ou 3 ;

n e p são independentemente 0, 1, 2, 3 ou 4;

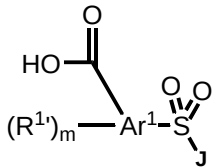
cada R¹ é selecionado independentemente a partir do grupo que consiste em hidrogênio, halogênio, alquila, alquila substituída, arila, arila substituída, arilalquila, arilalquila substituída, acila, acila substituída, heteroalquila, heteroalquila substituída, heteroarila, heteroarila substituída, heteroarilalquila, heteroarilalquila substituída, 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), e P(O)(R⁵)(OR⁶);

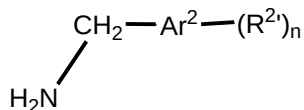
20

cada R^{3'} é independentemente selecionado a partir do grupo que consiste em hidrogênio, halogênio, alquila, alquila substituída, arila, arila substituída, arilalquila, arilalquila substituída, acila, acila substituída, heteroalquila, heteroalquila substituída, heteroarila, heteroarila substituída, heteroalquila, heteroalquila substituída, CN, NO₂, OR⁶, S(O)_bR⁶, NR⁶R⁷, CONR⁶R⁷, CO₂R⁶, NR⁶CO₂R⁷, NR⁶CONR⁷R⁸, NR⁶CSNR⁷R⁸, NR⁶C(=NH)NR⁷R⁸, SO₂NR⁵R⁶.

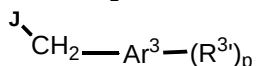
25

$\text{NR}^5\text{SO}_2\text{R}^6$, $\text{NR}^5\text{SO}_2\text{NR}^6\text{R}^7$, $\text{B}(\text{OR}^5)(\text{OR}^6)$, $\text{P}(\text{O})(\text{OR}^5)(\text{OR}^6)$, e
 $\text{P}(\text{O})(\text{R}^5)(\text{OR}^6)$; $\text{R}^5\text{-R}^8$ são independentemente hidrogênio,
 alquila, alquila substituída, arila, arila substituída,
 arilalquila, arilalquila substituída, heteroalquila,
 5 heteroalquila substituída, heteroarila, heteroarila
 substituída, heteroarilalquila ou heteroarilalquila
 substituída ou, de forma alternativa, R^6 e R^7 , R^7 e R^8 , junto
 com os átomos aos quais estão ligados formam um anel
 cicloheteroalquila ou cicloheteroalquila substituído; b é 0,
 10 1, ou 2; onde o método compreende reagir um composto de

fórmula:
 
 onde J é um grupo de partida; com um
 composto de fórmula:



para gerar um produto; e
 15 reagir o produto com um composto de fórmula:



onde J é um grupo de partida.

É um outro objeto da invenção utilizar compostos
 identificados nos ensaios descritos aqui como aditivos ou
 20 moduladores de sabor em composições com o objetivo de inibir
 ou bloquear o sabor amargo produzido por compostos que ativam
 especificamente estes receptores de sabor. Um objeto
 preferencial da invenção é usar um composto que inibe a
 ativação de pelo menos receptores T2R humanos com o objetivo
 25 de bloquear o sabor amargo de compostos presentes no café e
 alimentos, bebidas e medicamentos com sabor de café.

É ainda outro objeto da invenção utilizar compostos da
 presente invenção ao atuarem amplamente como bloqueadores de
 amargor para inibir o bloqueio do sabor amargo produzido por

compostos que ativam especificamente os receptores de sabor hT2R8, ligantes que ativam múltiplos receptores de sabor amargo, compostos amargos contendo especificidade desconhecida de receptor ou composições contendo múltiplos compostos amargos ou desconhecidos. Em uma modalidade, os compostos da invenção são utilizados para inibir a ativação de pelo menos receptores T2R humanos acima identificados e, por meio disso, bloquear o sabor amargo de compostos presentes no café e alimentos, bebidas e medicamentos com sabor de café. É um outro objeto da invenção conformar que os compostos identificados modula, preferencialmente inibem ou bloqueiam, o sabor amargo, por exemplo que é produzido pelo café e bebidas, alimentos e medicamentos com sabor de café em testes em humanos ou animais, preferencialmente em testes de degustação humanos.

É um outro objeto da invenção utilizar compostos identificados nos ensaios descritos aqui como aditivos ou moduladores de sabor em composições com o objetivo de inibir ou bloquear o sabor amargo produzido por compostos que ativam especificamente estes receptores de sabor. Um objeto preferencial da invenção é usar um composto que inibe a ativação de pelo menos receptores T2R humanos com o objetivo de bloquear o sabor amargo de compostos presentes no café e alimentos, bebidas e medicamentos com sabor de café.

Em uma modalidade especialmente preferencial, o Composto C e análogos do mesmo são usados para atuar amplamente como bloqueadores de amargor com o objetivo de inibir o sabor amargo produzido por compostos que ativam especificamente os receptores de sabor hT2R37, 10, 14, 16, 44, 51, 55, 61, 63, 64, 65, 71 e/ou hT2R5, 9, 13, 54, 67 e 75, compostos amargos que contêm especificidade de receptor desconhecida ou composições que contêm múltiplos ou compostos amargos desconhecidos. Dadas as amplas propriedades antagonistas do Composto C, este deve aliviar substancialmente o sabor amargo da maioria dos compostos amargos e composições que os contêm. Um objeto preferencial da invenção é usar um composto que

inibe a ativação de pelo menos um dos receptores T2R humanos acima identificados como o Composto C ou um análogo com o objetivo de bloquear o sabor amargo de compostos presentes no café e alimentos, bebidas e medicamentos com sabor de café.

5 **DESCRIÇÃO DETALHADA DAS FIGURAS**

FIG. 1 refere-se a experimentos onde uma fração parcialmente purificada de café é usada para triar os 25 receptores humanos T2R em células HEK temporariamente transfectadas como descrito pelo Requerente nos pedidos de patentes anteriores incorporados aqui para referência. Como 10 mostrado na FIG. 1, a fração do café ativou as células HEK293 temporariamente transfectadas com hT2R8 e hT2R14 em teste de imagem por cálcio. Um corante azul FD&C foi usado para reduzir o nível de fluorescência da fração de café, que 15 poderia interferir com o teste.

A FIG.2 é uma plotagem de $\Delta F/F$ vs. log da fração de café mostrando a resposta dependente de dose hT2R8 e hT2R14 para uma fração de sabor amargo derivada do café. O teste foi conduzido usando linhagens estáveis de células hT2R8 e hT2R14 20 e detector de fluorescência automatizado FLIPR.

A FIG. 3 é uma plotagem do percentual de inibição da atividade hT2R8 vs. log da concentração de um composto e mostra a inibição dependente de dose para compostos A e B em linhagem de célula estável expressando hT2R8.

25 A FIG. 4 é uma plotagem do percentual de inibição da atividade hT2R14 vs. log da concentração Composto C e mostra a inibição dependente do Composto C em linhagem de célula estável expressando hT2R8.

30 A FIG. 5 mostra a atividade inibitória do Composto C contra diferentes (2) receptores humanos de sabor.

35 A FIG. 6 é uma plotagem da atividade do receptor como uma função de log da concentração de sacarina. A FIG. 6 mostra as relações dependentes de dose e os efeitos de sacarina nas atividades do receptor em células transfectadas expressando variantes de hT2R43, hT2R44 e hT2R8. hT2R8 é menos responsivo à sacarina no ensaio in vitro que os alelos

"degustadores" hT2R43-W35 e hT2R44-W35, mas responde melhor do que os alelos "não-degustadores" hT2R43-S35 e hT2R44-R35.

DESCRIÇÃO DETALHADA DA INVENÇÃO

De acordo com a presente invenção, os compostos da presente invenção podem ser usados para aliviar ou reduzir o sabor amargo da composição, por exemplo, uma composição ingestível. Como usado aqui, "uma composição ingestível" inclui qualquer substância pretendida para consumo oral, seja sozinha ou junto com outras substâncias. A composição ingestível inclui ambos "produtos alimentares ou bebidas" e "produtos não-comestíveis". Por "produtos alimentares e bebidas" entende-se qualquer produto ingestível para consumo por humanos ou animais, incluindo sólidos, semi-sólidos ou líquidos (por exemplo, bebidas). O termo "produtos não ingestíveis" ou "composição não comestível" inclui suplementos, nutracêuticos, produtos de alimentos funcionais (por exemplo, qualquer alimento fresco ou processado reivindicado por ter propriedades de promoção da saúde e/ou prevenção de doenças além das funções nutricionais básicas de nutrientes fornecidos), farmacêuticos e medicamentos de venda livre, produtos de higiene oral como dentifrícios ou enxaguantes bucais, produtos cosméticos, como bálsamos labiais e outros produtos de cuidados pessoais.

A composição ingestível também inclui composição farmacêutica, medicinal ou comestível ou, de forma alternativa, em uma formulação, por exemplo, uma formulação farmacêutica ou medicinal ou um produto alimentício ou bebida ou formulação.

Os compostos da presente invenção podem ainda ser fornecidos, individualmente ou em combinação, com qualquer composição ingestível conhecida ou a ser descoberta. Por exemplo, a composição ingestível pode ser uma composição comestível ou uma composição não comestível. Por "composição comestível" entende-se qualquer composição que pode ser consumida como alimento por humanos ou animais, incluindo sólidos, géis, pasta, material espumoso, semi-

sólidos, líquidos ou misturas dos mesmos. Por "composição não comestível" entende-se qualquer composição que pretende ser consumida ou usada por humanos ou animais que não alimento, incluindo sólidos, géis, pasta, material espumoso, 5 semi-sólidos, líquidos ou misturas dos mesmos. A composição não comestível inclui, mas não está limitada a composição médica, o que refere-se a uma composição não comestível pretendida para ser usada por humanos ou animais para fins terapêuticos. Por "animal", inclui animal não humano, como 10 por exemplo, animais de fazenda e animais domésticos.

Em uma modalidade, os compostos da invenção podem ser adicionados a uma composição não comestível ou um produto não comestível como suplementos, nutracêuticos, produtos de alimentos funcionais (por exemplo, qualquer alimento fresco 15 ou processado reivindicado por ter propriedades de promoção da saúde e/ou prevenção de doenças além das funções nutricionais básicas de nutrientes fornecidos), farmacêuticos e medicamentos de venda livre, produtos de higiene oral como dentifrícios ou enxaguantes bucais, produtos cosméticos, como 20 bálsamos labiais e outros produtos de cuidados pessoais.

Em geral, o produto de venda livre (OTC) e o produto de higiene oral geralmente refere-se a produto para uso doméstico e/ou pessoal que pode ser vendido sem uma prescrição e/ou sem uma visita a um profissional médico. 25 Exemplos de produtos OTC incluem, mas não estão limitados a, Vitaminas e suplementos dietéticos; Analgésicos e/ou anestésicos tópicos; Remédios para tosse, resfriado e alergia; Remédios anti-histamínicos e/ou anti-alérgicos; e combinações dos mesmos. Vitaminas e suplementos dietéticos 30 incluem, mas não estão limitados a, vitaminas, suplementos dietéticos, bebidas nutritivas tônicas/engarrafadas, vitaminas específicas para crianças, suplementos dietéticos, quaisquer outros produtos de ou relacionados a fornecer nutrição, e combinações dos mesmos. Analgésicos e/ou 35 anestésicos tópicos incluem quaisquer cremes/pomadas/géis tópicos usados para aliviar dores superficiais ou profundas,

por exemplo, dores musculares; gel para dentição; adesivos com ingredientes analgésicos; e combinações dos mesmos. Remédios para tosse, resfriado e alergia incluem, mas não estão limitados a, descongestionantes, remédios para tosse, 5 preparações faríngeas, balas medicamentosas, remédios anti-histamínicos e para tosse específica de criança, resfriado e alergia; e combinações dos mesmos. Os remédios anti-histamínicos e/ou anti-alérgicos incluem, mas não estão limitados a, quaisquer tratamentos sistêmicos para febre do 10 feno, alergias nasais, picadas e mordidas de insetos. Exemplos de produtos de higiene oral incluem, mas não estão limitados a, tiras de limpeza bucal, pasta de dentes, escovas de dentes, enxaguantes bucais/limpadores de dentes, cuidados de próteses dentárias, refrescantes bucais, clareadores de 15 dentes domésticos e fio dental.

Em outra modalidade, os compostos da presente invenção podem ser adicionados a produtos alimentícios ou bebidas ou formulações. Exemplos de produtos alimentares ou bebidas ou formulações incluem, mas não estão limitados a, coberturas, 20 massas doces ou glacês para produtos comestíveis ou qualquer entidade incluída na categoria Sopa, a categoria de Alimentos Processados Secos, a categoria de Bebida, a categoria de Refeições Prontas, a categoria de Alimentos Preservados ou Enlatados, a Categoria de Alimentos Processados Congelados, a 25 categoria de Produtos Processados Resfriados, a categoria de Aperitivos, a categoria de Produtos Assados, a categoria de Confeitaria, a categoria de Produtos Laticínios, a categoria de Sorvetes, a categoria de Substituintes de Refeições, a categoria de Massas e Macarrões, a categoria Salsichas, 30 Molhos e Condimentos, a categoria de Alimentos para Bebês e/ou a categoria de Pastas.

Em geral a categoria de Sopa refere-se a sopa enlatada/preservada, desidratada, instantânea, UHT e congelada. Para os fins desta definição sopa(s) 35 significa(m) um alimento preparado a partir de carne, galinha, peixe, vegetais, grãos, frutas e outros

ingredientes, cozidos em um líquido que pode incluir pedaços visíveis de todos estes ingredientes. Pode ser claro (como um caldo) ou espesso (como uma sopa espessa), cremosa, tipo purê ou massivo para servir, condensada ou semi-condensada e
 5 pode ser servida quente ou fria, como a entrada de uma refeição principal ou como uma refeição rápida intermediária (bebericada como uma bebida). A sopa pode ser usada como um ingrediente para prepara outros componentes da refeição e pode variar desde caldos (consome) até molhos (sopas cremosas
 10 ou baseadas em queijo).

"Categoria de Alimentos Culinários e Desidratados" geralmente significa: (i) produtos para auxiliar a arte culinária como: pós, grânulos, pastas, produtos líquidos concentrados, incluindo caldos concentrados, caldos e
 15 produtos tipo caldos em cubos prensados, comprimidos ou na forma de pó ou granulado, que são vendidos separadamente como um produto final ou um ingrediente dentro de um produto, molho ou misturas de receitas (independente de tecnologia); (ii) Produtos para soluções de refeição como: sopas secas
 20 congeladas e desidratadas, incluindo misturas de sopas desidratadas, sopas instantâneas desidratadas, sopas desidratadas prontas para cozimento, preparações ambiente ou desidratadas de pratos, refeições ou entradas simples prontos, incluindo pratos de massa, batata e arroz; e (iii)
 25 Produtos para enfeitar refeições como: condimentos, marinados, molhos para salada, coberturas para saladas, molhos cremosos, empanados, misturas batidas, pastas sem necessidade de refrigeração, molhos de churrasco, misturas de receitas líquidas, concentrados, molhos ou misturas de
 30 molhos, incluindo misturas de receitas para salada, vendidas como produtos finais ou como um ingrediente dentro de um produto, seja desidratado, líquido ou congelado.

A categoria de Bebidas geralmente significa bebidas, misturas e concentrados de bebidas, incluindo, mas não
 35 limitado a, bebidas gaseificadas ou não gaseificadas, bebidas alcoólicas e não alcoólicas, bebidas prontas para beber,

formulações líquidas concentradas para preparações de bebidas como refrigerantes, e misturas precursoras de bebidas em pó seco. A categoria de Bebidas também inclui as bebidas alcoólicas, os refrigerantes, as bebidas esportivas, as
5 bebidas isotônicas e bebidas quentes. As bebidas alcoólicas incluem, mas não estão limitadas a, cerveja, cidra/perada, FABs, vinho e espíritos. Os refrigerantes incluem, mas não estão limitados a carbonatados, como os carbonatados de cola e não cola; sucos de fruta como sucos, néctars, bebidas de
10 suco e bebidas com sabor de fruta; água engarrafada, que inclui água com gás, água de fonte e água purificada/de mesa; bebidas funcionais, que podem ser gaseificadas ou ainda incluir bebidas esportivas, energéticas ou elixires; concentrados como líquido e concentrados em pó prontos para
15 medir a bebida. As bebidas quentes incluem, mas não estão limitadas a café, como café fresco (por exemplo, café preparado), instantâneo, café combinado, líquido, pronto para beber, bebidas solúveis de café e secas, misturas de bebidas de café e concentrados (na forma de xaropes, puros,
20 formulados ou em pó; exemplo de "forma de pó" é um produto que compreende café, adoçante, e branqueadores todos na forma de pó); chá, como chá preto, verde, branco, chinês e flavorizado; e outras bebidas quentes incluindo pós baseados em sabores, malte ou planta, grânulos, blocos ou comprimidos
25 misturados com leite ou água.

A categoria de Aperitivos geralmente refere-se a qualquer alimento que pode ser uma refeição leve informal, incluindo, mas não limitado a aperitivos condimentados ou doces e barras de lanches. Exemplos de lanches incluem, mas
30 não estão limitados a, aperitivos de fruta, chips/crisps, aperitivos extrusados, tortilla/flocos de milho, pipoca, pretzels, amêndoas e outros aperitivos doces e condimentados. Exemplos de lanches incluem, mas não estão limitados a barras de granola/cereais, barras de café da manhã, barras
35 energéticas e outros lanches.

A categoria de Produtos Assados geralmente refere-se a qualquer produto comestível, o processo de preparo que envolve a exposição ao calor ou luz solar excessiva. Exemplos de produtos cozidos incluem, mas não estão limitados a, pão, bolo de passas, biscoitos, muffins, cereais, bolos, waffles, tortillas, tortas, roscas, torta de frutas, pastéis, qualquer alimento cozido e qualquer combinação dos mesmos.

A categoria de Sorvete geralmente refere-se a sobremesas congeladas contendo creme e açúcar e flavorizante. Exemplos de sorvete incluem, mas não estão limitados a: picolé; sorvete, iogurte congelado e sorvete artesanal, sorvetes a base de soja, aveia, feijão (por exemplo, feijão azuki, feijão verde) e arroz.

A categoria de Confeitaria geralmente refere-se a produto comestível que é doce ao paladar. Exemplos de doces incluem, mas não estão limitados a, balas, gelatinas, doces de chocolate, doces açucarados, goma e semelhantes e quaisquer combinações dos produtos.

A categoria de Substituintes de Refeição geralmente refere-se a qualquer alimento que pretende substituir as refeições normais, particularmente para pessoas com questões de saúde ou emagrecimento. Exemplos de substituintes de refeições incluem, mas não estão limitados a, produtos para emagrecimento e produtos para convalescente.

A categoria de Refeição Pronta geralmente refere-se a qualquer alimento que pode ser servido como refeição sem preparação extensiva ou processamento. A refeição pronta inclui produtos que têm "habilidades" de receita adicionadas a eles pelo fabricante, resultando em um alto grau de rapidez, conclusão e conveniência. Exemplos de refeição pronta incluem, mas não estão limitados a refeições prontas enlatadas/preservadas, congeladas, secas, resfriadas; misturas para jantar; pizza congelada; pizza resfriada; e saladas preparadas.

A categoria de Massas e Macarrões inclui quaisquer pastas e/ou macarrões incluindo, mas não limitados a, massa

enlatada, seca e resfriada/fresca; e macarrões para refeições rápidas simples, instantâneos, resfriados, congelados.

A categoria de Alimentos Enlatados/Preservados inclui, mas não está limitada a, carne enlatada/preservada e produtos
5 de carne, peixe/frutos do mar, vegetais, tomates, feijões, fruta, refeições prontas, sopa, massa e outros alimentos enlatados/preservados.

A categoria de Alimento Processado Congelado inclui, mas não está limitada a, carne vermelha processada congelada,
10 galinha processada, peixe/frutos do mar processados, vegetais processados, substituintes de carne, batatas processadas, produtos de padaria, sobremesas, refeições prontas, pizza, sopa, macarrões e outros alimentos congelados.

A categoria de Alimento Processado Seco inclui, mas não
15 está limitada a, arroz, misturas de sobremesas, refeições prontas secas, sopa desidratada, sopa instantânea, pasta seca, macarrões planos, e macarrões instantâneos.

A categoria de Alimento Processado Resfriado inclui, mas não está limitada a, carnes processadas resfriadas, produtos
20 a base de peixe/frutos do mar processados, kits de almoço, frutas frescas cortadas, refeições prontas, pizza, saladas preparadas, sopa, pasta e macarrões frescos.

A categoria de Salsichas, Molhos e Condimentos inclui, mas não está limitada a, massas e purês de tomate, cubos de
25 marinado/caldo de carne, ervas e pimentas, glutamato monossódico (MSG), molho de soja, molhos a base de soja, molhos de massas, molhos úmidos/para cozinhar, molhos secos/misturas em pó, catshup, maionese, mostarda, molhos para saladas, vinagrete, molho cremoso, produtos em conserva
30 e outros molhos, coberturas e condimentos.

A categoria de Alimento para Bebê inclui, mas não está limitada a fórmula a base de leite ou semente de soja; e alimentos para bebês secos, preparados e outros.

A categoria de Pastas inclui, mas não está limitada a,
35 geléias e compotas, mel, pastas de chocolate, pastas a base de amêndoas e pastas a base de fermento.

A categoria de Produto Laticínios geralmente refere-se a produto comestível derivado de leite animal. Exemplos de produtos laticínios comestíveis incluem, mas não estão limitados a, produtos de leite para consumo, iogurte e
5 bebidas de soro de leite o outros produtos laticínios.

Exemplos adicionais para composição comestível, particularmente produtos alimentares e bebidas ou formulações, como fornecido a seguir. Composições exemplares comestíveis incluem um ou mais produtos de confeitaria,
10 confeitos de chocolate, pastilhas, bolinhos, produtos selflines/softlines cozidos, sortimentos em caixa, sortimentos padrões em caixa, miniaturas de tranças embaladas, chocolate sazonal, chocolate com brinquedos, alfajores, outros chocolates de confeitaria, confeitos de
15 hortelã, confeitos de hortelã padrão, confeitos de hortelã forte, balas doces, pastilhas, gomas, gelatinas e chicletes, toffees, caramelos e nugá, medicamentos em forma de confeitos, pirulitos, alcaçuz, outros produtos de confeitaria doces, gomas, chicletes de mascar, gomas açucaradas, gomas
20 sem açúcar, goma funcional, goma de mascar, pão, pão industrial/empacotado, pão artesanal/não empacotado, massas, tortas, tortas industriais/embaladas, tortas artesanais/não embaladas, cookies, biscoitos recheados com chocolate, biscoitos sanduíches, biscoitos e crackers condimentados,
25 substituintes de pão, cereais matinais, cereais, cereais matinais familiares, flocos, cereais, outros cereais, cereais matinais infantis, cereais quentes, sorvete, picolé, sorvete a base de leite de porção diária unitária, sorvete a base de água de porção unitária, sorvete a base de leite em múltiplas
30 porções, sorvete a base de água em múltiplas porções, sorvete para tomar em casa, sorvete a base de leite para tomar em casa, sobremesas de sorvete, sorvete in natura, sorvete a base de água para tomar em casa, iogurte congelado, sorvete artesanal, produtos laticínios, leite, leite
35 fresco/pasteurizado, leite integral fresco/pasteurizado, leite semi-desnatado fresco/pasteurizado, leite longa

vida/uht, leite integral longa vida/uht, leite semi-desnatado longa vida/uht, leite desnatado longa vida/uht, leite de cabra, leite condensado/evaporado, leite condensado/evaporado simples, com sabor ou funcionais e outros leites condensados, bebidas com sabor de leite, bebidas lácteas somente com sabor de leite, bebidas com suco de fruta sabor de leite, leite de soja, bebidas de coalhada, bebidas lácteas fermentadas, branqueadores de café (por exemplo, creme a base de laticínio ou não ou branqueadores para bebidas de café), leite em pó, bebidas com sabor de leite em pó, creme, queijo, queijo processado, queijo processado tipo requeijão, queijo processado que não o requeijão, queijo não processado, queijo duro, queijo duro embalado, queijo duro não embalado, iogurte, iogurte simples/natural, iogurte com sabor, iogurte com fruta, iogurte probiótico, bebida de iogurte, bebida regular de iogurte, bebida probiótica de iogurte, sobremesas resfriadas e sem necessidade de refrigeração, sobremesas a base de laticínios, sobremesas a base de soja, aperitivos resfriados, queijo tipo fromage e quark, queijo tipo fromage e quark simples, queijo tipo fromage e quark flavorizado, queijo tipo fromage e quark condimentado e aperitivos condimentados e doces, aperitivos frutais, chips/crisps, aperitivos extrusados, tortilla/chips de milho, pipoca, pretzels, amêndoas, outros aperitivos condimentados e doces, lanches, barras de granola, barras de café da manhã, barras energéticas, barras de frutas, refeições prontas, refeições prontas enlatadas, refeições prontas congeladas, refeições prontas secas, refeições prontas resfriadas, misturas para jantar, pizza congelada, pizza resfriada, sopa, sopa enlatada, sopa desidratada, sopa instantânea, sopa resfriada, sopa congelada, massa, massa enlatada, massa seca, massa fresca/resfriada, macarrões, macarrões simples, macarrões instantâneos, macarrões instantâneos em copos/tigelas, macarrões instantâneos de bolso, macarrões resfriados, macarrões para refeições leves, instantâneos e produtos a base de carne, peixe/frutos do mar enlatados, vegetais

enlatados, tomates enlatados, feijões enlatados, fruta enlatada, refeições prontas enlatadas, sopa enlatada, massa enlatada, outros alimentos enlatados, alimento congelado, carne vermelha processada congelada, galinha congelada processada, peixe/frutos do mar processados enlatados, 5 vegetais processados enlatados, substitutos de carne congelados, batatas congeladas, batata chips para ser cozida no forno, outros produtos que não batata para ser cozida no forno, batatas congeladas, produtos de panificação congelados, sobremesas congeladas, refeições prontas 10 congeladas, pizza congelada, sopa congelada, macarrões congelados, outros alimentos congelados, alimentos secos, misturas para sobremesas, refeições prontas secas, sopa desidratada, sopa instantânea, pasta seca, macarrões simples, 15 macarrões instantâneos, macarrões instantâneos em copos/togelas, macarrões instantâneos de bolso, alimento resfriado, carnes processadas resfriadas, peixe/frutos do mar resfriados, peixe processado resfriado, peixe empanado resfriado, peixe defumado resfriado, kit de almoço de 20 resfriado, refeições prontas resfriadas, pizza resfriada, sopa resfriada, massa fresca/resfriada, macarrões resfriados, óleos e gorduras, azeite, óleo de semente e vegetal, gorduras para cozinhar, manteiga, margarina, óleos e gorduras em pasta, óleos e gorduras funcionais em pasta, molhos, 25 coberturas e condimentos, molhos e purês de tomate, cubos de caldo de carne, cubos marinados, grânulos de molho de carne, liquid stocks and fonds, e fonds, ervas e pimentas, molhos fermentados, molhos a base de soja, molhos de massas, molhos úmidos, molhos secos/misturas de pó, catshup, maionese, 30 maionese normal, mostarda, molhos de salada, molhos regulares de salada, molhos de salada de baixas calorias, vinagretes, molhos cremosos, produtos em conserva, outros molhos, coberturas e condimentos, comida para alimentos, fórmula de leite padrão, fórmula de leite de continuação, fórmula de 35 leite para bebês, fórmula de leite hipoalergênico, alimento para bebê seco, outros alimentos para bebê, molhos cremosos,

geléias e compostas, mel, pasta de chocolate, pasta de amêndoa e pastas a base de leveruas. Exemplos de composições comestíveis também incluem produtos de confeitaria, produtos de padaria, sorvetes, produtos laticínios, aperitivos condimentados ou doces, lanches, produtos substituintes de refeições, refeições prontas, sopas, massas, macarrões, alimentos enlatados, alimentos congelados, alimentos secos, alimentos resfriados, óleos e gorduras, alimentos para bebês, ou pastas ou uma mistura dos mesmos. Exemplos de composições comestíveis também incluem cereais matinais, bebidas doces ou composições concentradas sólidas ou líquidas para preparo de bebidas. Exemplos de composições comestíveis também incluem alimentos com sabor de café (por exemplo, sorvete com sabor de café).

Tipicamente, uma quantidade suficiente para aliviar ou reduzir o sabor amargo associado com uma composição, por exemplo, uma composição ingestível é adicionada à composição para aliviar ou reduzir o sabor amargo associado com as composições como comparado à composições que são preparadas sem os compostos da presente invenção, conforme julgado pelos seres humanos ou animais. Ou, no caso de formulações de teste, como julgado pela maioria de uma equipe, por exemplo, oito degustadores humanos, através de procedimentos comumente conhecidos no campo.

A concentração dos compostos da presente invenção eficiente para aliviar ou reduzir o sabor amargo associado com a composição dependerá, é claro, de muitas variáveis, incluindo o tipo específico de composição comestível e seus vários ingredientes, a variabilidade genética natural e preferências individuais e condições de saúde de vários seres humanos testando as composições e o efeito subjetivo do composto particular no sabor de cada composto quimiosensor.

Em algumas modalidades, a concentração de compostos da presente invenção eficiente para aliviar ou reduzir o sabor amargo associado com uma composição é de cerca de 0,001 ppm até cerca de 100 ppm, por exemplo, de cerca de 0,1 ppm até

cerca de 100 ppm, de cerca de 1 ppm até cerca de 25 ppm, de
cerca de 1 ppm até cerca de 10 ppm, de cerca de 0,1 ppm até
cerca de 10 ppm, de cerca de 0,01 ppm até cerca de 30 ppm, de
cerca de 0,05 ppm até cerca de 10 ppm, de cerca de 0,01 ppm
5 até cerca de 5 ppm, de cerca de 0,02 ppm até cerca de 2 ppm,
ou de cerca de 0,01 ppm até cerca de 1 ppm.

É contemplado que em algumas modalidades da presente
invenção, uma mistura de um ou mais compostos da presente
invenção serão usados para aliviar ou reduzir o sabor amargo
10 associado com uma composição. A concentração de um ou mais
compostos pode ser a mesma ou a concentração de cada um dos
compostos pode ser diferente.

Antes de melhor descrever a invenção, as seguintes
definições são fornecidas.

15 O termo família "T2R" inclui variantes polimórficas,
alelos, mutantes e homólogos que: (1) têm cerca de 30-40% de
identidade de sequência de aminoácidos, mais especificamente
cerca de 40, 50, 60, 70, 75, 80, 85, 90, 95, 96, 97, 98, ou
99% de identidade de sequência de aminoácidos para os
20 divulgados abaixo e em nos pedidos de Zuker (Id) (2001) e
Adler (Id.) (2001) incorporados aqui para referência, sobre
uma janela de cerca de 25 aminoácidos, otimamente de 50-100
aminoácidos; (2) se ligam especificamente aos anticorpos
construídos contra um imunógeno compreendendo uma sequência
25 de aminoácidos selecionada a partir do grupo que consiste em
sequências de T2R descritas abaixo e variantes modificadas de
forma conservada dos mesmos; (3) hibridizam especificamente
(com um tamanho de pelo menos 100, opcionalmente pelo menos
cerca de 500-1000 nucleotídeos) sob condições estritas de
30 hibridização para uma sequência selecionado a partir do grupo
que consiste em sequências de DNA de T2R descritas abaixo, e
variantes modificadas de forma conservada dos mesmos; (4)
compreende uma sequência de pelo menos cerca de 40% idêntica
a uma sequência de aminoácido selecionada a partir do grupo
35 que consiste em sequências de aminoácidos de T2R descritas
abaixo ou (5) são amplificados por primers que hibridizam

especificamente sob consequências estritas de hibridização para as sequências de T2R descritas abaixo.

Em particular, estes "T2Rs" incluem receptor de sabor GPCRs referenciados aqui como hT2R8 e hT2R14 contendo as
5 sequências de ácido nucleico fornecidas neste pedido, e variantes, alelos, mutantes, ortólogos e quimeras dos mesmos que se ligam especificamente a ligantes de amargo que são identificados aqui e outros compostos estruturalmente relacionados e compostos amargos.

10 Enquanto os genes de T2R exibem divergência de sequência substancial tanto a nível de proteína quanto a nível de DNA, todos os T2Rs isolados até o momento demonstraram conter certas sequências de consenso em regiões particulares que são idênticas ou que possuem ou pelo menos 70-75% de identidade
15 de sequência à sequência de consenso de T2R identificada anteriormente nos pedidos de Adler et al (WO 01/77676 A1 (2001) e Zuker et al. WO 01/18050 A2, ambos incorporados aqui para referência em sua totalidade.

Topologicamente, certos GPCRs quimiosensores tem um
20 "domínio N-terminal", "domínios extracelulares", um "domínio transmembranar" que compreendem sete regiões transmembranares e voltas citoplasmáticas e extracelulares correspondentes, "regiões citoplasmáticas" e uma "região C-terminal" (vide, por exemplo, Hoon et al, Cell, 96:541-51 (1999); Buck & Axel,
25 Cell, 65:175-87 (1991)). Estas regiões podem ser estruturalmente identificadas usando métodos conhecidos pelos especialistas na técnica, como programas de análise de sequências que identificam domínios hidrofóbicos e hidrofílicos (vide, por exemplo, Stryer, Biochemistry, (3rd
30 ed. 1988); vide também qualquer um de um número de programas de análise de sequências baseados na Internet, como aqueles encontrados em dot.imgen.bcm.tmc.edu). Estas regiões são úteis para fazer proteínas quimeras e para ensaios in vitro da invenção, por exemplo, ensaios de ligação de ligantes.
35 Por exemplo, T2Rs quimeras podem ser feitas pela combinação

da região extracelular de um T2R e a região transmembrana de outro T2R de espécies iguais ou diferentes.

Os "domínios extracelulares" referem-se, portanto, à domínios de polipeptídeos T2R que sobressaem da membrana celular e são expostos à face extracelular da célula. Tais
5 regiões incluiriam o "domínio N-terminal" que é exposto à face extracelular da célula, bem como as alças extracelulares do domínio transmembranar que são expostos à face extracelular da célula, ou seja, as alças extracelulares
10 entre as regiões transmembranares 2 e 3, regiões transmembranares 4 e 5 e as regiões transmembranares 6 e 7. O "domínio N-terminal" inicia-se na terminação-N e se estende até a região próxima ao início da região transmembranar. Estas regiões extracelulares são úteis para os ensaios de
15 ligações de ligantes in vitro, ambos solúveis e em fase sólida. Além disso, as regiões transmembranares, descritas abaixo também podem estar envolvidas em ligação de ligantes, seja em combinação com a região extracelular e, portanto, também úteis para os ensaios de ligação de ligantes in vitro.

20 "Célula de Expressão de T2R" aqui engloba as células recombinantes que expressam uma sequência T2R humana, de acordo com a invenção, bem como células que expressam T2R endógenos. Tais células estão compreendidas no sistema lingual e gastrointestinal e incluem células na cavidade oral
25 como os botões de gosto na língua, bem como células no sistema gastrointestinal e órgãos associados como células em escova no trato gastrointestinal, células enteroendócrinas como as células STC-1. Estas células podem ainda expressar uma proteína G como gustducina, transducina, $G_{\alpha 15}$ ou $G_{\alpha 16}$.
30 Células que expressam T2R específicos podem ser identificadas e isoladas por métodos conhecidos como procedimentos de separação de células FACS e/ou isolamento de célula em leito magnético.

"Domínio transmembranar", que compreende as sete
35 "regiões" transmembranares referem-se ao domínio de polipeptídeos de T2R que ficam dentro da membrana plasmática

e pode ainda incluir as alças citoplasmáticas (intracelulares) e extracelulares correspondentes, também chamadas de "regiões" transmembranares. As sete regiões transmembranares e alças extracelulares e citoplasmáticas
5 podem ser identificadas usando métodos padrões, como descrito em Kyte & Doolittle, J. Mol. Biol., 157: 105-32 (1982)), ou em Stryer, acima.

"Domínios citoplasmáticos" referem-se aos domínios de proteínas T2R que cobrem o interior da célula, por exemplo, o
10 domínio C-terminal e as alças intracelulares do domínio transmembranar, por exemplo, as alças intracelulares entre as regiões transmembranares 1 e 2, regiões transmembranares 3 e 4, e regiões transmembranares 5 e 6. O "domínio C-terminal" refere-se à região que atravessa desde o final até a última
15 região transmembranar da C-terminação da proteína e que normalmente fica localizada dentro do citoplasma.

O termo "receptor 7-transmembranar" significa um polipeptídeo que pertence à superfamília de proteínas que tem sete regiões que atravessam a membrana plasmática sete vezes
20 (então, as sete regiões são chamadas de "transmembranares" ou "TM" domínios TM I a TM VII). As famílias de receptores olfatórios e certos receptores de sabor cada pertencem a esta superfamília. Os polipeptídeos do receptor 7-transmembranar têm características primárias, estruturas secundárias e
25 terciárias semelhantes como discutido em detalhes mais abaixo.

O termo "região de ligação de ligantes" refere-se à sequências derivadas de um receptor quimiosensor ou de sabor que incorpora substancialmente os domínios transmembranares
30 II a VII (TM II a VII). A região pode ser capaz de ligar um ligante e, mais particularmente, um composto que produz sabor.

O termo "domínio de translocação da membrana plasmática" ou simplesmente "domínio de translocação" significa um
35 domínio polipeptídico que quando incorporado no término amino de uma sequência que codifica um polipeptídeo, pode com

grande eficiência "acompanhar(chaperonar)" ou "translocar" a proteína híbrida ("fusão") para a membrana plasmática celular. Por exemplo, um "domínio de translocação" particular inicialmente derivada do término amino do receptor polipeptídeo humano de rodopsina, um receptor 7-transmembranar pode ser usado. Outro domínio de translocação foi derivado da sequência de rodopsina e também é útil para facilitar a translocação. As sequências derivadas de rodopsina são particularmente eficientes na translocação de proteínas de fusão 7-transmembranares para a membrana plasmática.

"Equivalência funcional" significa a capacidade e eficiência do domínio em translocar proteínas recentemente transladas para a membrana plasmática como eficientemente em um domínio de translocação exemplar como um derivado de rodopsina sob condições semelhantes; eficiência relativas podem ser medidas (em termos quantitativos) e comparado, como descrito aqui. Domínios que caem dentro do escopo da invenção podem ser determinados por triagem de rotina para suas eficiências em translocar polipeptídeos recentemente sintetizados para a membrana plasmática em uma célula (mamífera, *Xenopus* e semelhantes) com a mesma eficiência que vinte longos domínios aminoácidos de translocação SEQ ID NO:1.

A sentença "efeitos funcionais" no contexto dos ensaios para testar compostos que modulam membro da família T2R que mediam transdução de sabor incluem a determinação de qualquer parâmetro que está direta ou indiretamente sob a influência do receptor, por exemplo, efeitos funcionais, físicos e químicos. Isso inclui ligação de ligantes, alterações no fluxo de íon, potencial de membrana, fluxo de corrente, transcrição, ligação de proteína G, fosforilação ou desfosforilação GPCR, transdução de sinal, interações receptor-ligante, concentrações de segundo mensageiro (por exemplo, cAMP, cGMP, IP3, ou Ca^{+2} intracelular), in vitro, in vivo e ex vivo também inclui outros efeitos fisiológicos como

aumento ou diminuição de liberação de neurotransmissores ou hormônios.

Por "determinação de efeito funcional" entende-se ensaios para um composto que aumentam ou diminuem um
5 parâmetro que está direta ou indiretamente sob a influência de um membro da família T2R, por exemplo, efeitos funcionais, físicos e químicos. Tais efeitos funcionais podem ser medidos por quaisquer meios conhecidos pelos especialistas na técnica, por exemplo, alterações nas características
10 espectrométricas (por exemplo, fluorescência, absorbância, índice de refração), hidrodinâmica (por exemplo, formato), cromatográficas ou propriedades de solubilidade, técnicas de patch-clamping, corantes sensíveis a voltagem, correntes da célula total, efluxo de radioisótopo, marcadores induzíveis,
15 expressão de gene T2R de oócito; expressão de T2R em célula de cultura de tecido; ativação transcricional de genes T2R; ensaios de ligação de ligantes; alterações de voltagem, potencial de membrana e condutância; ensaios de fluxo de íons; alterações nos mensageiros secundários intracelulares
20 como cAMP, cGMP e trifosfato de inositol (IP3); alterações nos níveis de cálcio intracelular; liberação de neurotransmissores e semelhantes.

"Inibidores", "ativadores" e "moduladores" de receptores de proteínas T2R são usados de forma intercambiável para
25 referir-se à moléculas inibitórias, ativadoras ou moduladoras identificadas usando ensaios in vitro e in vivo para transdução de sabor, por exemplo, ligantes, agonistas, antagonistas e seus análogos e miméticos. Inibidores são compostos que, por exemplo, se ligam a, bloqueando a
30 estimulação total ou parcialmente, diminuindo, prevenindo, atrasando, ativando, desativando, dessensibilizando, ou infraregulando a transdução de sabor, por exemplo, antagonistas. Ativadores são compostos que, por exemplo, se ligam a, estimulam, aumentam, abrem, ativam, facilitam,
35 aumentam a ativação, sensibilizam, ou infra-regulação de transdução de sabor, por exemplo, agonistas. Os moduladores

incluem compostos que, por exemplo, alteram a interação de um receptor com proteínas extracelulares que ligam ativadores ou inibidores (por exemplo, ebnerinae outros membros da família de carreadores hidrofóbicos); Proteínas G; quinases (por exemplo, homólogos de rodopsina quinase e quinases receptoras de beta adrenérgicos que estão envolvidas na desativação de dessensibilização de um receptor); e arrestinas, que também desativam e dessensibilizam receptores. Os moduladores incluem versões geneticamente modificadas de membros da família T2R, por exemplo, com atividade alterada, bem como de ligantes sintéticos e de ocorrência natural, antagonistas, agonistas, pequenas moléculas químicas e semelhantes.

Tais ensaios para inibidores e ativadores incluem, por exemplo, a expressão de membros da família T2R em células ou membranas de células aplicando compostos moduladores putativos na presença ou ausência de compostos que modulam, por exemplo, compostos amargos e em seguida determinando os efeitos funcionais de transdução de sabor, como descrito acima. Amostras ou ensaios compreendendo membros da família T2R que são tratados com um ativador, inibidor ou modulador potencial são comparadas com amostras de controle sem o inibidor, ativador ou modulador para examinar a extensão da modulação. As amostras de controle (não tratadas com moduladores) são designadas com um valor de atividade de T2R relativo de 100%. A inibição de um T2R é alcançado quando uma um valor de atividade de T2R em relação ao controle é de cerca de 80%, opcionalmente 50% ou 25-0%. A ativação de um T2R é alcançada quando o valor da atividade de T2R em relação ao controle é de 110%, opcionalmente 150%, opcionalmente 200-500% ou 1000-3000% maiores.

Os termos "purificado", "substancialmente purificado" e "isolado" são usados aqui para referir-se ao estado de estar livre de outro, composto diferente com o qual o composto da invenção é normalmente associado em seu estado natural. Preferencialmente, "purificado", "substancialmente purificado" e "isolado" significam que a composição

compreende pelo menos 0,5%, 1%, 5%, 10%, ou 20%, e mais preferencialmente pelo menos 50% ou 75%, em peso, de uma dada amostra. Em uma modalidade preferencial, os termos referem-se ao composto da invenção que compreende pelo menos 95% de massa, em peso, de uma dada amostra. Como usado aqui, os termos "purificado", "substancialmente purificado" e "isolado", quando fazem referência a um ácido nucleico ou proteína, de ácidos nucleicos ou proteínas, também referem-se ao estado de purificação ou concentração diferente do que quando ocorre naturalmente no organismo de mamíferos, especialmente humanos. Qualquer grau de purificação ou concentração maior do que o que ocorre naturalmente no organismo de mamíferos, especialmente humanos, inclui (1) a purificação de outras estruturas ou compostos associados ou (2) a associação com estruturas ou compostos para o qual estão normalmente associadas com o organismo de mamífero, especialmente humanos, estão dentro do significado de "isolado". O ácido nucleico ou proteína ou classes de ácidos nucleicos ou proteínas, descritos aqui, podem ser isolados ou, de outra forma, associado com estruturas ou compostos para os quais estão normalmente associados in natura, de acordo com uma variedade de métodos e processos conhecidos pelos especialistas no assunto.

Como usado aqui, o termo "isolado", quando faz referência a um ácido nucleico ou polipeptídeo refere-se ao estado de purificação ou concentração diferente do que quando ocorre naturalmente no organismo de mamíferos, especialmente humanos. Qualquer grau de purificação ou concentração maior do que o que ocorre naturalmente no organismo, incluindo (1) a purificação de outras estruturas ou compostos associados de ocorrência natural ou (2) a associação com estruturas ou compostos para o qual estão normalmente associadas com o organismo, estão dentro do significado de "isolado", como usado aqui. Os ácidos nucleicos ou polipeptídeos descritos aqui, podem ser isolados ou, de outra forma, associado com estruturas ou compostos para os quais estão normalmente

associados in natura, de acordo com uma variedade de métodos e processos conhecidos pelos especialistas no assunto.

Como usado aqui, os termos "amplificação" e "recombinação" referem-se ao uso de qualquer metodologia de
5 amplificação adequada para geração ou detecção de ácido nucleico recombinante ou expresso naturalmente, como descrito em detalhe, abaixo. Por exemplo, a invenção fornece métodos e reagentes (por exemplo, pares de primers específicos de oligonucleotídeos) para amplificação (por exemplo, reação de
10 polimerase em cadeia, PCR) naturalmente expressos (por exemplo, genômico ou mRNA) ou ácidos nucleicos recombinantes (por exemplo, cDNA) da invenção (por exemplo, sequências de compostos ligantes que produzem sabor da invenção) in vivo ou in vitro.

15 O termo "vetor de expressão" refere-se a qualquer sistema de expressão de recombinante para o propósito de expressar uma sequência de ácido nucleico da invenção in vitro ou in vivo, de forma constitutiva ou induzível, incluindo célula procarióticas, de levedura, de fungos, de
20 plantas, insetos ou mamíferos. O termo inclui sistemas de expressão linear ou circular. O termo inclui sistemas de expressão que permanecem episomais ou integrado no genoma da célula hospedeira. Os sistemas de expressão podem ter a capacidade de se auto-replicar, ou seja, direcionar somente
25 expressão temporária em uma célula. O termo inclui expressão recombinante "cassetes" que contêm somente os elementos mínimos necessários para a transcrição do ácido nucleico recombinante.

O termo "biblioteca" significa uma preparação que é uma
30 mistura de diferentes ácidos nucleicos ou moléculas de polipeptídeos, como a biblioteca de sensores recombinados gerados, particularmente regiões de ligação de ligantes de receptor de sabor gerados por amplificação de ácido nucleico com pares de primers degenerados ou uma coleção de vetores
35 isolados que incorporam as regiões de ligação do ligante amplificadas, ou uma mistura de células transfectadas

aleatoriamente com pelo menos um vetor codificando um receptor de sabor.

O termo ácido "nucleico" ou "sequência de ácido nucleico" refere-se a um deoxiribonucleotídeo
5 oligonucleotídeo ribonucleotídeo seja na forma de fita simples ou fita dupla. O termo engloba ácidos nucleicos, ou seja, oligonucleotídeos contendo análogos de nucleotídeos naturais. O termo também engloba estruturas semelhantes a ácidos nucleicos com estrutura principal sintética.

10 Salvo se indicado de outra forma, uma sequência particular de ácido nucleico também engloba implicitamente variantes modificadas de forma conservada dos mesmos (por exemplo, substituições de códon degenerado) e sequências complementares, bem como a sequência explicitamente indicada.
15 Especificamente, as substituições de códon degenerado podem ser alcançadas ao gerar, por exemplo, sequências nas quais a terceira posição de um ou mais códons selecionados são substituídos com resíduos de base misturadas e/ou deoxiinosina (Batzer et al., Nucleic Acid Res., 19:5081
20 (1991); Ohtsuka et al., J. Biol. Chem., 260: 2605-08 (1985); Rossolini et al., Mol. Cell. Probes, 8:91-98 (1994)). O termo ácido nucleico é usado de forma intercambiável com cDNA, mRNA, oligonucleotídeo e polinucleotídeo.

Os termos "polipeptídeo", "peptídeo" e "proteína" são
25 usados de forma intercambiável aqui para referir-se a um polímeros de resíduos de aminoácidos. Os termos se aplicam a polímeros de aminoácidos nos quais um ou mais resíduos de aminoácidos são um mimetismo químico artificial de um aminoácido de ocorrência natural correspondente, bem como
30 polímeros de aminoácidos de ocorrência natural e polímero de aminoácido de ocorrência não natural.

Como usado aqui, "alquila" bem como outros grupos contendo o prefixo "alk" como, por exemplo, alcóxi, alcanóila, alquenila, alquinila e semelhantes, significa
35 cadeias de carbono que podem ser linear ou ramificada ou combinações das mesmas. Exemplos de grupos alquilas incluem

metila, etila, propila, isopropila, butila, sec- e tert-butila, pentila, hexila, heptila e semelhantes. Os grupos preferenciais de alquilas contém 1-4 carbonos. "Alquenila" e outros termos semelhantes incluem cadeias de carbono que
5 contém pelo menos uma ligação carbono-carbono insaturada. "Alquinila" e outros termos semelhantes incluem cadeias de carbono que contém pelo menos uma tripla ligação carbono-carbono.

O termo "cicloalquila" significa carbociclos não
10 contendo nenhum heteroátomo e incluem carbociclos saturados mono, bi ou tricíclicos, bem como sistemas de anéis fundidos. Exemplos de cicloalquila incluem ciclopropila, ciclobutila, ciclopentila, ciclohexila, decahidronaftaleno, adamantano, indanila, indenila, fluorenila, 1,2,3,4-tetrahidronaftaleno e
15 semelhantes.

O termo "arila" significa um substituinte não aromático que é um anel simples ou múltiplos anéis juntos fundidos. Grupos arilas exemplares incluem, sem limitação, grupos fenila, naftila, antracenila, piridinila, pirazinila,
20 pirimidinila, triazinila, tiofenila, furanila, pirrolila, oxazolila, imidazolila, triazolila e tetrazolila. Os grupos arila que contém um ou mais heteroátomos (por exemplo, piridinila) são geralmente referidos como "grupos heteroarilas". Quando formados de múltiplos anéis, pelo
25 menos um dos anéis constituintes é aromático. Em algumas modalidades, pelo menos um dos múltiplos anéis compreende um heteroátomo, através disso formando grupos arilas contendo heteroátomos. Os grupos arila contendo heteroátomos incluem, sem limitação, grupos benzoxazolila,
30 benzimidazolila, quinoxalinila, benzofuranila e 1H-benzo[d][1,2,3]triazolila. Os grupos arila contendo heteroátomo também incluem, sem limitação, grupos 2,3-dihidrobenzo[b][1,4]dioxinila e benzo[d][1,3]dioxolila. Os grupos arila contendo heteroátomo também incluem anéis
35 aromáticos fundidos a um anel heterocíclico compreendendo pelo menos um heteroátomo e pelo menos um grupo carbonila.

Tais grupos incluem, sem limitação, grupos dioxo tetrahydroquinoxalinila e dioxo tetrahydroquinazolinila.

O termo "arilalcóxi" significa um grupo arila ligado a um grupo alcóxi.

5 O termo "arilamidoalquila" significa uma arila-C(O)NR-alquila ou arila-NRC(O)-alquila.

O termo "arilalquilamidoalquila" significa uma arila-alquila-C(O)NR-alquila ou arila-alquila-NRC(O)-alquila, onde R é um grupo anila apropriado listado abaixo.

10 O termo "arilalquila" refere-se a um grupo arila ligado a um grupo alquila.

O termo "halogênio" ou "halo" refere-se a cloro, bromo, flúor ou iodo.

O termo "grupo de partida" refere-se a um grupo
15 funcional ou átomo que pode ser deslocado por outro grupo funcional ou átomo em uma reação de substituição, como a reação de substituição nucleofílica. Para exemplificar, os grupos de saída representativos incluem grupos de cloro, bromo e iodo; grupos ésteres sulfônicos, como mesilato, tosilato, brosilato, nosilato e semelhantes; e grupos
20 acilóxi, como acetóxi, trifluoroacetóxi e semelhantes.

O termo "haloalquila" significa um grupo alquila contendo um ou mais átomos de halogênio (*por exemplo*, CF₃).

O termo "heteroalquila" refere-se a uma meia alquila que
25 compreende um heteroátomo como N, O, P, B, S, ou Si. O heteroátomo pode ser conectado ao resto da meia heteroalquila através de uma ligação saturada ou insaturada. Assim, uma alquila substituída com um grupo como uma heterocicloalquila, heterocicloalquila, heteroarila, heteroarila substituída,
30 alcóxi, arilóxi, borila, fosfino, amino, silila, tio, ou seleno, está dentro do escopo do termo heteroalquila. Exemplos de heteroalquilas incluem, mas não estão limitadas a ciano, benzoila, 2-piridila e 2-furila.

O termo "heteroarilalquila" significa um grupo
35 heteroarila ao qual um grupo alquila está ligado.

O termo "heterociclo" significa um anel monocíclico ou policíclico compreendendo átomos de carbono e hidrogênio, opcionalmente contendo 1 ou 2 ligações múltiplas, e os átomos do anel contêm pelo menos um heteroátomo, especificamente 1 a 4 heteroátomos, independentemente selecionados a partir de nitrogênio, oxigênio e enxofre. As estruturas de heterociclo incluem, mas não estão limitadas a, compostos mono, bi e tricíclicos. Heterociclos específicos são monocíclicos ou bicíclicos. Heterociclos representativos incluem ureias cíclicas, morfolinila, pirrolidinonila, pirrolidinila, piperidinila, piperazinila, hidantoinila, valerolactamila, oxiranila, oxetanila, tetrahidrofuranila, tetrahidropiranila, tetrahidropiridinila, tetrahidroprimidinila, tetrahidrotiofenila, tetrahidrotiopiranila, tetrazolila, and urazolila. Um anel heterocíclico pode ser substituído ou não substituído. Heterociclos preferenciais são heterociclos de 5 e 6 membros, particularmente hidantoinila e urazolila.

O termo "heterocicloalquila" refere-se a um grupo cicloalquila onde pelo menos um dos átomos de carbono no anel é substituído por um heteroátomo (*por exemplo*, O, S ou N).

O termo "heterocicloalquilalquila" significa um grupo heterocicloalquila no qual um grupo alquila está ligado.

O termo "substituído" prevê e permite especificamente uma ou mais substituições que são comuns na técnica. No entanto, entende-se geralmente pelos especialistas no assunto que os substituintes devem ser selecionados de forma que não afetem de forma adversa as características úteis do composto ou interfiram de forma adversa com sua função. Substituintes apropriados podem incluir, por exemplo, grupos halo, grupos perfluoroalquilas, grupos perfluoroalcóxi, grupos alquila, grupos alquenila, grupos alquinila, grupos hidróxi, grupos oxo, grupos mercapto, grupos alquiltio, grupos alcóxi, grupos arila ou heteroarila, grupos arilóxi ou heteroarlióxi, grupos aralquilaou heteroaralquila, grupos aralcóxi ou heteroaralcóxi, grupos amino, grupos alquilamino e

dialquilamino, grupos carbamoila, grupos alquilcarbonila, grupos carboxila, grupos alcóxicarbonila, alquilaminocarbonila, grupos dialquilamino carbonila, grupos arilcarbonila, grupos ariloxicarbonila, grupos alquilsulfonila, grupos arilsulfonila, cicloalquila, grupos ciano, grupos alquition C₁-C₆, grupos arílio, grupos nitro, grupos ceto, grupos acila, grupos boronato ou boronila, grupos fosfato ou fosfonila, grupos sulfamila, grupos sulfonila, grupos sulfinila, e combinações dos mesmos. No caso de combinações substituídas, como "arilalquila substituída", seja o grupo arila ou o grupo alquila podem ser substituídos ou ambos os grupos arila e alquila podem ser substituídos com um ou mais substituintes. Adicionalmente, em alguns casos, os substituintes apropriados combinam para formar um ou mais anéis como conhecidos pelos especialistas no assunto.

Os compostos descritos aqui contêm um ou mais ligações duplas e podem então gerar isômeros cis/trans bem como outros isômeros os conformacionais. A presente invenção inclui todos os possíveis isômeros bem como misturas de tais isômeros.

Os compostos descritos aqui, e particularmente os substituintes descritos acima podem conter um ou mais centros assimétricos e pode, portanto, gerar diastômetos e isômeros ópticos. A presente invenção inclui todos os possíveis diastereômeros bem como suas misturas racêmicas, seus enantiômeros substancialmente puro resolvido, todos os possíveis isômeros geométricos e todos os sais aceitáveis do mesmo. Além disso, misturas de esteroisômeros bem como esteroisômeros isolados específicos também estão incluídos. Ao longo do curso de procedimentos de síntese usados para preparar tais compostos ou no uso de processos de racemização ou epimerização conhecidos pelos especialistas na técnica, os produtos de tais procedimentos podem ser uma mistura de esteroisômeros.

Como usado aqui, o termo "sais" e "sais farmacêuticamente aceitáveis" referem-se a derivados dos

compostos descritos onde o composto parente é modificado ao transformar em sais ácidos ou básicos dos mesmos. Exemplos de sais farmaceuticamente aceitáveis incluem, mas não estão limitados a, sais minerais ou ácidos orgânicos de grupos básicos como amina; sais álcali ou orgânicos de grupos ácidos como os ácidos carboxílicos. Sais farmaceuticamente aceitáveis incluem os sais convencionais não-tóxicos dos sais de amônio quaternário do composto parente formado, por exemplo, a partir de ácidos inorgânicos ou orgânicos não-tóxicos. Por exemplo, tais sais convencionais não tóxicos incluem aqueles derivados de ácidos inorgânicos como cloridrato, bromidrato, sulfúrico, sulfâmico, fosfórico, e nítrico; os sais preparados a partir de ácidos orgânicos como acético, propiônico, succínico, glicólico, esteárico, láctico, málico, tartárico, cítrico, ascórbico, pamóico, maleico, hidroximaleico, fenilacético, glutâmico, benzoico, salicílico, sulfanílico, 2-acetoxibenzoico, fumárico, toluenosulfônico, metanesulfônico, etano disulfônico, oxálico, e isetiônico e semelhantes.

Os sais farmaceuticamente aceitáveis da presente invenção podem ser sintetizados a partir do composto parente que contém uma metade básica ou ácida através de métodos químicos convencionais. Geralmente, tais sais podem ser preparados pela reação de ácido livre ou forma básica destes compostos com um quantidade estequiométrica da base ou ácido apropriados em água ou em um solvente orgânico ou em uma mistura dos dois; geralmente meio não aquoso, tipo éter, acetato de etila, etanol, isopropanol ou acetonitrila são preferenciais. Listas de sais apropriados são encontrados em *Remington's Pharmaceutical Sciences*, 17th ed., Mack Publishing Company, Easton, Pa., 1985, p. 1418, a descrição do qual está aqui incorporada para referência.

O termo "solvato" significa um composto, ou um sal do mesmo que inclui ainda uma quantidade estequiométrica ou não estequiométrica de um solvente ligado por forças

intermoleculares não covalentes. Onde o solvente é água, o solvato é um hidrato.

O termo "pró-droga" significa um derivado de um composto que pode hidrolisar, oxidar ou de outra forma reagir sob condições biológicas (in vitro ou in vivo) para fornecer um composto ativo, particularmente um composto da invenção. Exemplos de pró-fármacos incluem, mas não estão limitados a, derivados e metabólitos de um composto da invenção que incluem metades biohidrolizáveis como amidas biohidrolizáveis, ésteres biohidrolizáveis, carbamatos biohidrolizáveis, carbonatos biohidrolizáveis, ureídas biohidrolizáveis e análogos de fosfato biohidrolizáveis. Pró-drogas específicas de compostos com grupos funcionais carboxila são os menores ésteres alquila do ácido carboxílico. Os ésteres carboxilatos são convenientemente formados por esterificação das metades dos ácidos carboxílicos na molécula. Pró-drogas podem tipicamente ser preparadas por métodos bem conhecidos, como os descritos por *Burger's Medicinal Chemistry and Drug Discovery* 6th ed. (Donald J. Abraham ed. , 2001, Wiley) and *Design and Application of Prodrugs* (H. Bundgaard ed., 1985, Harwood Academic Publishers GmFh). Como usado aqui e, salvo se indicado de outra forma, os termos "amida biohidrolizável", "éster biohidrolizável", "carbamato biohidrolizável", "carbonato biohidrolizável", "ureído biohidrolizável", "fosfato biohidrolizável" significam uma amida, um éster, um carbamato, um carbonato, um ureído ou fosfato, respectivamente de um composto que: 1) não interfere com a atividade biológica do composto mas pode conferir quando das propriedades vantajosas do composto in vivo, como absorção, duração de ação e início de ação; ou 2) é biologicamente inativo mas é convertido in vivo no composto biologicamente ativo. Exemplos de ésteres biohidrolizáveis incluem, mas não estão limitados a, ésteres alquila menores, ésteres alcoxiaciloxi, ésteres acilamino alquila, e ésteres colina. Exemplos de amidas biohidrolizáveis incluem, mas não estão

limitados a, amidas alquilas menores, amidas alfa-aminoácidos, amidas alcoxiacilas, e amidas alquilaminoalquilcarbonilas. Exemplos de carbamatos biohidrolizáveis incluem, mas não estão limitados a, alquilaminas menores, etilenediaminas substituídas, aminoácidos hidroxialquilaminas, aminas heterocíclicas e heteroaromáticas e aminas poliéter.

Como usado aqui, o termo "análogo do mesmo" no contexto de compostos descritos aqui inclui diastêromeros, hidratos, solvatos, pró-drogas e N-óxidos dos compostos.

O "domínio de translocação", "região de ligação do ligante" e composições dos receptores quimeras descritos aqui também incluem "análogos" ou "variantes conservadas" e "miméticos" ("peptidomiméticos") com estruturas e atividade que correspondem substancialmente às sequências exemplares. Assim, os termos "variante conservada" ou "análogo" ou "mimético" referem-se a um polipeptídeo que tem uma sequência de aminoácido modificada, e que tal alteração não altera substancialmente a estrutura (a variante conservada) e/ou atividade do polipeptídeo, como definido aqui. Estes incluem variações modificadas de forma conservada de uma sequência de aminoácido, ou seja, substituições, adições ou deleções de aminoácidos destes resíduos não são críticos para a atividade da proteína ou a substituição do aminoácido com resíduos tem propriedades semelhantes (por exemplo, ácido, básico, carregado positiva ou negativamente, polar ou não polar, etc.) e que estas substituições mesmo de aminoácidos críticos não alteram substancialmente a estrutura e/ou atividade.

Mais particularmente, "variantes modificadas de forma conservada" se aplicam a sequências de aminoácidos e sequências de ácido nucleico. Com relação à sequência particulares de ácidos nucleicos, variantes modificadas de forma conservada referem-se àqueles ácidos nucleicos que codificam sequências de aminoácidos idênticas ou essencialmente idênticas, ou onde o ácido nucleico não

codifica uma sequência de aminoácidos para sequências essencialmente idênticas. Devido à degeneração do código genético, um grande número de ácidos nucleicos funcionalmente idênticos codificam qualquer dada proteína.

5 Por exemplo, os códons GCA, GCC, GCG e GCU todos codificam o aminoácido alanina. Assim, em cada posição onde uma alanina é especificada por um códon, o códon pode ser alterado para qualquer um dos códons correspondentes acima descritos sem alterar o polipeptídeo codificado.

10 Tais variações do ácido nucleico são "variações silenciosas" que são uma espécie de variação modificada de forma conservada. Cada sequência de ácido nucleico aqui que codifica um polipeptídeo também descreve cada possível variação silenciosa do ácido nucleico. Um especialista
15 reconhecerá que cada códon em um ácido nucleico (exceto AUG, que é ordinariamente o único códon para metionina e TGG, que é ordinariamente o único códon para triptofano) pode ser modificado para render uma molécula funcionalmente idêntica. Assim, cada variação silenciosa de um ácido nucleico que
20 codifica um polipeptídeo é implícita em cada sequência descrita.

Tabelas de substituições conservadas fornecendo aminoácidos funcionalmente semelhantes são bem conhecidas na técnica. Por exemplo, uma diretriz exemplar para selecionar
25 substituições conservadas incluem (resíduo original seguido pela substituição exemplar): ala/gli ou ser; arg/lis; asn/gln ou his; asp/glu; cis/ser; gin/asn; gli/asp; gli/ala ou pro; his/asn ou gln; ile/leu ou val; leu/ile ou val; lis/arg ou gln ou glu; met/leu ou tir ou ile; fen/met ou leu ou tir;
30 ser/the; the/ser; tri/tyr; tir/tri ou fen; val/ile ou leu. Uma diretriz exemplar alternativa usa os seguintes seis grupos, cada um contendo aminoácidos que são substituições conservadas para uma outra: 1) Alanina (A), Serina (S), Treonina (T); 2) Ácido Aspártico (D), Ácido glutâmico (E); 3)
35 Asparagina (N), Glutamina (Q); 4) Arginina (R), Lisina (I); 5) Isoleucina (I), Leucina (L), Metionina (M), Valina (V); e

6) Fenilalanina (F), Tirosina (Y), Triptofano (W); (vide também, por exemplo, Creighton, Proteins, W. H. Freeman and Company (1984); Schultz and Schimer, Principles of Protein Structure, Springer-Verlag (1979)). Um especialista na
5 técnica apreciará que as substituições acima identificadas não são as únicas substituições conservadas possíveis. Por exemplo, para alguns propósitos, um pode estar relacionado a todos os aminoácidos carregados como substituições conservadas para cada outro se são positivos ou negativos.
10 Além disso, substituições individuais, deleções ou adições que alteram, adicionam ou apagam um único aminoácido ou um pequeno percentual de aminoácidos em uma sequência codificada podem também ser consideradas "variações modificadas de forma conservada".

15 O termo "mimético" e "peptidomimético" refere-se a um composto químico que tem substancialmente a mesma estrutura e/ou características funcionais dos polipeptídeos, por exemplo, domínios de translocação, regiões de ligação de ligantes ou receptores quimeras da invenção. O mimético
20 pode ser tanto completamente composto de análogos de aminoácidos sintéticos e não naturais quanto uma molécula quimérica de peptídeos aminoácidos parcialmente naturais e análogos de aminoácidos parcialmente não naturais. O mimético pode incorporar qualquer quantidade de substituições
25 conservadas de aminoácidos naturais desde que tais substituições também não alterem substancialmente a estrutura e/ou atividade mimética.

Como com polipeptídeos da invenção que são variantes conservadas, a experimentação de rotina irá determinar se um
30 mimético está dentro do escopo da invenção, ou seja, que sua estrutura e/ou função não estão substancialmente alteradas. As composições de polipeptídeos miméticos podem conter qualquer combinação de componentes estruturais não naturais, que são tipicamente destes três grupos estruturais: a) grupos
35 de resíduo de ligação que não ligações de amida natural ("ligação peptídica"); b) resíduos não naturais no lugar de

resíduos de aminoácidos de ocorrência natural; ou c) resíduos que induzem mimetismo estrutural secundário, ou seja, induzir ou estabilizar uma estrutura secundária, por exemplo, uma rotação beta, uma rotação gama, conformação alfa-hélice e semelhantes. Um polipeptídeo pode ser caracterizado como um mimético quando todos ou alguns de seus resíduos estão ligados por meios químicos além de ligações peptídicas naturais. Resíduos peptidomiméticos individuais podem estar ligados por ligações peptídicas, que não ligações químicas ou meios de acomplamento, como por exemplo, glutaraldeído, ésteres N-hidroxisuccinimida, maleimidas bifuncionais, N,N'-diciclohexilcarbodiimida (DCC) ou N,N'-diisopropilcarbodiimida (DIC). Grupos ligantes podem ser uma alternativa à ligações amidas tradicionais ("ligação peptídica") incluem, por exemplo, cetometileno (por exemplo, --C(=O)--CH₂ for --C(=O)--NH--), aminometileno (CH₂NH), etileno, olefina (CH.dbd.CH), éter (CH₂O), tioéter (CH₂--S), tetrazol (CN₄), tiazol, retroamida, tioamida, ou éster (vide, por exemplo Spatola, Chemistry and Biochemistry of Amino Acids, Peptides and Proteins, Vol. 7, 267-357, Marcell Dekker, Peptide Backbone Modifications, NY (1983)). Um polipeptídeo pode também ser caracterizado como um mimético por conter todos ou alguns resíduos não naturais no lugar de resíduos de aminoácidos de ocorrência natural; resíduos não naturais são bem descritos na literatura científica e de patente.

Um "marcador" ou uma "metade detectável" é uma composição detectável por meios espectroscópicos, fotoquímicos, bioquímicos, imunoquímicos ou químicos. Por exemplo, marcadores úteis incluem ³²P, corantes fluorescentes, reagentes densos de elétrons, enzimas (por exemplo, como comumente usado em um ELISA), biotina, digoxigenina ou haptenos e proteínas que podem se tornar detectáveis, por exemplo, pela incorporação de um radiomarcador no peptídeo ou usado para detectar anticorpos especificamente reativos com o peptídeo.

Uma "sonda de ácido nucleico ou oligonucleotídeo marcado" é o(a) que está ligado, seja covalentemente, através de um ligante ou uma ligação química, ou ligações não covalentes, iônicas, de van der Waals, eletrostáticas ou de hidrogênio a um marcador para que a presença da sonda possa ser detectada pela detecção da presença do marcador ligado à sonda.

Como usado aqui "sonda de ácido nucleico ou oligonucleotídeo" é definida como um ácido nucleico capaz de se ligar a um ácido nucleico alvo de sequência complementar através de um ou mais tipos de ligações químicas, geralmente através do pareamento de bases complementares, geralmente através da formação de ligações de hidrogênio. Como usado aqui, uma sonda pode incluir bases naturais (ou seja, A, G, C ou T) ou modificadas (7-deazaguanosina, inosina, etc.). Além disso, as bases em uma sonda podem ser juntadas por um ligante que não a ligação fosfodiéster, desde que não interfira com a hibridização. Assim, por exemplo, sondas podem ser ácidos nucleicos peptídicos em que as bases constituintes são juntadas por ligações peptídicas que não as ligações fosfodiésteres. Será entendido por um especialista na técnica que sondas podem ligar sequências alvo faltando complementariedade completa com a sequência da sonda dependendo do rigor das condições de hibridização. As sondas são opcionalmente diretamente marcadas como com isótopos, cromóforos, luminóforos, cromógenos ou marcadas indiretamente como com biotina para a qual um complexo de estreptavidina pode posteriormente se ligar. Ao analisar para a presença ou ausência da sonda, uma pode detectar a presença ou ausência da sequência ou subsequência selecionada.

O termo "heterólogo" quando usado com relação a porções de um ácido nucleico indica que o ácido nucleico compreende duas ou mais sequências que não são encontradas na mesma relação para a outra na natureza. Por exemplo, o ácido nucleico é tipicamente produzido por recombinação, tendo duas

ou mais sequências de genes não relacionados organizados para produzir um novo ácido nucleico funcional, por exemplo, um promotor de uma origem e uma região codificante de outra origem. Da mesma forma, uma proteína heteróloga indica que

5 a proteína compreende duas ou mais subsequências que não são encontradas na mesma relação uma à outra na natureza (por exemplo, uma proteína fundida).

Um "promotor" é definido como um ordenador de sequências de ácido nucleico para a transcrição direta de um ácido

10 nucleico. Como usado aqui, um promotor inclui necessariamente sequências de ácido nucleico próximas ao início do local de transcrição como no caso de um promotor de polimerase tipo II, um elemento TATA. Um promotor também inclui opcionalmente estimuladores distantes ou elementos

15 repressores, que podem ser colocados até vários milhares de pares de base do início do local de transcrição. Um promotor "constitutivo" é um promotor que está ativo sob a maioria das condições ambientais e de desenvolvimento. Um promotor "induzível" é um promotor que está ativo sob

20 regulações ambientais e de desenvolvimento. O termo "operacionalmente ligado" refere-se a uma ligação funcional entre uma sequência de controle de expressão de ácido nucleico (como um promotor, ou ordenador de locais de ligação de fator de transcrição) e uma segunda sequência de ácido

25 nucleico, onde a sequência de controle de expressão direciona a transcrição do ácido nucleico correspondente à segunda sequência.

Como usado aqui, "recombinante" refere-se a um polinucleotídeo sintetizado ou de outra forma manipulado in

30 vitro (por exemplo, "polinucleotídeo recombinante"), a métodos de usar os polinucleotídeos recombinantes para produzir produtos de genes em células ou outros sistemas biológicos, ou a um polipeptídeo ("proteína recombinante") codificado por um polinucleotídeo recombinante. "Meios

35 recombinantes" englobam também a ligação de ácidos nucleicos contendo várias regiões codificantes ou domínios ou

sequências de promotores de diferentes origens em um cassete de expressão ou vetor para expressão de, por exemplo, expressão induzível ou constitutiva de uma proteína fundida compreendendo um domínio de translocação da invenção e uma
5 sequência de ácido nucleico amplificada usando um primer da invenção.

A frase "hibridiza seletivamente (ou especificamente) para" refere-se à ligação, duplexação ou hibridização de uma molécula somente para uma sequência de nucleotídeo particular
10 sob condições estritas de hibridização quando esta sequência está presente em uma mistura complexa (por exemplo, DNA ou RNA celular total ou biblioteca).

A frase "condições estritas de hibridização" refere-se à condições sob as quais uma sonda hibridizará para sua
15 subsequência alvo, tipicamente em uma mistura complexa de ácido nucleico, mas nenhuma outra sequência. Condições estritas são sequências dependentes e serão diferentes em diferentes circunstâncias. Sequências maiores hibridizam especificamente em temperaturas mais altas. Um guia
20 extensivo para a hibridização de ácidos nucleicos é encontrado em Tijssen, Techniques in Biochemistry and Molecular Biology--Hybridization with Nucleic Probes, "Overview of principles of hybridization and the strategy of nucleic acid assays" (1993). Geralmente, condições estritas
25 são selecionadas como cerca de 5-10°C menores do que o ponto de fusão termal (T_m) para a sequência específica em um pH de força iônica definido. T_m é a temperatura (sob força iônica, pH e concentração nucléica definidos) no qual 50% das sondas se complementam à hibridização alvo para a sequência alvo no
30 equilíbrio (como as sequências alvo estão presentes em excesso, na T_m , 50% das sondas estão ocupadas no equilíbrio). Condições estritas serão aquelas onde a concentração do sal é menor do que cerca de 1,0 M de íon de sódio, tipicamente cerca de 0,01 a 1,0 M de concentração de íon de sódio (ou
35 outros sais) em pH 7,0 a 8,3 e a temperatura é pelo menos cerca de 30°C para sondas pequenas (por exemplo, 10 a 50

nucleotídeos) e pelo menos 60°C para sondas grandes (por exemplo, maiores do que 50 nucleotídeos). Condições estritas podem também ser atingidas com a adição de agentes desestabilizantes como formamida. Para hibridização

5 seletiva ou específica, um sinal positivo é pelo menos duas vezes o antecedente, opcionalmente 10 vezes a hibridização antecedente. Condições estritas de hibridização exemplares podem ser as seguintes: 50% de formamida, 5xSSC, e 1% SDS, encubado a 42°C, ou 5xSSC, 1% SDS, incubando a 65°C, com
10 lavagem em 0,2xSSC, e 0,1% SDS a 65°C. Tais etapas de hibridização e lavagem podem ser conduzidas por, por exemplo, 1, 2, 5, 10, 15, 30, 60; ou mais minutos.

Ácidos nucleicos que não hibridizam um com o outro sob condições estritas são ainda substancialmente relacionados se
15 os polipeptídeos que eles codificam estão substancialmente relacionados. Isso ocorre, por exemplo, quando uma cópia de um ácido nucleico é criada usando um códon de degeneração máximo permitido pelo código genético. Em tais casos, os ácidos nucleicos tipicamente hibridizam sob condições de
20 hibridização moderadamente estritas. Exemplos de "condições de hibridização moderadamente estritas" incluem uma hibridização em um tampão de 40% de formamida, 1 M de NaCl, 1% de SDS a 37°C e uma lavagem em 1xSSC a 45°C. Tais etapas de hibridização e lavagem podem ser conduzidas por, por
25 exemplo, 1, 2, 5, 10, 15, 30, 60, ou mais minutos. Uma hibridização positiva é pelo menos duas vezes a antecedente. Os especialistas na técnica prontamente reconhecerão que condições de hibridização e lavagens alternativas podem ser utilizadas para fornecer condições de rigidez semelhantes.

30 "Anticorpo" refere-se a um polipeptídeo que compreende uma região estrutural de um gene de imunoglobulina ou fragmentos do mesmo que se ligam especificamente e reconhecem um antígeno. Os genes de imunoglobulina reconhecidos incluem as regiões constantes de gene kapa, lambda, alfa, gama,
35 delta, épsilon e mu, bem como as regiões variáveis de genes de imunoglobulina miríade. Cadeias leves são classificadas

como kapa ou lambda. Cadeias pesadas são classificadas como gama, um, alfa, delta ou épsilon, que por sua vez definem as classes de imunoglobulinas IgG, IgM, IgA, IgD e IgE, respectivamente.

5 Um exemplo de unidade estrutural de imunoglobulina (anticorpo) compreende um tetrâmero. Cada tetrâmero é composto de dois pares idênticos de cadeias polipeptídicas, cada par tendo uma cadeia "leve" (cerca de 25 kDa) e uma "pesada" (cerca de 50-70 kDa). O N-terminal de cada cadeia
10 define uma região variável de cerca de 100 a 110 ou mais aminoácidos primariamente responsáveis pelo reconhecimento do antígeno. Os termos cadeia leve variável (V_L) e cadeia pesada variável (V_H) referem-se a estas cadeias leves e pesadas, respectivamente.

15 Um "anticorpo quimera" é uma molécula de anticorpo na qual (a) a região constante, ou uma parte desta, é alterada, substituída ou trocada para que o local de ligação do antígeno (região variável) seja ligada à uma região constante de uma classe, função efetora e/ou espécie diferente ou
20 alterada, ou uma molécula totalmente diferente que confere novas propriedades ao anticorpo quimera, por exemplo, uma enzima, toxina, fator de crescimento, droga, etc.; (b) a região variável, ou uma parte desta, é alterada, substituída ou trocada com uma região variável contendo uma
25 especificidade de antígeno diferente ou alterada.

Um anticorpo "anti-T2R" é um anticorpo ou fragmento de anticorpo que se liga especificamente ao polipeptídeo codificado por um gene T2R, cDNA ou subsequência do mesmo.

O termo "imunoensaio" é um ensaio que usa um anticorpo
30 para ligar especificamente a um antígeno. O imunoensaio é caracterizado pelo uso de propriedades específicas de ligação de um anticorpo particular para isolar, marcar e/ou quantificar o antígeno.

A frase "se liga especificamente (ou seletivamente)" a
35 um anticorpo ou, "imunorreativo especificamente (ou seletivamente) com" quando referindo a uma proteína ou

peptídeo, refere-se a uma reação de ligante que determina a presença da proteína em uma população heteróloga de proteínas e outros componentes biológicos. Assim, sob condições de imunoensaio designadas, os anticorpos especificados se ligam a uma proteína particular pelo menos duas vezes o antecedente e não se ligam substancialmente em uma quantidade significativa a outras proteínas presentes na amostra. A ligação específica a um anticorpo sob tais condições pode requerer um anticorpo que é selecionado para esta especificidade para uma proteína particular.

Por exemplo, anticorpos policlonais construídos para um membro da família T2R de espécie específica como rato, camundongo, ou humanos podem ser selecionados para obter somente aqueles anticorpos monoclonais que são especificamente imunorreativos com os polipeptídeos T2R ou uma porção imunogênica dos mesmos e não com outras proteínas, exceto para variantes ortólogas ou polimórficas e alelos do polipeptídeo T2R. Esta seleção pode ser alcançada ao subtrair anticorpos que faça reação cruzada com moléculas T2R de outras espécies ou outras moléculas T2R. Anticorpos podem também ser selecionados que reconheçam somente membros da família T2R GPCR mas não GPCRs de outras famílias. Uma variedade de formatos de imunoensaios podem ser usados para selecionar anticorpos especificamente imunorreativos com uma proteína particular. Por exemplo, imunoensaios de ELISA em fase sólida são rotineiramente usados para selecionar anticorpos especificamente imunorreativos com uma proteína (vide, por exemplo, Harlow & Lane, Antibodies, A Laboratory Manual, (1988), para uma descrição de formatos de imunoensaios e condições que podem ser usadas para determinar a imunorreatividade específica). Tipicamente uma reação específica ou seletiva será pelo menos duas vezes o sinal ou ruído antecedente e mais tipicamente mais do que 10 a 100 vezes o antecedente.

A frase "se associa seletivamente com" refere-se à capacidade de um ácido nucleico em "hibridizar seletivamente"

com outro como definido acima, ou a capacidade de um anticorpo de "se ligar seletivamente (ou especificamente) a uma proteína, como definido acima.

O termo "vetor de expressão" refere-se a qualquer sistema de expressão de recombinante para o propósito de expressar uma sequência de ácido nucleico da invenção in vitro ou in vivo, de forma constitutiva ou induzível, incluindo célula procarióticas, de levedura, de fungos, de plantas, insetos ou mamíferos. O termo inclui sistemas de expressão linear ou circular. O termo inclui sistemas de expressão que permanecem episomais ou integrado no genoma da célula hospedeira. Os sistemas de expressão podem ter a capacidade de se auto-replicar, ou seja, direcionar somente expressão temporária em uma célula. O termo inclui expressão recombinante "cassetes" que contêm somente os elementos mínimos necessários para a transcrição do ácido nucleico recombinante.

Por "células hospedeiras" define-se como uma célula que contém um vetor de expressão e suporta a replicação ou expressão do vetor de expressão. Células hospedeiras podem ser células procarióticas como a E. coli, ou células eucarióticas como leveduras, insetos, anfíbios ou células de mamíferos como CHO, HeLa, HEK-293 e semelhantes, células cultivadas, explantes e células in vivo.

Com base no precedente, a presente invenção fornece ensaios para identificar compostos que modulam, preferencialmente bloqueiam, a ativação específica do receptor de sabor amargo humano previamente identificado por compostos, por exemplo, compostos presentes no café e extratos derivados do mesmo e estruturalmente relacionados e outros compostos amargos. Particularmente, a invenção fornece ensaios baseados em células para a identificação de compostos que modulam (por exemplo, bloqueiam) a ativação de hT2R8 e Ht2R14. Estes compostos irão modular o sabor amargo associado com estes receptores de sabor em sujeitos humanos. Isso será confirmado por testes de degustação.

Ainda, a invenção identifica e fornece um antagonista com ampla faixa de propriedades antagonistas que podem ser usados em alimentos, bebidas, medicamentos e outros materiais para ingestão humana ou animal contendo compostos amargos conhecidos ou não onde o sabor amargo é desejavelmente minimizado ou eliminado.

Que os receptores de sabor acima respondem especificamente a compostos amargos presentes no café e a compostos amargos específicos que interagem com um, múltiplos ou desconhecidos receptores de sabor amargo foram determinados essencialmente usando o sistema de expressão HEK293 e métodos de imagem por cálcio relatados em outras publicações bem como pedidos de patentes protocolados pelo presente Cessionário, por exemplo, U.S. No. de Série 10/191.058 e 09/825.882, ambos incorporados aqui para referência em suas totalidades. Mais particularmente, os presentes inventores transfectaram células HEK293 em um hT2R particular marcado com um aminoácido marcado com rodopsina (SEC ID NO:1) junto com uma proteína G quimérica (G16gust44) que compreende a sequência de proteína G $G_{\alpha 16}$ modificada pela substituição de resíduos de 44 aminoácidos carboxi com aqueles de gustducina e registraram as respostas destas células a ligantes específicos por métodos de imagem de cálcio.

Especificamente, os inventores usaram ensaio baseado em células de mamíferos para monitorar atividades de hT2R. Para ensaios de imagem de cálcio, as células foram semeadas em placas de cultura de tecido de 48 poços. 24 horas depois as células foram temporariamente transfectadas com um plasmídeo de expressão (pEAK10) contendo uma sequência de ácido nucleico hT2R e um plasmídeo (pEAK10) contendo uma proteína G quimérica (G16gust44). Outras 24 horas depois, as células foram incubadas com um corante fluorescente específico para cálcio (Fluo-4; Molecular Probes). As células carregadas são expostas a diferentes moléculas amargas e a ativação de um hT2R leva à ativação de G 16gust44, que por sua vez leva à

mobilização de cálcio para dentro das células. O aumento da concentração de cálcio muda as propriedades de fluorescência do corante de cálcio dentro das células. Estas alterações são monitoradas por microscópio de fluorescência.

5 Os inventores também usaram sistema de indicação fluorimétrica automatizado FLIPR usando um protocolo ligeiramente diferente. Uma linhagem de célula HEK293 expressando estavelmente G16gust44 foi transfectada com um plasmídeo de expressão, 24 horas depois as células são
10 carregadas e analisadas em FLIPR.

Após um ligante ser identificado para um hT2R particular, a linhagem de célula HEK293 expressando com estabilidade tanto hT2R quanto G16gust44 é gerada, facilitando ensaios de triagem futuros para identificar
15 outros ligantes que ativam o hT2R particular ou que modula (bloqueia ou aumenta) a ativação deste hT2R por outro ligante amargo como um composto amargo contido no café. Isso evita a necessidade de outra transfecção temporária.

Como mostrado nas figuras, tais experimentos revelaram
20 que hT2R8 e hT2R14 respondem a compostos amargos presentes no café e identificam compostos que inibem ou bloqueiam o sabor amargo do café. Ainda, os experimentos na Figura 5 e Exemplo 3 abaixo revelam as amplas propriedades antagonistas do Composto C em particular.

25 Estes resultados indicam que as células que identificaram os receptores de sabor hT2R podem ser usadas em ensaios para identificar ligantes que modulam o sabor amargo associado com pelo menos um dito hT2R particular, bem como ensaios par detectar compostos responsáveis pelo sabor
30 amargo.

Preferencialmente, estes ensaios utilizarão uma célula de teste que expressa um DNA que codifica um hT2R contendo uma das sequências de aminoácidos identificadas abaixo. No
35 entanto, é previsto que os fragmentos, ortólogos, variantes ou quimeras destes polipeptídeos receptores que retêm as propriedades funcionais destes receptores de sabor amargo, ou

seja, respondem a alguns compostos amargos, também serão úteis nestes ensaios. Exemplos de tais variantes incluem variantes unidas, polimorfismo de nucleotídeo único, variantes alélicas e mutações produzidas por meios recombinais ou químicos ou de ocorrência natural. Meios para isolamento e expressão de T2Rs, que são usados nos ensaios da presente invenção e ensaios que estão contemplados para uso na presente invenção para identificar compostos que inibem a ativação destes receptores são estabelecidos abaixo.

Isolamento e Expressão de T2Rs

O isolamento e expressão de T2Rs, ou fragmentos ou variantes dos mesmos, da invenção podem ser efetuados por procedimentos de clonagem bem estabelecidos usando sondas ou primers construídos com base nas sequências dos ácidos nucleicos descritos na aplicação. Sequências de T2R relacionadas podem também ser identificadas a partir de bancos de dados genômicos da espécie humana ou de outras espécies usando as sequências descritas aqui e tecnologias conhecidas com base em computador, por exemplo, busca de sequência BLAST. Em uma modalidade particular, os pseudogenes descritos aqui podem ser usados para identificar alelos funcionais ou genes relacionados.

Vetores de expressão podem então ser usados para infectar ou transfectar células hospedeiras para a expressão funcional destas sequências. Estes genes e vetores podem ser produzidos e expressos in vitro ou in vivo. Um especialista reconhecerá que os fenótipos desejados para alterar e controlar a expressão de ácido nucleico podem ser obtidos ao modular a expressão ou atividade dos genes e ácidos nucleicos (por exemplo, promotores, estimuladores e semelhantes) dentro dos vetores da invenção. Quaisquer um dos métodos descritos para aumentar ou diminuir a expressão ou atividade podem ser usados. A invenção pode ser praticada em conjunto com qualquer método ou protocolo conhecido na técnica, que são bem descritos na literatura científica e de patente.

De forma alternativa, estes ácidos nucleicos podem ser sintetizados in vitro, por técnicas químicas bem conhecidas como descritas em, por exemplo, 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); Patente U.S. Pat. No. 4.458.066. Fragmentos de DNA de dupla fita podem em seguida ser obtidos ou por síntese da fita complementar ou por hibridizar as fitas juntas sob condições apropriadas ou pela adição da fita complementar usando DNA polimerase com uma sequência de primer apropriada.

Técnicas para a manipulação de ácidos nucleicos, como por exemplo, para geração de mutações em sequências, subclonagem, sondas marcadas, sequenciamento, hibridização e semelhantes são bem descritas na literatura científica e de patente. Vide, por exemplo, Sambrook, ed., Molecular Cloning: A Laboratory Manual (2nd ed.), Vols. 1-3, Cold Spring Harbor Laboratory (1989); Ausubel, ed., Current Protocols in Molecular Biology, John Wiley & Sons, Inc., New York (1997); Tijssen, ed., Laboratory Techniques in Biochemistry and Molecular Biology: Hybridization With Nucleic Acid Probes, Part I, Theory and Nucleic Acid Preparation, Elsevier, N.Y. (1993).

Ácidos nucleicos, vetores, capsídeos, polipeptídeos e semelhantes podem ser analisados e quantificados por qualquer um de um número de meios gerais bem conhecidos pelos especialistas na técnica. Estes incluem, por exemplo, métodos de bioquímica analítica como, NMR, espectrofotometria, radiografia, eletroforese, eletroforese capilar, cromatografia líquida de alta performance (HPLC), cromatografia de camada delgada (TLC), e cromatografia de hiperdifusão, vários métodos imunológicos, por exemplo, reações de precipitina gel ou fluido, imunodifusão,

imunoeletroforese, radioimunoensaios (RIAs), ensaios de imunoabsorvência ligada (ELISAs), ensaios de imunofluorescência, análise de Southern, Northern e dot blot, eletroforese em gel (por exemplo, SDS-PAGE), RT-PCR, PCR quantitativo, outros métodos de amplificação sinal ou outro ácido nucleico ou marcado, radiomarcção, contagem por cintilação e cromatografia de afinidade.

Primers de oligonucleotídeos podem ser usados para amplificar ácidos nucleicos que codificam uma região de ligação do ligante T2R. Os ácidos nucleicos descritos aqui também podem ser clonados ou medidos quantitativamente usando técnicas de amplificação. Os métodos de amplificação são bem conhecidos na técnica e incluem, por exemplo, reação de cadeia de polimerase (PCR) (Innis ed., PCR Protocols, a Guide to Methods and Applications, Academic Press, N.Y. (1990); Innis ed., PCR Strategies, Academic Press, Inc., N.Y. (1995)); reação de cadeia de ligase (LCR) (Wu, Genomics, 4:560 (1989); Landegren, Science, 241:1077 (1988); Barringer, Gene, 89:117 (1990)); amplificação de transcrição (Kwoh, PNAS, 86:1173 (1989)); replicação de sequência auto-sustentada (Guatelli, PNAS, 87:1874 (1990)); amplificação de replicase Q Beta (Smith, J. Clin. Microbiol., 35:1477-91 (1997)); ensaio de amplificação de Q-beta automatizado (Burg, Mol. Cell. Probes, 10:257-71 (1996)); e outras técnicas mediadas por RNA polimerase (e.g., NASBA, Cangene, Mississauga, Ontario). See also, Berger, Methods Enzymol., 152:307-16 (1987); Sambrook; Ausubel; Patente U.S. Nos. 4.683.195 e 4.683.202; Sooknanan, Biotechnology, 13:563-64 (1995).

Uma vez amplificados, os ácidos nucleicos, quer individualmente quer como bibliotecas, podem ser clonados de acordo com métodos conhecidos na técnica, em qualquer variedade de vetores usando métodos de biologia molecular de rotina; métodos para clonagem in vitro ácidos nucleicos amplificados são descritor em, por exemplo, Patente U.S. 5.426.039. Para facilitar a clonagem de sequências

amplificadas, locais de enzima de restrição podem ser "construídos" no par de primer PCR. Por exemplo, os locais Pst I e Bsp EI foram projetados dentro dos pares de primers exemplares da invenção. Estes locais de restrição
5 particulares têm uma sequência que, quando ligada, estão "in-frame" com relação ao "doador" receptor de membrana que codifica a sequência dentro do qual são unidos (a região de ligação do ligante que codifica a sequência é interna ao polipetídeo 7-membranar, assim, se for desejado que o
10 construído seja traduzido a jusante de um local de junção de enzima de restrição, resultados fora do quadro devem ser evitados; isto pode não ser necessário se a região de ligação do ligante inserida compreende substancialmente a maior parte da região VII transmembranar. Os primers podem ser
15 projetados para reter a sequência original do receptor 7-membranar "doador". De forma alternativa, os primers podem codificar resíduos de aminoácidos que são substituições conservadas (por exemplo, hidrofóbico para resíduo hidrofóbico, vide abaixo discussão) ou substituições
20 funcionalmente benignas (por exemplo, não previnem inserção de membrana plasmática, causam clivagem por peptidase, causam dobra anormal do receptor e semelhantes).

Os pares de primers podem ser projetados para amplificar seletivamente as regiões de ligação do ligante de proteínas
25 T2R. Estas regiões de ligações podem variar para diferentes ligantes; assim, o que pode ser uma região de ligação mínima para um ligante, pode ser muito limitante para um segundo ligante potencial. Dessa forma, as regiões ligantes de diferentes tamanhos compreendem diferentes estruturas de
30 domínios podem ser amplificadas; por exemplo, domínios transmembranares (TM) II até VII, III até VI ou II até VI ou variações dos mesmos (por exemplo, somente uma subsequência de um domínio particular, misturando a ordem dos domínios e semelhantes) de um T2R 7-membranar.

35 Como estruturas de domínios e sequência de proteínas T2r 7-membranares são conhecidas, os especialistas na técnica

podem prontamente selecionar sequências de domínio flanqueado e domínio interno como sequências modelos para projetar pares de primers de amplificação de degeneração. Por exemplo, uma sequência de ácido nucleico que codifica regiões de domínio

5 II até VII podem ser geradas por amplificação de PCR usando um par de primer. Para amplificar um ácido nucleico que compreende uma sequência de domínio transmembranar I (TM I), um primer de degeneração pode ser projetado a partir de um ácido nucleico que codifica uma sequência de aminoácido da

10 família T2R sequência de consenso 1 descrito acima. Tal primer de degeneração pode ser usado para gerar uma região de ligação incorporando TMI até TM III, TM I até TM IV, TM I até TM V, TM I até TM VI ou TM I até TM VII). Outros primers de degeneração podem ser projetados com base em outra sequência

15 de consenso da família T2R fornecido aqui. Tal primer de degeneração pode ser usado para gerar uma região de ligação incorporando TMIII até TM IV, TM III até TM V, TM III até TM VI ou TM III até TM VII.

Os paradigmas para projetar pares de primers de

20 degeneração são bem conhecidos na técnica. Por exemplo, um programa de computador de estratégia CONsensus-DEgenerate Hybrid Oligonucleotide Primer (CODEHOP) está acessível em <http://blocks.fhcrc.org/codehop.html>, e é diretamente ligado a partir do local do alinhamento de sequência múltipla

25 BlockMacher com um conjunto de sequências de proteínas relacionadas, como regiões conhecidas de ligação de ligante de receptor de sabor (vide, por exemplo, Rose, Nucleic Acids Res., 26:1628-35 (1998); Singh, Biotechniques, 24:318-19 (1998)).

30 Meios para sintetizar pares de primers de oligonucleotídes são bem conhecidos na técnica. Pares de base "naturais" ou bases de pares sintéticos podem ser usados. Por exemplo, o uso de nucleobases artificiais oferece uma abordagem versátil para manipular uma sequência de primer e

35 gerar uma mistura mais complexa de produtos de amplificação. Várias famílias de nucleobases artificiais são capazes de

assumir ligações de hidrogênio de múltiplas orientações através de rotações de ligações internas para fornecer um meio para reconhecimento de degeneração molecular. A incorporação destes análogos em uma posição única de um primer de PCR permite a geração de uma biblioteca complexa de produtos de amplificação. Vide, por exemplo, Hoops, *Nucleic Acids Res.*, 25:4866-71 (1997). Moléculas não polares também podem ser usadas para imitar o formato de bases de DNA naturais. Uma imitação do formato de ligação de não hidrogênio para adenina pode replicar de forma eficiente e seletiva contra uma imitação de formato não polar para timina (vide, por exemplo, Morales, *Nat. Struct. Biol.*, 5: 950-54 (1998)). Por exemplo, duas bases degeneradas podem ser a base pirimidina 6H,8H-3,4-dihidropirimido[4,5-c][1,2]oxazin-7-um ou a base purina N6-metoxi-2,6-diaminopurina (vide, por exemplo, Hill, *PNAS*, 95:4258-63 (1998)). Primers de degeneração exemplares da invenção incorporam o análogo de nucleobase 5'-Dimetoxitritil-N-benzoil-2'-deoxi-Citidina,3'-[(2-cianoetil)--(N,N-diisopropil)]-fosforamidita (o termo "P" nas sequências, vide acima). Esta ligação de hidrogênio análogo de pirimidina com purinas, inclui resíduos A e G.

Variantes polimórficos, alelos e homólogos inter espécies que são substancialmente idênticas para um receptor de sabor descritos aqui podem ser isolados usando as sondas de ácidos nucleicos descritas aqui. De forma alternativa, bibliotecas de expressão podem ser usadas para clonar polipeptídeos de T2R e variantes polimórficas, alelos e homólogos inter espécies dos mesmos, ao detectar homólogos expressos imunologicamente com antissoro ou anticorpos purificados feitos contra um polipeptídeo T2R, que também reconhece e se liga seletivamente ao homólogo T2R.

Ácidos nucleicos que codificam regiões de ligações de ligantes de receptores de sabor podem ser gerados pela amplificação (por exemplo, PCR) de sequências apropriadas de ácidos nucleicos usando pares de primers apropriados (perfeito ou degenerado). O ácido nucleico amplificado pode

ser DNA genômico de qualquer célula ou tecido ou mRNA ou cDNA derivado de células que expressam receptores de células.

Em uma modalidade, sequências que codificam proteínas híbridas compreendendo ácidos nucleicos que codificam T2Rs fundidos para uma sequência de translocação podem ser construídas. Também fornecidos são T2Rs híbridos compreendendo os motivos de translocação e regiões de ligação de compostos produtores de sabor de outras famílias de receptores quimiosensores, particularmente receptores de sabor. Estas sequências de ácidos nucleicos podem ser ligadas operacionalmente para elementos de controle de transcrição ou tradução, por exemplo, sequências de início de transcrição e tradução, promotores e indutores, estimuladores, terminadores de transcrição e tradução, sequências de poliadenilação e outras sequências úteis para transcrição do DNA em RNA. Na construção de cassetes de expressão recombinantes, vetores e transgênicos, um fragmento promotor pode ser empregado para direcionar a expressão do ácido nucleico desejado em todas as células ou tecidos.

Em outra modalidade, proteínas fundidas podem incluir sequências de translocação C-terminal ou N-terminal. Além disso, proteínas de fusão pode compreender elementos adicionais, por exemplo, detecção, purificação e outras aplicações de proteínas. Detecção e purificação que facilitam domínios incluem, por exemplo, peptídeos que quelam metais como tratos de polihistidina, módulos de histidina-triptofano ou outros domínios que permitem a purificação em metais imobilizados, proteína ligadora de maltose, domínios de proteína A que permitem a purificação de imunoglobulina imobilizada; ou o domínio utilizado no sistema de extensão/purificação de afinidade FLAGS (Immunex Corp, Seattle Wash).

A inclusão de uma sequência de ligante clivável como Fator Xa (vide, por exemplo, Ottavi, Biochimie, 80:289-93 (1998)), motivo de reconhecimento de protease subtilisin (vide, por exemplo, Polyak, Protein Eng., 10:615-19 (1997));

enteroquinase (Invitrogen, San Diego, Calif.), e semelhantes, entre os domínios de translocação (para expressão eficiente em membrana plasmática) e o restante dos polipeptídeos recentemente traduzidos podem ser úteis para facilitar a
5 purificação. Por exemplo, um construído pode incluir um polipeptídeo que codifica uma sequência de ácido nucleico ligada a seis resíduos de histidina seguidos por uma tioredoxina, um sítio de clivagem de enteroquinase (vide, por exemplo, Williams, Biochemistry, 34:1787-97 (1995)), e um
10 domínio de translocação C-terminal. Os resíduos de histidina facilitam a detecção e purificação enquanto que o sítio de clivagem da enteroquinase fornece um meio para purificação da proteína desejada a partir do restante da proteína fundida. Tecnologia referente a vetores que codificam proteínas
15 fundidas e aplicação de proteínas fundidas são bem descritas na literatura científica e de patente (vide, por exemplo, Kroll, DNA Cell. Biol., 12: 441-53 (1993)).

Vetores de expressão, seja como vetores de expressão individuais ou como bibliotecas de vetores de expressão,
20 compreendendo a região de ligação do ligante que codifica sequências podem ser introduzidos em um genoma ou no citoplasma ou um núcleo de uma célula e expresso por uma variedade de técnicas convencionais, bem descritas na literatura científica e de patente. Vide, por exemplo,
25 Roberts, Nature, 328:731 (1987); Berger supra; Schneider, Protein Exper. Purif., 6435: 10 (1995); Sambrook; Tijssen; Ausubel. Informações do produto de fabricantes de reagentes biológicos e equipamentos experimentais também fornecem informações sobre métodos biológicos conhecidos. Os vetores
30 podem ser isolados a partir de origens naturais, obtidas de tais origens como ATCC ou bibliotecas GenBank ou preparado por métodos sintéticos ou recombinantes.

Os ácidos nucleicos podem ser expressos em cassetes de expressão, vetores ou vírus que são estavelmente ou
35 temporariamente expressos em células (por exemplo, sistemas de expressão episomal). Marcadores de seleção podem ser

incorporados nos cassetes e vetores de expressão para conferir um fenótipo selecionável nas células e sequências transformáveis. Por exemplo, marcadores de seleção podem codificar manutenção e replicação episomal para que a
5 integração no genoma hospedeiro não seja necessária. Por exemplo, o marcador pode codificar resistência a antibiótico (por exemplo, cloranfenicol, canamicina, G418, bleomicina, higromicina) ou resistência a herbicida (por exemplo, clorosulfona ou Basta) para permitir a seleção daquelas
10 células transformadas com as sequências de DNA desejadas (vide, por exemplo, e.g., Blondelet-Rouault, Gene, 190:315-17 (1997); Aubrecht, J. Pharmacol. Exp. Ther., 281: 992-97 (1997)). Devido a genes marcadores selecionáveis conferirem resistência a substratos tipo neomicina ou higromicina
15 poderem somente ser utilizados em tecido cultivado, os genes quimiorresistentes também podem ser usados como marcadores selecionáveis in vitro e in vivo.

Uma sequência de ácido nucleico quimera pode codificar uma região de ligação de ligante dentro de um polipeptídeo 7-
20 membranar. Devido à polipeptídeos receptores de 7-transmembranar terem sequências primárias e secundárias e terciárias semelhantes, domínios estruturais (por exemplo, domínio extracelular, domínios TM, domínios citoplasmáticos, etc.) podem ser prontamente identificados por análise de
25 sequência. Por exemplo, modelagem de homologia, análise de Fourier e detecção de periodicidade de hélice podem identificar e caracterizar os sete domínios de uma sequência de receptor 7-transmembranar. Algoritmos de Transformada de Fourier (FFT) podem ser usados para avaliar os períodos
30 dominantes que caracterizam perfis de hidrofobicidade e variabilidade de sequências analisadas. O aprimoramento na detecção de periodicidade e índice de periodicidade de alfa hélice podem ser feitos como, por exemplo, Donnelly, Protein Sci., 2:55-70 (1993). Outros algoritmos de alinhamento e
35 modelagem são bem conhecidos na técnica (vide, por exemplo, Peitsch, Receptors Channels, 4:161-64 (1996); Kyte &

Doolittle, J. Md. Biol., 157: 105-32 (1982); and Cronet, Protein Eng., 6: 59-64 (1993).

A presente invenção também inclui não somente as moléculas e polipeptídeos de ácidos nucleicos contendo as
5 sequências nucleicas e aminoácidos especificados, mas também fragmentos dos mesmos, particularmente fragmentos de, por exemplo, 40, 60, 80, 100, 150, 200, ou 250 nucleotídeos, ou mais, bem como fragmentos de polipeptídeos de, por exemplo, 10, 20, 30, 50, 70, 100, ou 150 aminoácidos, ou mais.
10 Opcionalmente, os fragmentos de ácidos nucleicos podem codificar um polipeptídeo antigênico que é capaz de ligar a um anticorpo produzido contra um membro da família de T2R. Além disso, um fragmento de proteína da invenção pode opcionalmente ser um fragmento antigênico que é capaz de
15 ligar a um anticorpo produzido contra um membro da família de T2R.

Também contempladas estão as proteínas quimeras, compreendendo pelo menos 10, 20, 30, 50, 70 100 ou 150 aminoácidos ou mais, de um de pelo menos um dos polipeptídeos
20 T2R descritos aqui, acoplados a aminoácidos adicionais representando todo ou parte de outro GPCR, preferencialmente um membro da superfamília 7-transmembranar. Estes quimeras podem ser feitas de receptores instantâneos e outros GPCR ou podem ser feitos pela combinação de dois ou mais dos
25 receptores presentes. Em uma modalidade, uma parte da quimera corresponde a, ou é derivada do domínio transmembranar de um polipeptídeo T2R da invenção. Em outra modalidade, uma parte da quimera corresponde a, ou é derivada de uma ou mais das regiões transmembranares de um
30 polipeptídeo T2R descritos aqui e a parte remanescente ou partes podem vir de outro GPCR. Receptores quimeras são bem conhecidos na técnica e as técnicas para criá-las e a seleção e limites de domínios ou fragmentos de Receptores Acoplados a Proteína G para incorporação aqui também são bem conhecidos.
35 Assim, este conhecimento dos especialistas na técnica pode rapidamente ser usado para criar receptores quimeras. O uso

de tais receptores quimeras pode fornecer, por exemplo, uma característica de seletividade de sabor de um dos receptores especificamente descritos aqui, acoplados com características de transdução de sinal de outro receptor, como um receptor bem conhecido usado em sistemas de ensaio da técnica anterior.

Por exemplo, uma região como a região de ligação do ligante, um domínio extracelular, um domínio transmembranar, um domínio transmembranar, um domínio citoplasmático, um domínio C-terminal ou qualquer combinação dos mesmos, podem ser covalentemente ligados a uma proteína heteróloga. Por exemplo, uma região de T2R transmembranar pode estar ligada a um domínio transmembranar GPCR heterólogo ou um domínio extracelular GPCR heterólogo pode estar ligado à região T2R transmembranar. Outras proteínas heterólogas de escolha podem incluir, por exemplo, proteína verde fluorescente, polipeptídeos beta-galactosidase, receptor de glutamato e os polipeptídeos rodopsina, por exemplo, fragmentos N-terminal de rodopsina, por exemplo, rodopsina bovina.

Está também dentro do escopo da invenção o uso de diferentes células hospedeiras para expressar os T2Rs, fragmentos, ou variantes da invenção. Para obter tais níveis de expressão de um gene clonado ou ácido nucleico, como um cDNAs que codificam os fragmentos de T2Rs da invenção, um especialista tipicamente subclona a sequência de ácido nucleico de interesse em um vetor de expressão que contém um promotor forte para direcionar a transcrição, um terminador de transcrição/tradução, e se para um ácido nucleico que codifica uma proteína, um sítio de ligação para ribossomo para início da tradução. Promotores bacterianos apropriados são bem conhecidos na técnica e descritos, por exemplo, em Sambrook et al. Preferencialmente, os sistemas de expressão eucarióticos são usados para expressas o receptor sujeito hT2R.

Qualquer um dos procedimentos bem conhecidos para introdução de sequências de nucleotídeos externos nas

células hospedeiras podem ser usados. Estes incluem, o uso de transfecção de fosfato de cálcio, polibreno, fusão de protoplasto, eletroporação, lipossomas, microinjeção, vetores de plasmídeos, vetores virais e qualquer um dos outros métodos conhecidos para introdução de DNA genômico clonado, cDNA, DNA sintético ou outro material genético diferente em uma célula hospedeira (vide, por exemplo, Sambrook et al.) Somente é necessário que um procedimento particular de engenharia genética seja capaz de introduzir de forma bem sucedida pelo menos uma molécula de ácido nucleico na célula hospedeira capaz de expressar o T2R, fragmento ou variante de interesse.

Após o vetor de expressão ser introduzido nas células, as células transfectadas são cultivadas sob condições que favorecem a expressão do receptor, fragmento ou variante de interesse, que é então recuperado da cultura usando técnicas padrão. Exemplos de tais técnicas são bem conhecidas na prática. Vide, por exemplo, WO 00/06593, que está incorporado aqui para referência em uma maneira consistente com a revelação.

Ensaaios para Detecção de Compostos que Modulam a Atividade de um hT2R, de Acordo com a Invenção

Métodos e composições para determinar se um composto de teste especificamente se liga a um polipeptídeo T2R da invenção, ambos in vitro e in vivo são descritos abaixo. Muitos aspectos de fisiologia celular podem ser monitorados para avaliar o efeito de ligação de ligante a T2Rs de ocorrência natural ou quimera. Estes ensaios podem ser realizados em células intactas que expressam um polipeptídeo T2R, em células permeabilizadas ou frações de membranas produzidas por métodos padrão.

Os receptores de sabor se ligam a compostos que produzem sabor e iniciam a transdução de estímulos químicos em sinais elétricos. Uma proteína G ativada ou inibida irá, por sua vez, alterar as propriedades das enzimas alvos, canais e outras proteínas efetoras. Alguns exemplos são a ativação da fosfodiesterase cGMP por transducina no sistema visual,

adenilato ciclase pela proteína G estimulatória, fosfolipase C por Gq e outras proteínas cognatas e modulação de diversos canais por Gi e outras proteínas G. Consequências no sentido a jusante podem também ser examinados como a geração de diacil glicerol e IP3 por fosfolipase C e, por sua vez, para mobilização de cálcio por IP3.

As proteínas ou polipeptídeos hT2R do ensaio serão tipicamente selecionadas a partir de um polipeptídeo contendo uma sequência contida na sequência lista antes das reivindicações aqui ou fragmentos ou variantes modificadas de forma conservada dos mesmos.

De forma alternativa, as proteínas ou polipeptídeos T2R do ensaio podem ser derivados de uma célula hospedeira eucariótica e podem incluir uma sequência de aminoácido contendo um percentual de identidade sequência de aminoácido a estes polipeptídeos de hT2R ou variantes modificadas de forma conservada do mesmo. Geralmente, a identidade de sequência de aminoácidos será pelo menos 30%, preferencialmente 30-40%, mais especificamente, 50-60, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, ou 99%. Opcionalmente, as proteínas T2R ou polipeptídeos dos ensaios podem compreender uma região de um polipeptídeo T2R como um domínio extracelular, região transmembranar, domínio citoplasmático, domínio de ligação de ligante e semelhantes. Opcionalmente, como exemplificado aqui, o polipeptídeo T2R ou uma porção do mesmo, pode ser covalentemente ligado a uma proteína heteróloga para criar uma proteína quimérica usada nos ensaios descritos aqui.

Moduladores de atividade de T2R podem ser testados usando proteínas T2R ou polipeptídeos como descrito acima, seja recombinante ou de ocorrência natural. As proteínas ou polipeptídeos T2R podem ser isolados, expressos em uma célula, expressos em uma membrana derivada de uma célula, expressas em tecido ou em animal, seja recombinante ou de ocorrência natural. Por exemplo, fatias de língua, células dissociadas de língua, células transformadas ou membranas

podem ser usadas. A modulação pode ser testada usando um dos ensaios in vitro ou in vivo descrito aqui.

Deteccão de Moduladores

Composições e métodos para determinar se um composto de teste especificamente se liga a um receptor T2R da invenção, ambos in vitro e in vivo são descritos abaixo. Muitos aspectos da fisiologia celular pode ser monitorado para avaliar o efeito de ligação de ligante a um polipeptídeo T2R da invenção. Estes ensaios podem ser realizados em células intactas que expressam um receptor quimiosensor, em células permeabilizadas ou frações de membranas produzidas por métodos padrões ou in vitro usando proteínas sintetizadas de novo.

In vivo, os receptores de sabor se ligam a compostos modulatórios de sabor e iniciam a transdução de estímulos químicos em sinais elétricos. Uma proteína G ativada ou inibida irá, por sua vez, alterar as propriedades das enzimas alvos, canais e outras proteínas efetoras. Alguns exemplos são a ativação da fosfodiesterase cGMP por transducina no sistema visual, adenilato ciclase pela proteína G estimulatória, fosfolipase C por Gq e outras proteínas cognatas e modulação de diversos canais por Gi e outras proteínas G. Consequências no sentido a jusante podem também ser examinados como a geração de diacil glicerol e IP3 por fosfolipase C e, por sua vez, para mobilização de cálcio por IP3.

De forma alternativa, as proteínas ou polipeptídeos T2R do ensaio podem ser derivados de uma célula hospedeira eucariótica e podem incluir uma sequência de aminoácidos contendo uma identidade de sequência aminoácidos para os polipeptídeos T2R descritos aqui, ou fragmentos ou variantes modificadas de forma conservada do mesmo. Geralmente, a identidade de sequência de aminoácidos será pelo menos 35 a 50%, ou opcionalmente 70%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, ou 99%. Opcionalmente, as proteínas ou polipeptídeos T2R dos ensaios podem compreender um domínio de uma proteína T2R como

um domínio extracelular, região transmembranar, domínio transmembranar, domínio citoplasmático, domínio de ligação de ligante e semelhantes. Além disso, como descrito acima, a proteína T2R ou um domínio da mesma, pode ser covalentemente ligada a uma proteína heteróloga para criar uma proteína quimérica usada nos ensaios descritos aqui.

Moduladores de atividade de T2R podem ser testados usando proteínas ou polipeptídeos T2R como descrito acima, seja recombinante ou de ocorrência natural. As proteínas ou polipeptídeos T2R podem ser isolados, expressos em uma célula, expressos em uma membrana derivada de uma célula, expressas em tecido ou em animal, seja recombinante ou de ocorrência natural. Por exemplo, fatias de língua, células dissociadas de língua, células transformadas ou membranas podem ser usadas. A modulação pode ser testada usando um dos ensaios in vitro ou in vivo descrito aqui.

Ensaio de Ligação in vitro

A transdução de sabor pode ser examinada in vitro com reações solúveis ou no estado sólido, usando os polipeptídeos T2R da invenção. Em uma modalidade particular, os domínios de ligação de ligante T2R podem ser usados in vitro em reações solúveis ou no estado sólido para ensaiar para ligação de ligante.

É possível que o domínio de ligação de ligante possa ser formado pelo domínio N-terminal junto com porções adicionais do domínio extracelular, como as alças extracelulares do domínio transmembranar.

Ensaio de ligação in vitro têm sido usados com outros GPCRs, como os receptores de glutamato metabotrópicos (vide por exemplo, Han and Hampson, J. Biol. Chem. 274: 10008-10013 (1999)). Estes ensaios podem envolver deslocar um ligante marcado radioativamente ou fluorescentemente, medindo mudanças na fluorescência intrínseca ou alterações na susceptibilidade proteolítica, etc.

Ligação de ligantes para um polipeptídeo de acordo com a invenção pode ser testado em solução, em uma membrana

bicamada, opcionalmente ligada a uma fase sólida, em uma monocamada lipídica ou em vesículas. A ligação de um modulador pode ser testado usando, por exemplo, alterações em características espectroscópicas (por exemplo, fluorescência, absorbância, índice de refração) hidrodinâmica (por exemplo, forma), cromatográfica ou propriedades de solubilidade.

Em uma modalidade preferencial da invenção, um ensaio de ligação de $[^{35}\text{S}]\text{GTP}\gamma\text{S}$ é usado. Como descrito acima, quando ocorre a ativação de um GPCR, a subunidade $G\alpha$ do complexo de proteína G é estimulado a trocar a ligação GDP por GTP. A estimulação mediada por ligante de atividade de troca de proteína G pode ser medida em um ensaio bioquímico medindo a ligação de radioatividade adicionada marcada com $[^{35}\text{S}]\text{GTP}\gamma\text{S}$ para a proteína G na presença de um ligante putativo. Tipicamente, as membranas contendo receptores quimiosensores de interesse são misturadas com a proteína G. Inibidores potenciais e/ou ativadores e $[^{35}\text{S}]\text{GTP}\gamma\text{S}$ são adicionados ao ensaio, e a ligação de $[^{35}\text{S}]\text{GTP}\gamma\text{S}$ à proteína G é medida. Ligação pode ser medida por contagem de cintilação líquida ou por qualquer outro meio conhecido na técnica incluindo ensaios de proximidade de cintilação (SPA). Em outros formatos de ensaios, $\text{GTP}\gamma\text{S}$ marcado fluorescentemente pode ser utilizado.

Ensaio de Polarização de Fluorescência

Em outra modalidade, ensaios com base em Polarização de Fluorescência ("FP") podem ser usados para detectar e monitorar a ligação do ligante. A polarização fluorescente é uma técnica versátil de laboratório para medir o equilíbrio, hibridização de ácido nucleico e atividade enzimática. Os ensaios de polarização de fluorescência são homogêneos em que eles não requerem uma etapa de separação como centrifugação, filtração, cromatografia, precipitação ou eletroforese. Estes ensaios são realizados em tempo real, diretamente em solução e não requerem uma fase imobilizada. Os valores de polarização podem ser medidos repetidamente e após a adição de reagentes uma vez que a medição da polarização é rápida e

não destrói a amostra. Geralmente, esta técnica pode ser usada para medir valores de polarização de fluoróforos a partir de níveis baixos picomolares até micromolares. Esta seção descreve como a polarização fluorescente pode ser usada

5 de uma maneira simples e quantitativa para medir a ligação de ligantes a polipeptídeos T2R da invenção.

Quando uma molécula fluorescentemente marcada é excitada com luz plana polarizada, este emite luz que tem um grau de polarização que é inversamente proporcional à sua rotação

10 molecular. Grandes moléculas fluorescentemente marcadas permanecem relativamente estacionárias durante o estado excitado (4 nanosegundos no caso de fluoresceína) e a polarização da luz permanece relativamente constante entre a excitação e a emissão. Pequenas moléculas fluorescentemente

15 marcadas giram rapidamente durante o estado excitado e as alterações de polarização significativamente entre excitação e emissão. Portanto, pequenas moléculas têm valores baixos de polarização e moléculas grandes têm valores altos de polarização. Por exemplo, um oligonucleotídeo de fita

20 simples marcado com fluoresceína tem um valor relativamente baixo de polarização, mas quando está hibridizado com uma fita complementar, tem um valor de polarização maior. Quando usando FP para detectar e monitorar ligação de compostos que produzem sabor que podem ativar ou inibir os

25 receptores quimiosensores da invenção, os compostos que produzem sabores marcados com fluorescência ou compostos que produzem sabor auto-fluorescentes podem ser usados.

A polarização de fluorescência (P) é definida como:

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

30 Onde Int_{par} é a intensidade de emissão de luz paralela ao plano de excitação de luz e Int_{perp} é a intensidade da emissão de luz perpendicular ao plano de excitação da luz. P, sendo a razão de intensidades de luz, é um número sem dimensões.

Por exemplo, o Beacon™ e Beacon 2000™. O sistema pode ser usado em relação a estes ensaios. Tais sistemas expressam tipicamente a polarização em unidades de milipolarização (1 Unidade de Polarização = 1000 Unidades de mP).

5 A relação entre rotação molecular e tamanho é descrita pela equação de Perrin e o leitor é referenciado por Jolley, M. E. (1991) in Journal of Analytical Toxicology, pp. 236-240 incorporado aqui para referência, o que mostra uma explicação completa desta equação. De forma resumida, a equação de
10 Perrin estabelece que a polarização seja diretamente proporcional ao tempo de relaxamento rotacional, o tempo que uma molécula leva para girar por um ângulo de aproximadamente 68,5°. O tempo de relaxamento rotacional é relacionado à viscosidade (η), temperatura absoluta (T), volume
15 molecular (V) e constante de gás (R) pela seguinte equação:
 $2(\text{Tempo de Relaxamento Rotacional}) = 3 V R T$

O tempo de relaxamento rotacional é pequeno (~ nanosegundos) para moléculas pequenas (por exemplo, fluoresceína) e grande (~ 100 nanosegundos) para moléculas
20 grandes (por exemplo, imunoglobulinas). Se a viscosidade e a temperatura forem mantidas constantes, o tempo de relaxamento rotacional e, portanto, a polarização, são diretamente relacionadas ao volume molecular. Alterações no volume molecular podem ser devidas a interações com outras
25 moléculas, dissociação, polimerização, degradação, hibridização ou alterações conformacionais da molécula fluorescentemente marcada. Por exemplo, a polarização fluorescente tem sido usada para medir clivagem enzimática de grandes polímeros marcados com fluoresceína por proteases,
30 DNases e RNases. Também tem sido usado para medir a ligação de equilíbrio para interações proteínas/proteínas, ligação anticorpo/antígeno e ligação proteína/DNA.

Ensaaios de Alto Rendimento em Estado Sólido e Solúvel

Ainda em outra modalidade, a invenção fornece ensaios
35 solúveis usando um polipeptídeo T2R; ou uma célula ou tecido expressando polipeptídeo T2R. Em outra modalidade, a

invenção fornece ensaios in vitro baseados em fase sólida em um formato de alto rendimento, onde o polipeptídeo T2R, ou célula ou tecido expressando o polipeptídeo T2R está ligado a um substrato de fase sólida ou um composto que estimula o
5 sabor e entra em contato com um receptor T2R, e ligação detectada usando um marcador apropriado ou anticorpo produzido contra o receptor T2R.

Nos ensaios de alto rendimento da invenção é possível triar até vários milhares de diferentes moduladores ou
10 ligantes em um único dia. Em particular, cada poço de uma placa de microtitulação pode ser usado para rodar um ensaio separado contra um modulador em potencial selecionado, ou se a concentração ou tempo de incubação efetivos devem ser observados, cada 5-10 poços podem testar um único modulador.
15 Assim, uma única placa de microtitulação padrão pode analisar cerca de 100 (por exemplo, 96) moduladores. Se placas de 1536 poços forem usadas, então uma única placa pode facilmente analisar cerca de 1000 até cerca de 1500 compostos diferentes. Também é possível analisar múltiplos compostos
20 em cada poço da placa. É possível analisar diferentes placas por dias, ensaios de triagem por até cerca de 6.000-20.000 diferentes compostos é possível usando os sistemas integrados da invenção. Mais recentemente, abordagens de microfluído para manipulação de reagente foram desenvolvidas.

A molécula de interesse pode ser ligada a um componente em estado sólido, direta ou indiretamente, via ligação covalente ou não covalente, por exemplo, através de um marcador. O marcador pode ser qualquer um de uma variedade de componentes. Em geral, uma molécula que liga um marcador
25 (o aglutinante marcador) é fixada em um suporte sólido, e a molécula marcada de interesse (por exemplo, molécula de transdução de sabor de interesse) é ligada ao suporte sólido por interação do marcador e do aglutinante marcador.
30

Um número de marcadores e aglutinantes marcadores pode ser usado, baseado nas interações moleculares conhecidas bem
35 descritas na literatura. Por exemplo, quando um marcador

tem um aglutinante natural, por exemplo, biotina, proteína A, ou proteína G, pode ser usado em conjunto com aglutinantes marcadores apropriados (avidina, estreptavidina, neutravidina, a região Fc de uma imunoglobulina, etc.).

5 Anticorpos para moléculas com aglutinantes naturais como a biotina também estão amplamente disponíveis e aglutinantes marcadores apropriados (vide SIGMA Immunochemicals 1998 catalogue SIGMA, St. Louis Mo.).

De forma semelhante, qualquer componente haptênico ou
10 antigênico pode ser usado em combinação com um anticorpo apropriado para formar um par de aglutinantes marcador/marcador. Milhares de anticorpos específicos estão comercialmente disponíveis e muitos anticorpos adicionais estão descritos na literatura. Por exemplo, em uma
15 configuração comum, o marcador é um primeiro anticorpo e o ligante marcado é um segundo anticorpo que reconhece o primeiro anticorpo. Além disso, as interações anticorpo-antígeno, interações receptor-ligante também são apropriadas como marcadores e pares de marcadores-aglutinantes. Por
20 exemplo, agonistas e antagonistas de receptores de membrana celular (por exemplo, interações de receptor de célula e ligante, como transferrina, c-kit, ligantes de receptores virais, receptores de citosina, receptores de quimiocinas, receptores de interleucina, receptores de imunoglobulina e
25 anticorpos, a família de caderinas, a família de integrinas, a família de selectinas e semelhantes, vide, por exemplo, Pigott & Power, The Adhesion Molecule Facts Book I (1993)). De forma semelhante, as toxinas e venomas, epítomos virais, hormônios (por exemplo, opioides, esteroides, etc.),
30 receptores intracelulares (por exemplo, que mediam os efeitos de vários pequenos ligantes, incluindo esteroides, hormônio da tireoide e vitamina D; peptídeos), drogas, lectinas, açúcares, ácidos nucleicos (tanto configurações lineares quanto polímeros cíclicos), oligossacarídeos, proteínas,
35 fosfolipídeos e anticorpos podem todos interagir com vários receptores de células.

Polímeros sintéticos, como poliuretanos, poliésteres, policarbonatos, poliureias, poliamidas, polietileneiminas, poliarileno sulfetos, polisiloxanos, poliimidas e poliacetatos podem também formar um marcador apropriado ou
5 aglutinante marcado. Muitos outros pares de aglutinantes marcadores/marcados também são úteis em sistemas de ensaios aqui, como pode ser percebido para um especialista na técnica desta revelação.

Ligantes comuns como proteínas, poliéteres, e
10 semelhantes podem também servir como marcadores e incluem sequências de polipeptídeos, como as sequências de poli gli de entre cerca de 5 e 200 aminoácidos. Tais ligadores flexíveis são conhecidos por pessoas especialistas no assunto. Por exemplo, ligantes poli(etilenoglicóis) estão
15 disponíveis de Shearwater Polymers, Inc. Huntsville, Ala. Estes ligantes opcionalmente têm ligantes amidas, ligantes sulfidrilas ou ligações heterofuncionais.

Os aglutinantes marcados são fixados em substratos sólidos usando qualquer um de uma variedade de métodos
20 atualmente disponíveis. Os substratos sólidos são comumente derivados ou funcionalizados pela exposição de todo ou uma parte do substrato a um reagente químico que fixa um grupo químico à superfície que é reativa com uma porção de aglutinante marcado. Por exemplo, grupos que são adequados
25 para ligação a uma porção longa de cadeia poderiam incluir aminas, hidroxilas, tióis, e grupos carboxilas. Aminoalquilsilanos e hidroxialquilsilanos podem ser usados para funcionalizar uma variedade de superfícies, como as superfícies de vidros. A construção de tais arranjos de
30 biopolímeros de fase sólida é bem descrita na literatura.

Vide, por exemplo, Merrifield, J. Am. Chem. Soc., 85: 2149-2154 (1963) (descrevendo síntese de fase sólida de, por exemplo, peptídeos); Geysen et al., J. Immun. Meth., 102: 259-274 (1987) (descrevendo síntese de fase sólida de
35 componentes em alfinetes); Frank & Doring, Tetrahedron, 44: 6031-6040 (1988) (descrevendo síntese de várias sequências de

peptídeos em discos de celulose); Fodor et al., Science, 251: 767-777 (1991); Sheldon et al., Clinical Chemistry, 39(4): 718-719 (1993); e Kozal et al., Nature Medicine, 2(7): 753-759 (1996) (todos descrevendo arranjos de biopolímeros fixados em substratos sólidos). Abordagens não-químicas para fixar aglutinantes marcados a substratos incluem outros métodos comuns, como calor, ligação cruzada por radiação UV e semelhantes.

Ensaio baseado em Células

Em uma modalidade preferencial, uma proteína é expressa em uma célula eucariótica seja na forma não modificada quanto quimérica, variante ou receptores truncados com ou preferencialmente sem uma sequência heteróloga, chaperona que facilita sua maturação e marcação através de secreção pulmonar. Tais polipeptídeos T2R podem ser expressos em células eucarióticas, como células HEK-293. Preferencialmente, as células compreendem uma proteína G funcional, por exemplo, G.α15 ou uma G.α16 quimera, gustducina ou transducina ou uma proteína G quimera como G16gust44 que é capaz de acoplar o receptor quimérico a uma via de sinalização intracelular ou a uma proteína de sinalização como a fosfolipase C. A ativação de receptores de T2R em tais células pode ser detectada usando um método padrão, como pela detecção de cargas em cálcio intracelular ao detectar a fluorescência dependente de FURA-2 na célula. Como um ensaio é a base dos achados experimentais apresentados neste pedido.

Receptores GPCR ativados geralmente são substratos para quinases que fosforilam a cauda C-terminal do receptor (e possivelmente outros sítios também). Assim, ativadores promoverão a transferência de ³²P do ATP radiomarcado ao receptor, que pode ser analisado com um contador de cintilação. A fosforilação da cauda C-terminal promoverá a ligação de proteínas tipo arrestina e irá interferir com a ligação de proteínas G. Para uma visão geral de transdução de sinal GPCR e métodos para analisar transdução de sinal,

vide, por exemplo, *Methods in Enzymology*, vols. 237 and 238 (1994) and volume 96 (1983); Bourne et al., *Nature*, 10: 349: 117-27 (1991); Bourne et al., *Nature*, 348: 125-32 (1990); Pitcher et al., *Annu. Rev. Biochem.*, 67: 653-92 (1998).

5 A modulação de T2R pode ser analisada por comparação da resposta de polipeptídeos T2R tratados com um modulador putativo para responder a uma amostra de controle não tratada ou uma amostra contendo um controle "positivo". Tais moduladores T2R putativos podem incluir moléculas que podem
10 tanto inibir quanto ativar a atividade do polipeptídeo T2R. Em uma modalidade, amostras de controle tratadas com um composto que ativa T2R são designadas como valor de atividade de T2R relativa de 100. A inibição de polipeptídeo T2R é alcançada quando a atividade de o valor relativo da atividade
15 de T2R para a amostra controle é de cerca de 90%, opcionalmente 50%, opcionalmente, 25-0%. A ativação de um polipeptídeo T2R é alcançada quando o valor da atividade de T2R em relação ao controle é de 110%, opcionalmente 150%, 200-500% ou 1000-2000%.

20 Alterações no fluxo de íon podem ser associadas pela determinação de alterações na polarização iônica (ou seja, potencial elétrico) da célula ou membrana expressando um polipeptídeo T2R. Um meio de determinar alterações na polarização celular é medir alterações em corrente (por meio
25 disso, medir alterações na polarização) com técnicas de voltage-clamp e patch-clamp (vide, por exemplo, o modo "cell-attached", o modo "inside-out", e o modo "whole cell", por exemplo, Ackerman et al., *New Engl. J Med.*, 336: 1575-1595 (1997)). Correntes totais celulares são convenientemente
30 determinados usando o padrão. Outros ensaios conhecidos incluem: Ensaios de fluxo de íons radiomarcados e ensaios fluorescentes usando corantes sensíveis a voltagem (vide, por exemplo, Vestergarrd-Bogind et al., *J. Membrane Biol.*, 88: 67-75 (1988); Gonzales & Tsien, *Chem. Biol.*, 4: 269-277
35 (1997); Daniel et al., *J. Pharmacol. Meth.*, 25: 185-193

(1991); Holevinsky et al., J. Membrane Biology, 137: 59-70 (1994)).

Os efeitos dos compostos de teste quando a função de polipeptídeos pode ser medida ao examinar qualquer um dos
5 parâmetros abaixo descritos. Qualquer alteração fisiológica apropriada que afete a atividade de GPCR pode ser usada para avaliar a influência de um composto de teste nos polipeptídeos desta invenção. Quando as consequências funcionais são determinadas usando células intactas ou
10 animais, um pode também medir uma variedade de efeitos como liberação de transmissor, liberação de hormônio, alterações transcricionais para marcadores genéticos conhecidos e não caracterizados (por exemplo, northern blots), alterações no metabolismo celular como crescimento
15 celular ou alterações de pH e alterações em mensageiros secundários intracelulares como Ca^{2+} , IP3, cGMP, ou cAMP.

Ensaio preferenciais de GPCRs incluem células que são carregadas com corantes sensíveis a íons ou voltagens para reportar atividade de receptor. Ensaio para determinar a
20 atividade de tais receptores podem também usar agonistas e antagonistas conhecidos para outros receptores de proteína G acoplados para avaliar a atividade de compostos testados. Em ensaios para identificar compostos modulatórios (por exemplo, agonistas, antagonistas), alterações no nível de
25 íons na voltagem do citoplasma ou da membrana serão monitorados usando um indicador fluorescente sensível a íon ou voltagem de membrana, respectivamente. Entre os indicadores sensíveis a íons e sondas de voltagem que podem ser empregados são aqueles descritos no Molecular Probes 1997
30 Catalog. Para receptores de proteína G acoplada, proteínas G promíscuas como $\text{G}\alpha 15$ e $\text{G}\alpha 16$ podem ser usadas no ensaio de escolha (Wilkie et al., Proc. Nat'l Acad. Sci., 88: 10049-10053 (1991)). De forma alternativa, outras proteínas G como gustducina, transducina e proteínas G quimeras como
35 $\text{G}\alpha 16\text{gust}44$ ou $\text{G}\alpha 16\text{t}25$ podem ser usadas.

A ativação de receptores inicia subsequentes eventos intracelulares, por exemplo, aumenta mensageiros secundários. A ativação de alguns receptores acoplados a proteína G estimula a formação de inositol trifosfato (IP3) através de
5 hidrólise mediada por fosfolipase C de fosfatidilinositol (Berridge & Irvine, *Nature*, 312:315-21 (1984)). IP3, por sua vez, estimula a liberação de depósitos intracelulares de íon cálcio. Assim, a alteração nos níveis de cálcio citoplasmático ou uma alteração nos níveis de mensageiros
10 secundários como IP3 podem ser usados para avaliar a função de receptor acoplado a proteína G. A expressão de células como receptores acoplados a proteína G podem exibir níveis de cálcio citoplasmáticos aumentados como um resultado de contribuição tanto de liberação de cálcio de depósitos
15 intracelulares quanto da entrada de cálcio extracelular via canais de íons na membrana celular.

Em uma modalidade preferencial, uma atividade de polipeptídeo T2R é medida pela expressão do gene T2R em uma célula heteróloga com uma proteína G promíscua que liga o
20 receptor a uma via de transdução de sinal de fosfolipase C (vide Offermanns & Simon, *J. Biol. Chem.*, 270: 15175-15180 (1995)). Preferencialmente, a linhagem de células é HEK-293 (que normalmente não expressa genes de T2R) e a proteína G promíscua G α 15 (Offermanns & Simon, acima), ou uma proteína
25 G químera como G α 16gust44. A modulação de transdução de sabor é analisada ao medir alterações nos níveis de Ca²⁺ intracelular com alteração na resposta à modulação da via de transdução de sinal T2R via administração de uma molécula que associa como o polipeptídeo T2R. Alterações nos níveis de
30 Ca²⁺ são opcionalmente medidos usando corantes fluorescentes indicadores de Ca²⁺ e imagem fluorimétrica.

Em outra modalidade, a hidrólise de inositol fosfatidil (PI) pode ser analisada de acordo com a Patente U.S. No. 5.436.128 aqui incorporado para referência. De forma
35 resumida, o ensaio envolve marcação de células com 3H-mioinositol por 48 horas ou mais. As células marcadas são

tratadas com um composto de teste por uma hora. As células tratadas são lisadas e extraídas em clorofórmio-metanol-água após o qual os fosfatos de inositol são separados por cromatografia de troca iônica e quantificado por contagem por cintilação. Uma estimulação é determinada por calcular a razão de cpm na presença de agonista, para cpm na presença de controle tampão. Da mesma forma, a inibição é determinada ao calcular a razão de cpm na presença de antagonista para cpm na presença de um controle tampão (que pode ou não conter um agonista).

Outros ensaios de receptores podem envolver a determinação do nível de nucleotídeos cíclicos intracelulares, por exemplo, cAMP, ou cGMP. Em casos onde a ativação do receptor resulta em uma diminuição nos níveis de nucleotídeos cíclicos pode ser preferível expor as células a agentes que aumentem os níveis de nucleotídeos cíclicos intracelulares, por exemplo, forskolina antes da adição de compostos que ativam receptores a células no ensaio. Em uma modalidade, as alterações na cAMP ou cGMP intracelulares podem ser medidos usando imunoensaios. O método descrito em Offermanns & Simon, J. Bio. Chem., 270: 15175-15180 (1995), pode ser usado para determinar o nível de cAMP. Ainda, o método descrito em Felley-Bosco et al., Am. J. Resp. Cell and Mol. Biol., 11: 159-164 (1994), pode ser usado para determinar o nível de cGMP. Além disso, um kit de ensaio para medir cAMP e/ou cGMP é descrito em Patente U.S. 4.115.538 aqui incorporada para referência.

Em outra modalidade, os níveis de transcrição podem ser medidos para avaliar os efeitos de um composto de teste no sinal de transdução. Uma célula hospedeira contendo polipeptídeo T2R de interesse é tratada com um composto de teste por um tempo suficiente para efetuar quaisquer interações e, em seguida, o nível de expressão gênica é medido. A quantidade de tempo para efetuar tais interações pode ser empiricamente determinada como por rodar um curso de tempo e medir o nível de transcrição como uma função do

tempo. A quantidade de transcrição pode ser medida ao usar qualquer método conhecido pelos especialistas na técnica como apropriado. Por exemplo, a expressão de mRNA da proteína de interesse pode ser detectada usando northern blots ou seus
5 produtos polipeptídicos podem ser identificados usando imunoensaios. De forma alternativa, ensaios baseados em transcrição usando um gene repórter podem ser usados como descrito na Patete U.S. No. 5.436.128 aqui incorporada por referência. Os genes repórteres podem ser, por exemplo,
10 acetiltransferase cloranfenicol, luciferase, beta-galactosidase, beta-lactamase e fosfatase alcalina. Além disso, a proteína de interesse pode ser usada como um repórter indireto ao ligar a um segundo repórter como a proteína verde fluorescente (vide, por exemplo, Mistili &
15 Spector, Nature Biotechnology, 15:961-964 (1997)).

A quantidade de transcrição é então comparada à quantidade de transcrição seja na mesma célula na ausência do composto de teste ou pode ser comparado com a quantidade de transcrição em uma célula substancialmente idêntica que não
20 tem o polipeptídeos T2R de interesse. Uma célula substancialmente idêntica pode ser derivada das mesmas células das quais a célula recombinante foi preparada mas pelas quais não foi modificada pela introdução de um DNA heterólogo. Qualquer diferença na quantidade de transcrição
25 indica que o composto de teste tem, de alguma maneira, alterado a atividade de polipeptídeo T2R de interesse.

Animais Não Humanos Transgênicos que Expressam Receptores Quimiosensores

Animais não humanos que expressam um ou mais sequências
30 de receptores da invenção podem ser usados para ensaios de receptor. Tal expressão pode ser usada para determinar se um composto teste especificamente se liga a um complexo receptor transmembranar de sabor de mamífero in vivo ao entrar em contato com animais não humanos, com estabilidade
35 ou temporariamente transfectado com ácidos nucleicos que codificam receptores quimiosensores ou regiões de ligação de

ligantes do mesmo com um composto teste e determinar se o animal reage ao composto teste ao se ligar especificamente ao complexo polipeptídico receptor.

Animais transfectados ou infectados com os vetores da
5 invenção são particularmente úteis para ensaios para identificar e caracterizar os estímulos de sabor que podem se ligar a um receptor ou conjuntos de receptores específicos. Tais animais infectados por vetor que expressam sequências de receptor de sabor humanos podem ser usados para triagem in
10 vivo de estímulo de sabor e seus efeitos em, por exemplo, fisiologia de célula (por exemplo, neurônios de sabor) no SNC ou comportamento.

Meios de infectar os ácidos nucleicos e vetores, quer individualmente ou como bibliotecas são bem conhecidos na
15 técnica. Uma variedade parâmetros de célula individual, órgão ou animal como um todo podem ser medidos por uma variedade de meios. As sequências de T2R da invenção podem, por exemplo, ser expressas em tecidos de sabor de animais por liberação de agente infeccioso, por exemplo, vetor de
20 expressão de adenovírus.

Os genes endógenos de receptor de sabor podem permanecer com atividades funcionais e selvagens (nativas) podem ainda estar presentes. Em outras situações, onde é desejável que a atividade do receptor de sabor é pela introdução de receptor
25 híbrido endógeno, uso de uma linha knockout é preferencial. Os métodos para a construção de animais transgênicos não humanos, particularmente camundongos transgênicos e a seleção e preparação de constructos recombinantes para gerar células transformadas são bem conhecidas na técnica.

30 A construção de uma célula "knockout" e animal é baseada na premissa de que o nível de expressão de um gene particular em uma célula de mamífero pode ser diminuído ou completamente apagado ao introduzir no genoma uma nova sequência de DNA que serve para interromper uma parte da sequência de DNA do gene
35 a ser suprimido. Além disso, a "inserção de gene armadilha" pode ser usada para interromper um gene hospedeiro, e

células-tronco embrionárias de camundongo (ES) podem ser usadas para produzir animais "knockout" transgênicos (vide, por exemplo, Holzschu, Transgenic Res 6:97-106 (1997)). A inserção de exógeno é tipicamente por recombinação homóloga entre as sequências de ácidos nucleicos complementares. A sequência exógena é alguma parte do gene marcado a ser modificado, como sequências de exon, intron ou reguladores de transcrição ou qualquer sequência genômica que é capaz de afetar o nível de expressão do gene marcado; ou uma combinação dos mesmos. A marcação do gene através de recombinação homóloga em células tronco embrionárias pluripotenciais permite modificar precisamente a sequência genômica de interesse. Qualquer técnica pode ser usada para criar, triar para, propagar um animal knockout, por exemplo, vide Bijvoet, Hum. Mol. Genet. 7: 53-62 (1998); Moreadith, J. Mol. Med. 75: 208-216 (1997); Tojo, Cytotechnology 19:161-165 (1995); Mudgett, Methods Mol. Biol. 48:167-184 (1995); Longo, Transgenic Res. 6:321-328 (1997); Patente U.S. 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. Os ácidos nucleicos da invenção podem também ser usados como reagentes para produzir células humanas "knockout" e seus descendentes. Da mesma forma, os ácidos nucleicos da invenção podem também ser usados como reagentes para produzir camundongos "knock-ins". As sequências de gene T2R humanos ou de ratos podem substituir os T2R ortólogos de genoma de camundongos. Desta forma, um camundongo que expressa um T2R de humano ou rato é produzido. Este camundongo pode então ser usado para analisar a função dos T2Rs humanos ou de ratos e para identificar ligantes para tais T2Rs.

Moduladores

Os compostos testados como moduladores de um membro da família T2R pode ser qualquer composto químico pequeno ou uma entidade biológica como uma proteína, açúcar, ácido nucleico ou lipídeo. De forma alternativa, os modulares podem ser

versões geneticamente alteradas de um membro da família T2R. Tipicamente, estes compostos de teste podem ser pequenas moléculas químicas e peptídeos. Essencialmente qualquer composto químico pode ser usado como modulador potencial ou
5 ligante em ensaios da invenção, embora a maior parte dos compostos possa ser dissolvida em soluções aquosas ou orgânicas (especialmente baseadas em DMSO) são usadas. Os ensaios podem ser projetados para triar grandes bibliotecas químicas ao automatizar as etapas de ensaios e fornecer
10 compostos de qualquer fonte conveniente para ensaios, que tipicamente correm em paralelo (por exemplo, em formatos de microtituladores ou placas de microtitulação em ensaios biorrobóticos). Será apreciado que são muitos os fornecedores de compostos químicos incluindo Sigma (St. Louis, Mo.),
15 Aldrich (St. Louis, Mo.), Sigma-Aldrich (St. Louis, Mo.), Fluka Chemika-Biochemica Analytika (Buchs, Switzerland) e outros.

Em uma modalidade, métodos de triagem de alto rendimento envolvem fornecer uma química combinatória ou biblioteca de
20 peptídeos contendo um grande número de compostos terapêuticos potenciais (compostos moduladores ou ligantes potenciais). Tais "bibliotecas químicas combinatórias" ou "bibliotecas de ligantes" são então triadas em um ou mais ensaios como descritos aqui, para identificar aqueles membros da
25 biblioteca (espécies ou subespécies químicas particulares) que dispõem da atividade característica desejada. Os compostos assim identificados podem servir como "compostos líderes" convencionais ou podem eles próprios serem usados como produtos potenciais ou para consumidores atuais.

30 Uma biblioteca química combinatória é uma coleção de diversos compostos químicos gerados ou por síntese química ou por síntese biológica, ao combinar um número de "blocos de construção" químicos como reagentes. Por exemplo, uma biblioteca química combinatória linear como a biblioteca de
35 polipeptídeo é formada pela combinação de um conjunto de blocos de construção químicos (aminoácidos) em cada forma

possível para um dado comprimento de composto (ou seja, o número de aminoácidos em um composto polipeptídico). Milhões de compostos químicos podem ser sintetizados através de tal mistura combinatória de blocos de construção química.

5 A preparação e triagem de bibliotecas químicas combinatoriais é bem conhecida pelos especialistas na técnica. Tais bibliotecas químicas combinatoriais incluem, mas não estão limitadas a, bibliotecas de peptídeos (vide, por exemplo, Patente U.S. No. 5.010.175, Furka, Int. J. Pept. 10 Prot. Res., 37: 487-93 (1991) e Houghton et al., Nature, 354: 84-88 (1991)). Outras químicas para geração de bibliotecas de diversidade químicas também podem ser usadas. Tais químicas incluem, mas não estão limitadas a: peptídeos (por exemplo, WO 91/19735), peptídeos codificados (por exemplo, WO 15 93/20242), bio-oligômeros aleatórios (por exemplo, WO 92/00091), benzodiazepínicos (por exemplo, Patente U.S. 5.288.514), diversômeros como hidantoínas, benzodiazepinas e dipeptídeos (Hobbs et al., PNAS. , 90:6909-13 (1993)), Polipeptídeos vinilógos (Hagihara et al., J. Amer. 20 Chem. Soc., 114:6568 (1992)), peptidomiméticos não peptídeos com estrutura de glicose (Hirschmann et al., J. Amer. Chem. Soc., 114:9217-18 (1992)), sínteses de análogos orgânicos de pequenas bibliotecas de compostos (Chen et al., J. Amer. Chem. Soc., 116:2661 (1994)), oligocarbamatos (Cho et al., 25 Science, 261:1303 (1993)), fosfonatos peptídicos (Campbell et al., J. Org. Chem., 59:658 (1994)), bibliotecas de ácido nucleico (Ausubel, Berger, and Sambrook, todos supra), bibliotecas de ácidos nucleicos peptídicos (Patente U.S. No. 5.539.083), bibliotecas de anticorpos (Vaughn et al., Nature 30 Biotechnology, 14(3):309-14 (1996) e PCT/US96/10287), bibliotecas de carboidratos (Liang et al., Science, 274:1520-22 (1996) e Patente U.S. No. 5.593.853), pequenas bibliotecas de moléculas orgânicas (benzodiazepinas, Baum, C&EN, Jan 18, page 33 (1993); tiazolidinonas e metatiazanonas, Patente U.S. 35 No. 5.549.974; pinrolidinas, Patente U.S. Nos. 5.525.735 e

5.519.134; compostos morfolinos, Patente U.S. No. 5.506.337; benzodiazepinas, 5.288.514, e semelhantes).

Dispositivos para a preparação de bibliotecas combinatoriais estão comercialmente disponíveis (vide, por exemplo, 357 MPS, 390 MPS (Advanced Chem Tech, Louisville Ky.), Symphony (Rainin, Woburn, Mass.), 433A (Applied Biosystems, Foster City, Calif.), 9050 Plus (Millipore, Bedford, Mass.)). Além disso, inúmeras bibliotecas combinatoriais estão por si próprias disponíveis comercialmente (vide, por exemplo ComGenex, Princeton, N.J.; Tripos, Inc., St. Louis, Mo.; 3D Pharmaceuticals, Exton, Pa.; Martek Biosciences; Columbia, Md.; etc.).

Em um aspecto da invenção os moduladores T2R podem ser usados em qualquer produto alimentício, de confeitaria, composição farmacêutica ou ingrediente dos mesmos para, por meio disso, modular o sabor do produto, composição ou ingrediente de uma maneira desejada. Por exemplo, os moduladores T2R que melhorara a sensação de sabor amargo podem ser adicionados para fornecer um sabor amargo a um produto ou composição, enquanto que moduladores que bloqueiam sensações de sabor amargo podem ser adicionados para bloquear o sabor amargo de um produto ou composição. Ainda, a invenção fornece meios de identificar compostos amargos encontrados em alimentos, bebidas, cosméticos e medicinais e produzir sabor melhorado de alimentos, bebidas e medicinais desprovidos ou tendo quantidade reduzida dos mesmos.

Uso de Compostos Identificados pela Invenção

Os compostos identificados, de acordo com a invenção, podem ser adicionados a alimentos, bebidas, cosméticos ou composições medicinais para modular, preferencialmente bloquear o sabor amargo acionado pela ativação de pelo menos um de hT2R8 e/ou hT2R14 por compostos amargos presentes no café e alimentos, bebidas e medicamentos relacionados ou compostos estruturalmente relacionados ou outros compostos amargos, por exemplo, compostos encontrados em alimentos e

bebidas ou medicinais ou cosméticos que produzem uma percepção de sabor amargo.

Em particular o Composto C e seus análogos, com base em suas amplas faixas de propriedades antagonistas podem ser
5 usados em qualquer alimento, bebida, medicamento ou material para consumo por humanos ou animais onde o sabor amargo seja aliviado de forma desejável. Dadas as propriedades do Composto C, estes materiais podem conter ligantes amargos conhecidos para interagir com ligantes de amargo específicos
10 como hT2R3, 7, 10, 14, 16, 44, 51, 55, 61, 63, 64, 65, ou 71 e/ou com hT2R5, 9, 13, 54, 67 e 75 ou uma combinação dos mesmos ou que contenham compostos amargos para os quais suas seletividades de receptores amargos seja indeterminadas. Aplicações especialmente preferenciais são composições
15 contendo compostos que ativam múltiplos receptores de sabor amargo.

Além disso, os compostos sujeitos incluindo o Composto C podem ser usados em ensaios de ligação competitiva e funcional bem como em testes de degustação para identificar
20 compostos amargos para os quais o Composto C bloqueia ou inibe o sabor amargo.

Como observado anteriormente, preferivelmente, as propriedades modulatórias de sabor, preferencialmente as propriedades de bloqueio do sabor amargo dos compostos
25 identificados nos ensaios baseados em células de sujeitos T2R serão confirmados em testes com humanos ou animais, preferencialmente em testes de degustação humanos.

Kits

Os genes T2R e seus homólogos são ferramentas úteis para
30 identificar células receptoras de sabor, para determinações forenses e de paternidade e para examinação de transdução de sabor. Os reagentes específicos para membros da família de T2R que especificamente hibridizam para ácidos nucleicos T2R, como as sondas de T2R e primers e reagentes específicos para
35 T2R se ligam especificamente a uma proteína T2R, por exemplo,

anticorpos T2R são usados para examinar expressão de célula de sabor e regulação de transdução de sabor.

Ensaaios para ácido nucleico para a presença de DNA e RNA para um membro da família T2R em uma amostra inclui inúmeras técnicas conhecidas pelos especialistas na técnica, como análise de southern blot, análise de northern, dot blots, proteção RNase, análise de S1, técnicas de amplificação como PCR e hibridização in situ. Por exemplo, na hibridização in situ, o ácido nucleico marcado é liberado de sua redondeza celular de forma que fique disponível para hibridização dentro da célula enquanto preserva a morfologia celular para interpretação e análise subsequente. Os seguintes artigos fornecem uma visão geral da técnica de hibridização in situ: Singer et al., *Biotechniques*, 4:230-250 (1986); Haase et al., *Methods in Virology*, vol. VII, 189-226 (1984); e Names et al., eds., *Nucleic Acid Hybridization: A Practical Approach* (1987). Além disso, uma proteína T2R pode ser detectada com as várias técnicas de imunoensaio descritas acima. A amostra de teste é tipicamente comparada a ambos os controles positivo (por exemplo, uma amostra que expressa uma proteína T2R recombinante) e negativo.

A presente invenção também fornece kits para triagem para moduladores de membros da família T2R. Tais kits podem ser preparados a partir de reagentes e materiais prontos disponíveis. Por exemplo, tais kits podem compreender qualquer um ou mais dos seguintes materiais: Ácidos nucleicos ou proteínas T2R, tubos de reação e instruções para testar a atividade de T2R. Opcionalmente, o kit contém um polipeptídeo T2R funcional. Uma ampla variedade de kits e componentes podem ser preparados de acordo com a presente invenção, dependendo do usuário pretendido do kit e as necessidades particulares do usuário.

Tendo agora descrito de forma geral a invenção, a mesma será mais prontamente entendido pela referência dos seguintes exemplos, que são fornecidos por meio de ilustração e não pretendem ser limitantes. Fica entendido que várias

modificações e alterações podem ser feitas às modalidades exemplares descritas aqui sem fugir do espírito e escopo da invenção.

EXEMPLOS

5 **Exemplo 1**

hT2R8 e hT2R14 são ativados pela fração do café amargo

Uma fração amarga purificada parcialmente do café foi usada para peneirar os 25 T2Rs humanos em células HEK transfectadas transientemente como descrito nos pedidos de
10 patente anteriores. Em resumo (como discutido em mais detalhes na Publicação da Patente US. No. 2003/0170608, incorporada aqui por referência), as células renais embriônicas humanas que estavelmente expressam grandes antígenos da célula T e proteína G15 (HEK-G15) foram
15 transfectadas transientemente com um plamídeo de expressão de hT2R (e.g., pelo uso do fosfato Ca^{2+} ou pelo uso de sistemcomo um base de lipídeos). Adicionalmente, outras linhagens de célula HEK-G15 foram transfectadas transientemente com outros T2Rs humanos. Por conseguinte, o
20 ensaio a base de fluorescência foi usado para detectar modificações na concentração de cálcio nas células transfectadas transientemente. A interação dos compostos de teste com as células transfectadas deduz uma cascata de sinalização levando a ativação de PLC e um aumento
25 subsequente na concentração de cálcio intracelular resultando em um aumento da fluorescência que foi detectada usando uma tintura fluorescente sensível ao cálcio. Estas modificações foram monitoradas, por exemplo, usando a fluorescência microscópica e software projetado adequadamente (tal como
30 Imaging Workstation, Axon).

A fração de café tem alto nível de fluorescência, o que interferiu com o ensaio. Para superar a interferência, um número de tinturcomo umzuis foi testado para a habilidade de bloquear a fluorescência da fração de café. Como mostrado na
35 Fig. 1, a fração de café ativada por hT2R8 e hT2R14 no ensaio de imagem de cálcio usando células transfectadas

transientemente. A tintura azul usada no experimento da Fig. 1 é FD&C 1 a 1.9 mM. Alguns outros hT2Rs também pareceram estar ativados por esta fração de café. Com diferentes tinturcomo umzuis, diferentes combinações de hT2Rs são

5 activadas (Tabela 1). Entretanto, hT2R8 e hT2R14 são consistentemente escolhidos como responsivos à fração de café, e como umtvidades destes dois receptores são dependentes da dose da fração de café (Fig. 2). A tintura azul usada no experimento da Fig. 2 foi azul de tripano.

10 *Tabela 1 hT2Rs ativados pela fração de café com diferentes tinturcomo umzuis*

Tintura azul	Receptores hT2R Identificados	
	Ativado	Fracamente ativado
FD&C 1	8, 14	---
Tripano	1, 8, 14	10, 75
Coomassie	14	---

Usando este ensaio, encontrou-se que a adição da fração amarga do café às células que expressam hT2R8 e hT2R14 ativou as proteínas G intracelulares. Pelo contraste, usando o mesmo

15 ensaio, a fração amarga do café não ativou especificamente as células HEK-G15 que foram transfectadas transientemente com outros hT2Rs. Esta experiência suporta a conclusão de que os receptores hT2R8 e hT2R14 de gosto respondem especificamente a composto amargos presentes no café.

20 **Exemplo 2**

Identificação dos antagonistas de hT2R8 e hT2R14

Para identificar os antagonistas, as linhagens de célula que expressam estavelmente hT2R8 e hT2R14, respectivamente, junto com a proteína G16g44 quimérica promíscua foram geradas

25 como descrito nos pedidos de patente anteriores. Um ensaio de produção elevada foi estabelecido usando as linhagens de célula estáveis e FLIPR (Leitor de Placa de Imagem

Fluorescente). Um agonista hT2R8 ou hT2R14 foi usado para ativar os receptores até 70-80% de sua atividade máxima respectiva. Para hT2R8, o agonista usado foi andrografolídeo (200µM); para hT2R14, foi o ácido aristolóquico (3µM). Para identificar antagonistas, compostos com estruturas químicas diversas foram adicionados junto com o agonista. Compostos que causam redução significativa estatisticamente da atividade do receptor são agrupados, e reconfirmados com curvas de inibição dependente da dose. O Composto A e Composto B foram identificados como os antagonistas hT2R8 (Fig. 3). O Composto C foi identificados como os antagonistas hT2R14 (Fig. 4).

Exemplo 2a

Combinações dos antagonistas hT2R8 e hT2R14 reduzem o gosto amargo do café

Os testes de gosto foram executados com as combinações de antagonistas hT2R8 e hT2R14 na fração de café e em dois tipos de café instantâneo (torrado médio e torrado meio-escuro), usando um método de escolha aforçado lternativo- 2 com um júri de gosto de 4-5 membros de um júri. Como ummostras de café com os antagonistas foram dadcomo umos membros de um júri de gosto junto com a mesma amostra sem antagonistas, pediu-se que os membros de um júri identificassem a amostra mais amarga dentro do par. Como mostrado na Tabela 2, os membros de um júri identificaram consistentemente como ummostras da fração de café sem antagonistas como sendo mais amargas do que as com os antagonistas, indicando que os antagonistas reduziram o gosto amargo da fração de café. Similarmente, como mostrado na Tabela 3, os antagonistas reduziram o gosto amargo de ambos os tipos de café instantâneo.

Como demonstrado pelos testes de gosto deste exemplo, a percepção da amargura nas composições (por exemplo, alimentos, bebidas e/ou medicamento) que exibem gosto amargo pode ser reduzida ou eliminada pela incorporação dos antagonistas de hT2R8 e/ou de hT2R14 em tais composições.

Para determinar a contribuição de um antagonista individual, os testes de gosto foram executados com o café instantâneo meio torrado com o Composto C. Como mostrado na Tabela 4, o antagonista hT2R14 (Composto C) é suficiente por si só para reduzir o gosto amargo no café deste exemplo.

5

Tabela 2 Resultados do teste de gosto com fração de café e 2 combinações diferentes de antagonistas

Teste	Antagonista		Concentração (µM)	Selecionado como mais amargo		Valor de P
	hT2R8	hT2R14		Sem Antagonistas	Com Antagonistas	
1	Cmp A	Cmp C	30	32	0	<0.001
2	Cmp B	Cmp C	30	15	1	0.001
3	Cmp A	Cmp C	10	16	0	<0.001

Tabela 3 Resultados do teste de gosto com 2 tipos de café instantâneo

Café instantâneo	Antagonistas		Concentração (µM)	Selecionado como mais amargo		Valor de P
	hT2R8	hT2R14		Sem Antagonistas	Mais Antagonistas	
Meio	Cmp A	Cmp C	30	16	0	<0.001
Meio escuro	Cmp A	Cmp C	30	13	3	0.021

5 *Tabela 4 Resultados do teste de gosto com café médio torrado e o antagonista individual*

Teste de gosto	Antagonista	Concentração (µM)	Selecionado como mais amargo		Valor de P
			Sem Antagonista	Com Antagonista	
1	Composto C	50	18	2	<0.001
2	Composto C	25	19	1	<0.001

Exemplo 3

Composto C é um Antagonista do Receptor de sabor amargo Agindo Amplamente

10 O exemplo 2 acima ensina que Composto C é um antagonista humano T2R identificado por ensaios de peneiramento de alta produção usando hT2R14. Experiências como um condicionais revelam

que Composto C é um antagonista amplamente ajustado para 13 T2Rs humanos e a um grau inferior antagoniza outros seis T2Rs humanos. Além disso, este composto em testes de gosto bloqueia a intensidade do gosto amargo obtido por um número de substâncias com um amargor diversas.

Especificamente, a fim de avaliar a seletividade inibitória do composto Composto C, este composto foi testado contra 22 T2Rs humanos que foram desmamados por *Senomyx*. Estes receptores e os ligantes amargos que ativam estes T2Rs humanos são relatados em pedidos de patente anteriores que são incorporados por referência aqui. Estes 22 T2Rs humanos são hT2R1, 3, 4, 5, 7, 8, 9, 10, 13, 14, 16, 44, 51, 54, 55, 61, 63, 64, 65, 67, 71 e 75. O aminoácido e as sequências de ácidos nucleicos de todos estes T2Rs podem ser encontrados nestes pedidos de patente anteriores. Estes T2Rs humanos foram cada um individualmente transfectados transientemente em células HEK293 que expressam estávelmente a proteína G promíscua G16g44 e os ensaios funcionais foram efetuados usando estes receptores como divulgado nestes mesmos pedidos de patente. Nestas experiências cada receptor foi ativado por um de seus ligantes selecionados das moléculas com um amargor demonstradas previamente para ativar o T2R particular. Os ligantes foram usados a níveis de concentração EC80. A lista de ligantes amargos utilizada e as concentrações do ligante testadas são contidas na Tabela 5 deste exemplo.

Além disso, a fim de confirmar a atividade *in vitro* deste composto no ensaio do receptor, os inventores executaram o teste de gosto de comparação pareada para determinar o efeito do composto *in vivo*. Pediu-se que os membros de um júri de gosto provassem substâncias com um amargor com e sem o Composto C, e identificassem qual amostra de prova é mais amarga. Os pares múltiplos foram provados por cada membro de um júri para aumentar o tamanho da amostra, e os resultados foram analisados usando métodos estatísticos apropriados. A ordem das amostras com e sem o Composto C foram escolhidas aleatoriamente e contra balanceadas.

A fim de estabelecer as propriedades antagônicas como umplasm deste composto, este foi testado para sua habilidade de bloquear o gosto amargo obtido por uma variedade de ligantes amargos assim como o gosto amargo obtido pelos
5 ligantes amargos conhecidos por ativar os vários receptores de gosto amargo e os ligantes amargos que ainda não foram demonstrados para ativar um hT2R específico. Diversas moléculas como umplasm conhecidas por ativar os receptores amargos foram testadas para que a ativação seja inibida pelo
10 Composto C. Especificamente, a salicina é uma molécula amarga que ativa hT2R16, e os resultados do teste de gosto mostraram que o Composto C a 40 µM pode reduzir seu gosto amargo. A feniltiourea é uma molécula amarga que ativa hT2R51, e o Composto C reduziu seu gosto amargo em 25µM.

15 Diversas moléculas como umplasm que podem ativar T2Rs múltiplos foram testadas similarmente com o Composto C. Ativação dos receptores amargos para algumas destas moléculas foi inibida parcialmente pelo Composto C. O omeprazol é uma molécula amarga que ativa hT2R10, 14 e 75. Apesar de que esse
20 seu gosto amargo pode envolver múltiplos receptores amargos, seu gosto amargo também foi apreciavelmente reduzido pelo Composto C. O rebaudiosídeo A é um edulcorante natural com gosto amargo forte, que ativa pelo menos 7 T2Rs humanos. Seu gosto amargo também é reduzido pelo Composto C.

25 Além disso, o composto C inibiu o gosto amargo para alguns compostos onde o(s) receptor(es) com os quais interação é desconhecido, como o dextrometorfano e o difenidramina. O efeito do Composto C nestes compostos foi testado e descobriu-se que seu gosto amargo também foi
30 reduzido.

Em relação ao antecedente, a Figura 5 contém resultados experimentais onde o Composto C foi testado com compostos agonista diferentes. A atividade de inibição é representada pela redução da atividade do receptor na presença do Composto
35 C. A Figura 5 revela que 13 hT2Rs diferentes foram significativamente (maior que 30%) inibidos pelo Composto C.

Estes 13 hT2Rs são hT2R3, 7, 10, 14, 16, 44, 51, 55, 61, 63, 64, 65, e 71. Outros seis receptores, incluindo hT2R5, 9, 13, 54, 67 e 75 também foram inibidos, embora em um grau inferior.

5 *Tabela 5 Lista de ligantes e das concentrações usados para cada T2R testado.*

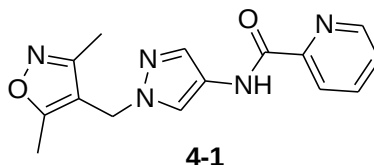
hT2Rs	Agonista	Concentração
1	Ácido Pírico	0.05mM
3	Cloroquina pH6.5	50µM
4		5mM
5	Picolina	10mM
7	Cloroquina pH6.5	10mM
8		0.5mM
9	Ofloxacina	1mM
10	Estricnina	50µM
13	Oxifenônio	1mM
14	Ácido aristolóquico	2µM
16	Salicina	1mM
44	Denatônio	0.5µM
51	Prop	2.5µM
54	Ranitidina	5mM
55	Cinconina	150µM
61	Ácido aristolóquico	25nM
63	Cafeína	1mM
63	Andrografolideo	100µM
64	Ácido aristolóquico	1µM
65	Oleuropeína	1mM
67	Andrografolideo	5µM
71	Ácido Pírico	10µM
75	Estricnina	1µM

10

Exemplo 4**Antagonistas hT2R8 Fabricando os Compostos da invenção**

Compostos exemplares de acordo com a invenção são sintetizados como segue.

Exemplo 4-1: N-(1-((3,5-dimetilisoxazol-4-il)metil)-1H-pirazol-4-il)picolinamida.



Cloridrato de 1-((3,5-dimetilisoxazol-4-il)metil)-1H-pirazol-4-amina (exemplo 4-1a) (400 mg, 2.1 mmol), ácido picolínico (256 mg, 2.1 mmol), e HOBT (388 mg, 2.50 mmol) foram misturados em DCM (7 mL). A reação foi tratada com trietilamina (670 mL, mmol 4.8) e agitada por 15 minutos a temperatura ambiente sob uma atmosfera de nitrogênio. O EDC (598 mg, mmol 3.1) foi adicionado e a reação foi agitada por mais 4 horas. A reação então foi diluída com o diclorometano (5 mL) e lavada com solução NaHCO₃ saturada aquosa (5 mL, 2x) e então com solução de NaCl saturada aquosa (5 mL). A camada orgânica foi coletada, seca e filtrada. Os solventes foram removidos a vácuo. O produto cru foi ressuspensão em EtOH (5 mL) e purificado pela HPLC de fase reversa (5%-95% de ACN em H₂O: gradiente de 25 minutos). As frações puras foram combinadas e concentradas para produzir N-(1-((3,5-dimetilisoxazol-4-il)metil)-1H-pirazol-4-il)picolinamida (372 mg, 60%) como um sólido branco. ¹H NMR (CDCl₃, 400 MHz): δ 2.21 (s, 3H), 2.44 (s, 3H), 5.05 (s, 2H), 7.49-7.47 (m, 1H), 7.59 (s, 1H), 7.93-7.88 (dt, J= 14, 2 Hz, 1H), 8.07 (s, 1H), 8.24-8.21 (d, J= 8 Hz, 1H), 8.61-8.56 (m, 1H), 9.83 (bs, 1H). LC/MS; [M+H] calculado para C₁₅H₁₅N₅O₂; previsto 297.1; encontrado 298.3. Ponto de derretimento: 135-137°C.

O Composto teve um IC₅₀ no receptor de sabor amargo de hT2R8 de 0.57 μM

Exemplo 4-1a Cloridrato de 1-((3,5-dimetilisoxazol-4-il)metil)-1H-pirazol-4-amina

Tert-butil 1-((3,5-dimetilisoxazol-4-il)metil)-1H-pirazol-4-ilcarbamato (exemplo 4-1b) (592 mg, 2 mmol) foi agitado em uma solução de 4N HCl em dioxano (20 mL) a temperatura ambiente por 2 horas. O solvente foi removido sob pressão reduzida e o resíduo foi pego em uma mistura de 1/1 de acetado de etila/hexanos (30 mL) e concentrado (duas vezes). O sólido foi triturado com hexanos e coletado pela filtragem fornecendo cloridrato de 1-((3,5-dimetilisoxazol-4-il)metil)-1H-pirazol-4-amina (500 mg, 99%) como um sólido branco. ¹H NMR (DMSO-d₆, 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).

Exemplo 4-1b tert-butil 1-((3,5-dimetilisoxazol-4-il)metil)-1H-pirazol-4-ilcarbamato

3,5-dimetil-4-((4-nitro-1H-pirazol-1-il)metil)isoxazol (Exemplo 4-1c) (14.6 g, 66 mmol), Anidrido Boc, e 10% Pd/C (3.8g) foi agitado em MeOH (400 mL) sob 1 atmosfera de H₂ por 16 horas a temperatura ambiente. A mistura foi filtrada e a solução foi removida sob pressão reduzida. O resíduo foi purificado pela cromatografia em sílica gel (20% acetado de etila em hexanos) para produzir tert-butil 1-((3,5-dimetilisoxazol-4-il)metil)-1H-pirazol-4-ilcarbamato (12.7 g, 66%) como um sólido rosa claro. ¹H NMR (CDCl₃, 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⁺).

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

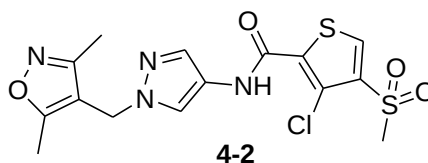
Ao 4-nitro-1H-pirazol (Exemplo 4-1d) (3.8 g, 34 mmol) em DMF (80 mL) resfriado a 0 °C, através de um banho de gelo/água, foi adicionado t-BuOK (4.2 g, 38 mmol). Após a adição da base o banho de gelo foi removido e a mistura foi agitada por 30 minutos seguido pela adição de 4-(clorometil)-3,5-dimetilisoxazol (5 g, 34 mmol). A reação foi refluxada por 16 horas depois resfriada a temperatura ambiente. H₂O foi adicionada à mistura da reação e o precipitado formado foi coletado por filtragem. O precipitado foi lavado com H₂O

adicional depois seco sob alto vácuo para produzir 3,5-dimetil-4-((4-nitro-1H-pirazol-1-il)metil)isoxazol (5.8 g, 78%) como um sólido amarelo claro. ^1H NMR (CDCl_3 , 400 MHz): δ 2.23 (s, 3H), 2.46 (s, 3H), 5.08 (s, 2H), 8.02 (s, 1H), 8.08 (s, 1H).

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

Pirazol (10 g, 147 mmol), foi adicionado ao ácido sulfúrico concentrado (100 mL), em porções, enquanto mantendo a temperatura interna da reação abaixo de 50 °C através de um banho de água gelo. Ácido nítrico concentrado (10 mL) foi então adicionado, gota a gota, mantendo a temperatura interna da reação abaixo de 50 °C através de um banho de água gelo. O banho de água gelo foi removido e a reação foi aquecida a 60 °C e agitada por 4 horas. A reação foi resfriada através de um banho de água gelo e feita básica, para ~ pH 8, com 18 N aquoso de solução de NaOH (150 mL). O produto, que precipitou como um sólido branco, foi coletado por filtragem, lavado com H_2O , e seco sob alto vácuo para produzir 4-nitro-1H-pirazol (7g, 42%) como um sólido branco. ^{13}C NMR (100 MHz, CDCl_3): δ 126.4, 137.0.

Exemplo 4-2: 3-cloro-N-(1-((3,5-dimetilisoxazol-4-il)metil)-1H-pirazol-4-il)-4-(metilsulfonil)tiofeno-2-carboxamida

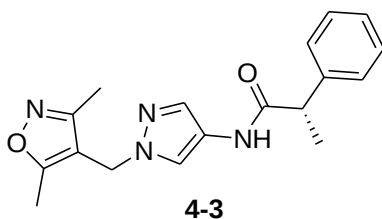


A uma mistura em agitação de cloridrato de ((3,5-dimetilisoxazol-4-il)metil)-1H-pirazol-4-amina (Exemplo 4-1a) (500 mg, 2 mmol) em DCM (20 mL), resfriado a 0 °C através de um banho de água gelo, foi adicionada trietilamina (600 mg, 6 mmol). A mistura foi agitada até que todos os sólidos estivessem na solução (~10 minutos). Cloreto de 3-cloro-4-(metilsulfonil)tiofeno-2-carbonil (543 mg, 2.1 mmol), em 2 mL CH_3CN , foi adicionado por seringa a uma amina livre a 0 °C. O

banho de gelo foi removido e a mistura foi agitada por 2 horas. A reação foi diluída com diclorometano (100 mL) e a fase orgânica foi lavada com H₂O (200 mL). A camada orgânica foi seca sobre sulfato de sódio, filtrada e concentrada sob pressão reduzida. O sólido foi triturado com acetado de etila/hexanos (1/5) para produzir 3-cloro-N-(1-((3,5-dimetilisoxazol-4-il)metil)-1H-pirazol-4-il)-4 (metilsulfonil)tiofeno-2-carboxamida (375 mg, 45%) como um sólido branco. ¹H NMR (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. Ponto de Fusão: 202-204°C.

O composto teve um IC₅₀ no receptor de sabor amargo hT2R8 de 2.09 µM.

Exemplo 4-3: (S)-N-(1-((3,5-dimetilisoxazol-4-il)metil)-1H-pirazol-4-il)-2-fenilpropanamida

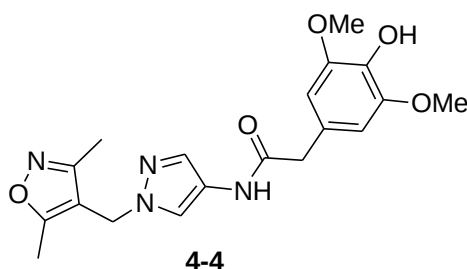


Cloridrato de 1-((3,5-dimetilisoxazol-4-il)metil)-1H-pirazol-4-amina (Exemplo 4-1a) (200mg, 1 mmol), ácido (S)-2-fenil propiônico (156 mg, 1 mmol), e PyBop (650 mg, 1.3 mmol) foram adicionados a DMF (4 mL) seguido pela trietilamina (0.3 mL, 2.1 mmol). A reação agitada por 4 horas a temperatura ambiente sob uma atmosfera de nitrogênio depois diluída com acetado de etila (20 mL), lavada com solução de NaHCO₃ aquosa saturada (2 x 15 mL) seguido pela solução de NaCl aquosa saturada (15 mL). A fase orgânica foi seca, filtrada e concentrada no rotovapor. O produto cru foi ressuspenso em metanol (3 mL) e purificado pela HPLC de fase reversa (5% - 95% ACN em H₂O: 25 gradiente de minuto). As frações containing o produto bruto foram concentradas para produzir (S)-N-(1-((3,5-dimetilisoxazol-4-il)metil)-1H-pirazol-4-il)-

2-fenilpropanamida (200 mg, 60%) como um sólido branco. ^1H NMR (400 MHz, $\text{DMSO}-d_6$) 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). Ponto de Fusão $108^\circ\text{C} - 110^\circ\text{C}$.

O composto teve um IC_{50} no receptor de sabor amargo hT2R8 de $0.41 \mu\text{M}$

Exemplo 4-4 : N-(1-((3,5-dimetilisoxazol-4-il)metil)-1H-pirazol-4-il)-2-(4-hidroxi-3,5-dimetoxifenil)acetamida.



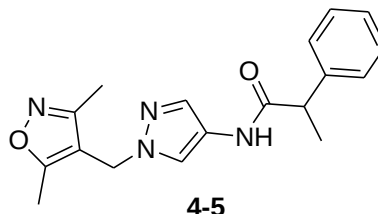
10

Cloridrato de 1-((3,5-dimetilisoxazol-4-il)metil)-1H-pirazol-4-amina (Exemplo 4-1a) (376 mg, 1.7 mmol), ácido 2-(4-hidroxi-3,5-dimetoxifenil)acético (350 mg, 1.7 mmol), PyBop (1 g, 2 mmol) e trietilamina (605 mg, 6 mmol) foram agitados juntos em DMF (10 mL) a temperatura ambiente por 2 horas. A mistura da reação foi diluída com 1N HCl aquoso (100 mL) e extraída com DCM (3x, 75 mL). Os extratos orgânicos combinados foram secos sobre sulfato de sódio, filtrados e concentrados no rotovapor. O resíduo foi purificado pela cromatografia em sílica gel (30% acetado de etila em hexanos) para produzir N-(1-((3,5-dimetilisoxazol-4-il)metil)-1H-pirazol-4-il)-2-(4-hidroxi-3,5-dimetoxifenil)acetamida (189 mg, 29%) como um sólido branco. ^1H NMR (CDCl_3 , 400 MHz) δ 2.10 (s, 3H), 2.36 (s, 3H), 3.40 (s, 2H), 3.70 (s, 6H), 5.07 (s, 2H), 6.53 (s, 2H), 7.39 (s, 1H), 7.92 (s, 1H), 8.18 (s, 1H), 10.03 (s, 1H). LC/MS; [M+H] calculado para $\text{C}_{19}\text{H}_{22}\text{N}_4\text{O}_5$; esperado 387.16; encontrado 387.6. Ponto de Fusão: $187-188^\circ\text{C}$.

25

O composto teve um IC_{50} no receptor de sabor amargo hT2R8 de $0.46 \mu\text{M}$

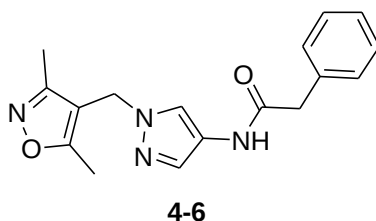
Exemplo 4-5: N-(1-((3,5-dimetilisoxazol-4-il)metil)-1H-pirazol-4-il)-2-fenilpropanamida.



Cloridrato de 1-((3,5-dimetilisoxazol-4-il)metil)-1H-pirazol-4-amina (Exemplo 4-1a) (300 mg, 1.3 mmol), ácido 2-fenilpropanóico (225 mg, 1.5 mmol), trietilamina (300 mg, 3 mmol), DMAP (61 mg, 0.5 mmol), e EDC (386 mg, 2 mmol) foram agitados juntos em DCM (10 mL) a temperatura ambiente por 4 horas. A mistura da reação foi diluída com 1N HCl aquoso (100 mL) e extraída com DCM (3x, 75 mL). Os extratos orgânicos combinados foram secos sobre sulfato de sódio, filtrados e concentrados no rotovapor. O resíduo foi purificado pela cromatografia em sílica gel (30% acetado de etila em hexanos) para produzir N-(1-((3,5-dimetilisoxazol-4-il)metil)-1H-pirazol-4-il)-2-fenilpropanamida (272 mg, 81%) como um sólido branco.¹H NMR (CDCl₃, 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; [M+H] calculado para C₁₈H₂₀N₄O₂; esperado 325.16; encontrado 325.5. Ponto de Fusão: 129-130°C.

O composto teve um IC₅₀ no receptor de sabor amargo hT2R8 de 0.32 µM

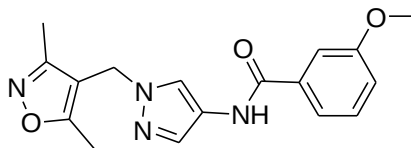
Exemplo 4-6: N-(1-((3,5-dimetilisoxazol-4-il)metil)-1H-pirazol-4-il)-2-fenilacetamida.



Sal de cloridrato de 1-((3,5-dimetilisoxazol-4-il)metil)-1H-pirazol-4-amina (Exemplo 4-1a) (230 mg, 1 mmol) e trietilamina (300 mg, 3 mmol) foram agitados em DCM (10 mL) resfriados a 0 °C através de um banho de gelo/água. Cloreto de 2-fenilacetil (184 mg, 1.3 mmol) foi adicionado gota a gota à mistura da reação em agitação. Quando a adição foi completada o banho de gelo foi removido e a reação foi agitada por 1 hora. A mistura foi diluída com DCM (50 mL), lavada com 1N aquoso HCl (100 mL), seguido por 1N aquoso de NaOH (100 mL) e então H₂O (100 mL). Os extratos orgânicos combinados foram secos sobre sulfato de sódio, filtrados e o solvente foi removido no rotovapor. O resíduo resultante foi purificado pela cromatografia em sílica gel (50% acetado de etila em hexanos) para produzir 210 mg do produto sólido que foi triturado em acetado de etila/hexanos (1/9) para produzir N-(1-((3,5-dimetilisoxazol-4-il)metil)-1H-pirazol-4-il)-2-fenilacetamida (188 mg, 68%) como um sólido branco. ¹H NMR (CDCl₃, 400 MHz): δ 2.15 (s, 3H), 2.38 (s, 3H), 3.69 (s, 2H), 4.97 (s, 2H), 7.15 b(s, 1H), 7.40-7.27 (m, 6H), 7.84 (s, 1H). LC/MS ; [M+H] calculado para C₁₇H₁₈N₄O₂; esperado 311.14; encontrado 311.40. Ponto de Fusão: 106-108 °C.

O composto teve um IC₅₀ no receptor de sabor amargo hT2R8 de 0.53 µM

Exemplo 4-7: N-(1-((3,5-dimetilisoxazol-4-il)metil)-1H-pirazol-4-il)-3-metoxibenzamida.



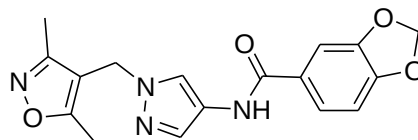
4-7

Cloridrato de 1-((3,5-dimetilisoxazol-4-il)metil)-1H-pirazol-4-amina (Exemplo 4-1a) (300 mg, 1.3 mmol), ácido 3-metoxibenzoico (172 mg, 1.3 mmol), EDC (386 mg, 2 mmol), e trietil amina (303 mg, 3 mmol) foram agitados em DCM (5 mL) a temperatura ambiente por 6 horas. A reação foi diluída com DCM (50 mL) e a fase orgânica foi lavada com 0.1 N HCL aquoso

(150 mL) seguido pelo 1N NaOH aquoso (150 mL). A camada orgânica foi seca sobre sulfato de sódio, filtrada e concentrada no rotovapor. O produto cru foi purificado pela cromatografia em sílica gel (40% acetado de etila em hexanos) para produzir 225 mg d um sólido esbranquiçado. O sólido foi triturado com acetado de etila/hexanos (1/9) e o sólido branco foi coletado por filtragem. O produto bruto foi dissolvido em etanol absoluto e concentrado no rotovapor (4x, 25 mL) para produzir N-(1-((3,5-dimetilisoxazol-4-il)metil)-1H-pirazol-4-il)-3-metoxibenzamida (185 mg, 43%) como um sólido branco. ¹H NMR (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] calculado para C₁₇H₁₈N₄O₃; esperado 327.14; encontrado 327.30. Ponto de Fusão: 127-129 °C.

O composto teve um IC₅₀ no receptor de sabor amargo hT2R8 de 0.39 µM

Exemplo 4-8: N-(1-((3,5-dimetilisoxazol-4-il)metil)-1H-pirazol-4-il)benzo[d][1,3]dioxol-5-carboxamida



4-8

20

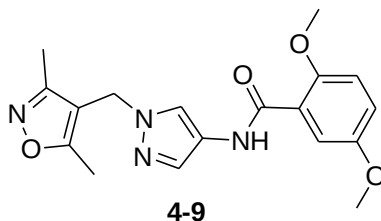
Cloridrato de 1-((3,5-dimetilisoxazol-4-il)metil)-1H-pirazol-4-amina (Exemplo 1a) (8 mg, 35 µmol) e ácido benzo[d][1,3]dioxol-5-carboxílico (7 mg, 42 µmol) foram cada um dissolvido em 200 uL dimetilformamida. A resina de Si-carbodiimida (70 mg, 70 µmol) foi carregada em uma placa Greiner de 96 poços de 1.2 mL, seguida pela adição de amina e ácido. Hidroxibenzotriazol (6 mg, 42 µmol) foi dissolvido em 100 uL dimetilformamida e foi adicionado no poço de reação. A reação foi agitada durante a noite a temperatura ambiente. Para remove o excesso de ácido carboxílico e hidroxibenzotriazol, a resina de PS-Trisamina (35 mg, 70 µmol) foi adicionada na mistura da reação e foi permitida a

30

ser agitada durante a noite a temperatura ambiente. 200 uL de acetonitrila foi adicionado no poço de reação e agitado por 1 minuto. A solução clara superior foi transferida para uma nova placa. O processo de extração foi repetido mais duas
 5 vezes. A solução foi evaporada sob vácuo e produziu o produto desejado. Rendimento 6%. MS M+H calculado 341.1, encontrado 341.2.

O composto teve um IC_{50} no receptor de sabor amargo hT2R8 de 0.2 μ M

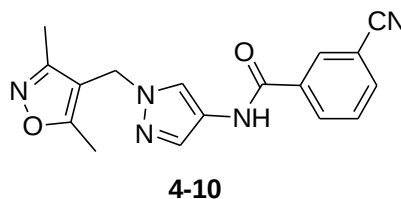
10 **Exemplo 4-9: N-(1-((3,5-dimetilisoxazol-4-il)metil)-1H-pirazol-4-il)-2,5-dimetoxibenzamida**



Preparado como no Exemplo 4-8 a partir do ácido 2,5-dimetoxibenzoico e cloridrato de 1-((3,5-dimetilisoxazol-4-il)metil)-1H-pirazol-4-amina (Exemplo 4-1a). Rendimento 13%.
 15 MS M+H calculado 357.5, encontrado 357.3.

O composto teve um IC_{50} no receptor de sabor amargo hT2R8 de 0.17 μ M

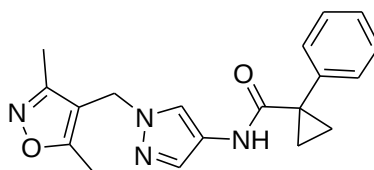
20 **Exemplo 4-10: 3-ciano-N-(1-((3,5-dimetilisoxazol-4-il)metil)-1H-pirazol-4-il)benzamida**



Preparado como no Exemplo 4-8 a partir do ácido 3-cianobenzoico e cloridrato de 1-((3,5-dimetilisoxazol-4-il)metil)-1H-pirazol-4-amina (Exemplo 4-1a). Rendimento 15%.
 25 MS M+H calculado 322.6, encontrado 322.3.

O composto teve um IC_{50} no receptor de sabor amargo hT2R8 de 0.2 μ M

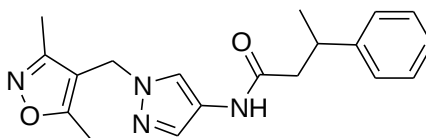
Exemplo 4-11: N-(1-((3,5-dimetilisoxazol-4-il)metil)-1H-pirazol-4-il)-1-fenilciclopropanecarboxamida

**4-11**

Preparado como no Exemplo 4-8 a partir do ácido 1-fenilciclopropanocarboxílico e cloridrato de 1-((3,5-dimetilisoxazol-4-il)metil)-1H-pirazol-4-amina (Exemplo 4-1a). Rendimento 6%. MS M+H calculado 337.6, encontrado 337.5.

O composto teve um IC₅₀ no receptor de sabor amargo hT2R8 de 0.25 µM

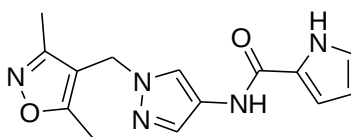
Exemplo 4-12: N-(1-((3,5-dimetilisoxazol-4-il)metil)-1H-pirazol-4-il)-3-fenilbutanamida

**4-12**

Preparado como no Exemplo 4-8 a partir de ácido 3-fenilbutanóico e cloridrato de 1-((3,5-dimetilisoxazol-4-il)metil)-1H-pirazol-4-amina (Exemplo 4-1a). Rendimento 6%. MS M+H calculado 339.6, encontrado 339.5.

O composto teve um IC₅₀ no receptor de sabor amargo hT2R8 de 0.28 µM

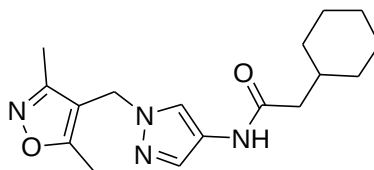
Exemplo 4-13: N-(1-((3,5-dimetilisoxazol-4-il)metil)-1H-pirazol-4-il)-1H-pirrol-2-carboxamida

**4-13**

Preparado como no Exemplo 4-8 a partir de ácido 1H-pirrol-2-carboxílico e cloridrato 1-((3,5-dimetilisoxazol-4-il)metil)-1H-pirazol-4-amina (Exemplo 4-1a). Rendimento 18%. MS M+H calculado 286.6, encontrado 286.3.

O composto teve um IC₅₀ no receptor de sabor amargo hT2R8 de 0.57 µM

Exemplo 4-14: 2-ciclohexil-N-(1-((3,5-dimetilisoxazol-4-il)metil)-1H-pirazol-4-il)acetamida

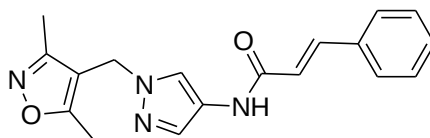


4-14

Preparado como no Exemplo 4-8 a partir do ácido 2-ciclohexilacético e cloridrato de 1-((3,5-dimetilisoxazol-4-il)metil)-1H-pirazol-4-amina (Exemplo 4-1a). Rendimento 17%. MS M+H calculado 317.6, encontrado 317.4.

O composto teve um IC₅₀ no receptor de sabor amargo hT2R8 de 0.73 µM

Exemplo 4-15: N-(1-((3,5-dimetilisoxazol-4-il)metil)-1H-pirazol-4-il)cinamamida

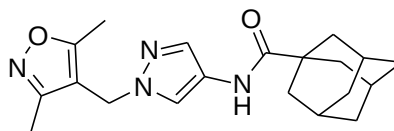


4-15

Preparado como no Exemplo 4-8 a partir do ácido cinâmico e cloridrato de 1-((3,5-dimetilisoxazol-4-il)metil)-1H-pirazol-4-amina (Exemplo 4-1a). Rendimento 4%. MS M+H calculado 322.6, encontrado 322.4.

O composto teve um IC₅₀ no receptor de sabor amargo hT2R8 de 0.7 µM

Exemplo 4-16: N-(1-((3,5-dimetilisoxazol-4-il)metil)-1H-pirazol-4-il) adamantano.



4-16

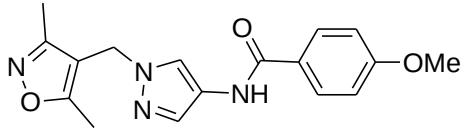
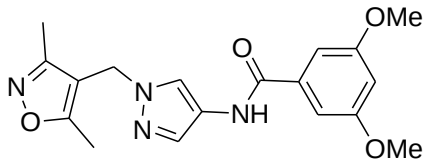
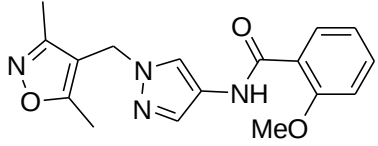
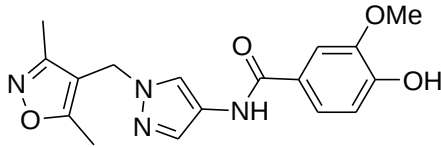
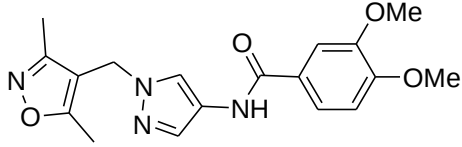
Cloridrato de 1-((3,5-dimetilisoxazol-4-il)metil)-1H-pirazol-4-amina (300 mg, 1.56 mmol), ácido adamantano-1-carboxílico (281 mg, 1.56 mmol), PyBop (972 mg, 1.87 mmol), e trietilamina (.438 mL, 3.12 mmol) foram misturados em DMF (5 mL). A reação agitada a temperatura ambiente por 4 horas sob uma atmosfera de nitrogênio. A reação foi diluída com acetado

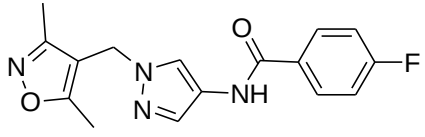
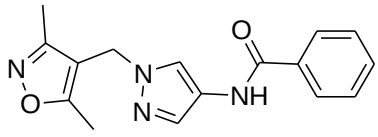
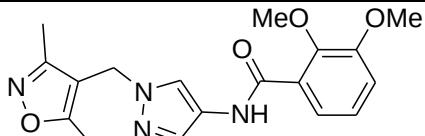
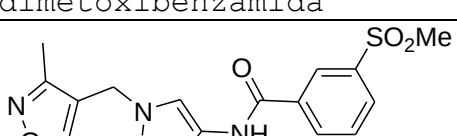
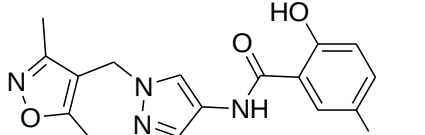
de etila (4 mL) e lavada com solução de NaHCO₃ saturada (2x, 3 mL) e depois com solução de NaCl saturada (3 mL). A camada orgânica foi extraída, seca, e filtrada. Os solventes foram removidos sob vácuo. O produto cru foi ressuspenso em metanol (4 mL) e purificado por HPLC. O produto bruto foi redissolvido em etanol e concentrado sob vácuo (3 x 3 mL) para produzir N-(1-((3,5-dimetilisoxazol-4-il)metil)-1H-pirazol-4-il) adamantano como um sólido branco em 60% Rendimento. ¹H NMR (400 MHz, CDCl₃): 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). Ponto de Fusão 167-169 °C.

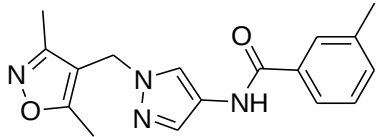
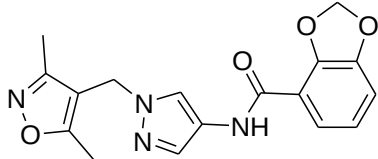
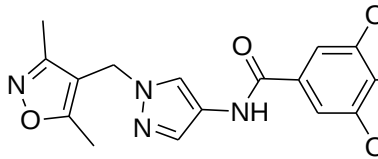
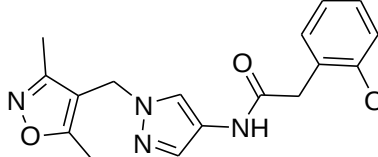
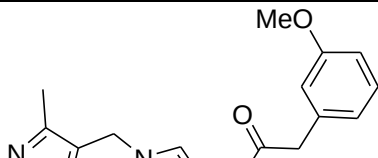
O composto teve um IC₅₀ no receptor de sabor amargo hT2R8 de 0.88 µM

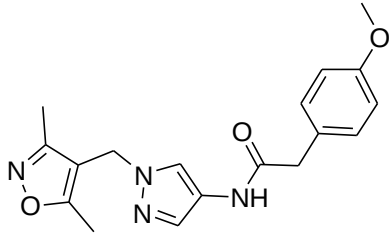
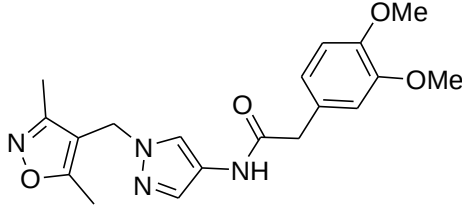
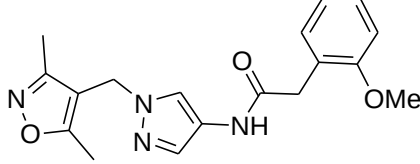
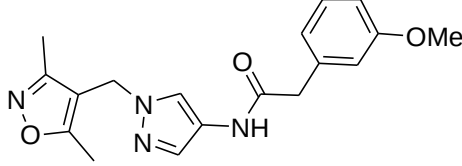
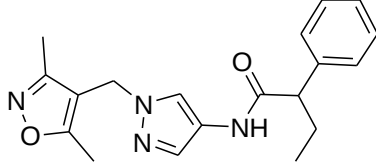
Compostos adicionais foram sintetizados seguindo procedimentos similares aos descritos nos Exemplos 4-1 a 4-16 e experimentalmente testados e encontrados por ter um nível relativamente alto de eficácia como inibidores do receptor de sabor amargo hT2R8. Os resultados deste teste são mostrados abaixo na Tabela A.

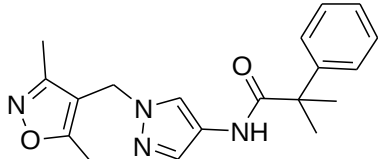
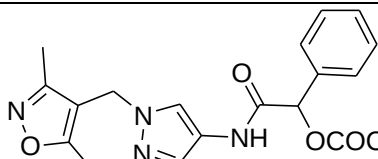
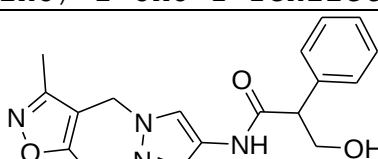
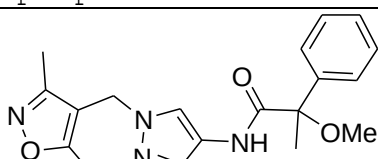
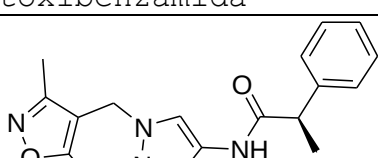
Tabela A

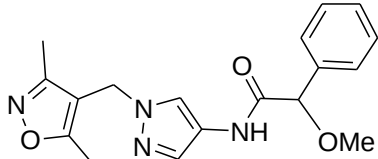
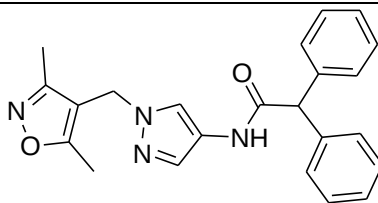
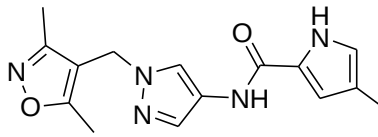
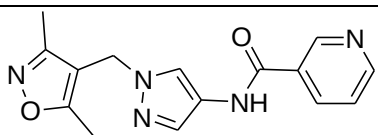
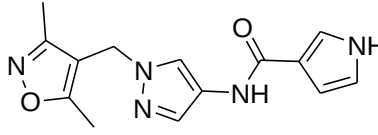
Composto No.	Composto	IC ₅₀ de hT2R8 (μM)
4-17	 N-(1-((3,5-dimetilisoxazol-4-il)metil)-1H-pirazol-4-il)-4-metoxibenzamida	0.26
4-18	 N-(1-((3,5-dimetilisoxazol-4-il)metil)-1H-pirazol-4-il)-3,5-dimetoxibenzamida	0.28
4-19	 N-(1-((3,5-dimetilisoxazol-4-il)metil)-1H-pirazol-4-il)-2-metoxibenzamida	0.39
4-20	 N-(1-((3,5-dimetilisoxazol-4-il)metil)-1H-pirazol-4-il)-4-hidroxi-3-metoxibenzamida	0.48
4-21	 N-(1-((3,5-dimetilisoxazol-4-il)metil)-1H-pirazol-4-il)-3,4-dimetoxibenzamida	0.56

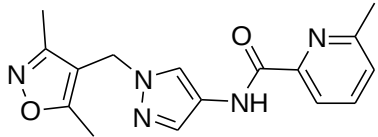
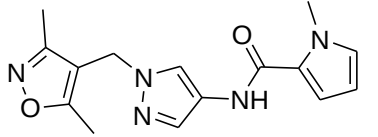
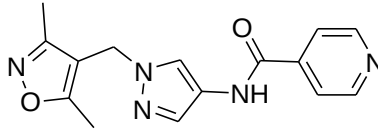
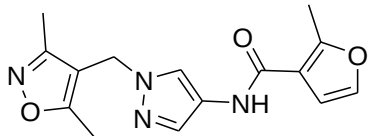
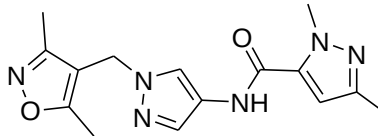
Composto No.	Composto	IC ₅₀ de hT2R8 (μM)
4-23	 N-(1-((3,5-dimetilisoxazol-4-il)metil)-1H-pirazol-4-il)-4-fluorobenzamida	1.56
4-24	 N-(1-((3,5-dimetilisoxazol-4-il)metil)-1H-pirazol-4-il)benzamida	2.62
4-25	 N-(1-((3,5-dimetilisoxazol-4-il)metil)-1H-pirazol-4-il)-2,3-dimetoxibenzamida	0.61
4-26	 N-(1-((3,5-dimetilisoxazol-4-il)metil)-1H-pirazol-4-il)-3-(metilsulfonil)benzamida	0.72
4-27	 N-(1-((3,5-dimetilisoxazol-4-il)metil)-1H-pirazol-4-il)-2-hidroxi-5-metoxibenzamida	0.98

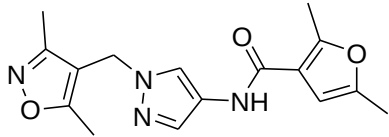
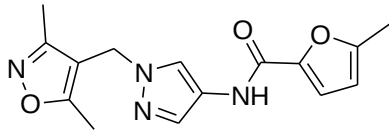
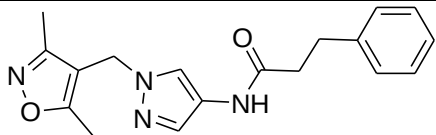
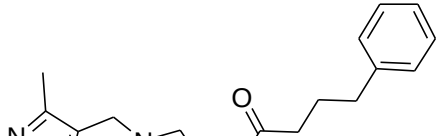
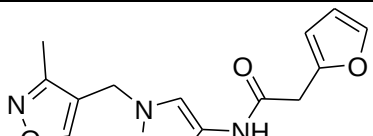
Composto No.	Composto	IC ₅₀ de hT2R8 (μM)
4-28	 N-(1-((3,5-dimetilisoxazol-4-il)metil)-1H-pirazol-4-il)-3-metilbenzamida	0.57
4-29	 N-(1-((3,5-dimetilisoxazol-4-il)metil)-1H-pirazol-4-il)-2-metoxibenzamida	0.30
4-30	 N-(1-((3,5-dimetilisoxazol-4-il)metil)-1H-pirazol-4-il)-2-metoxibenzamida	0.39
4-31	 2-(2,3-dimetoxifenil)-N-(1-((3,5-dimetilisoxazol-4-il)metil)-1H-pirazol-4-il)acetamida	0.80
4-32	 2-(3,5-dimetoxifenil)-N-(1-((3,5-dimetilisoxazol-4-il)metil)-1H-pirazol-4-il)acetamida	0.96

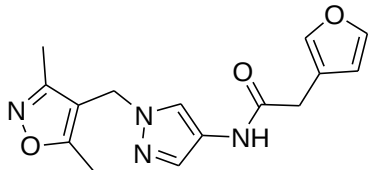
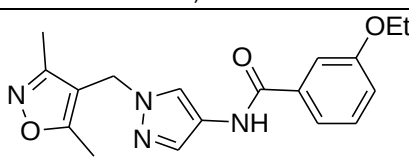
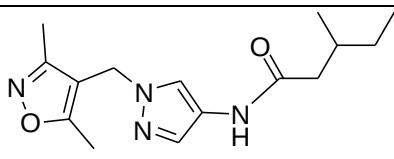
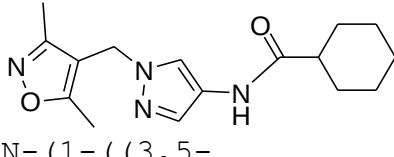
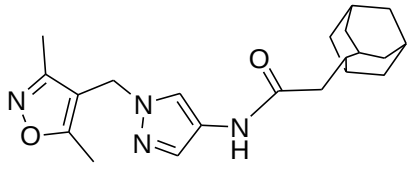
Composto No.	Composto	IC ₅₀ de hT2R8 (μM)
4-33	 N-(1-((3,5-dimetilisoxazol-4-il)metil)-1H-pirazol-4-il)-2-(4-metoxifenil)acetamida	0.99
4-34	 N-(1-((3,5-dimetilisoxazol-4-il)metil)-1H-pirazol-4-il)-2-metoxibenzamida	1.11
4-35	 N-(1-((3,5-dimetilisoxazol-4-il)metil)-1H-pirazol-4-il)-2-(2-metoxifenil)acetamida	1.16
4-36	 N-(1-((3,5-dimetilisoxazol-4-il)metil)-1H-pirazol-4-il)-2-metoxibenzamida	1.85
4-37	 N-(1-((3,5-dimetilisoxazol-4-il)metil)-1H-pirazol-4-il)-2-fenilbutanamida	0.50

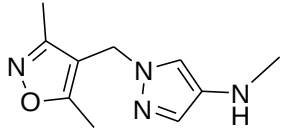
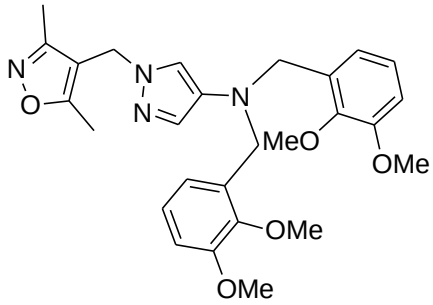
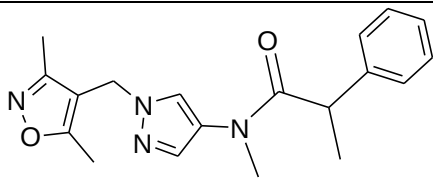
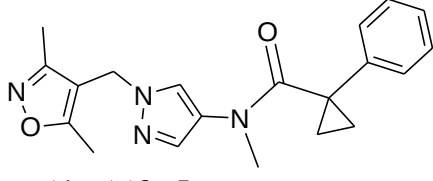
Composto No.	Composto	IC ₅₀ de hT2R8 (μM)
4-38	 N-(1-((3,5-dimetilisoxazol-4-il)metil)-1H-pirazol-4-il)-2-metoxibenzamida	0.53
4-39	 acetato de 2-(1-((3,5-dimetilisoxazol-4-il)metil)-1H-pirazol-4-ilamino)-2-oxo-1-feniletil	0.83
4-40	 N-(1-((3,5-dimetilisoxazol-4-il)metil)-1H-pirazol-4-il)-3-hidroxi-2-fenilpropanamida	0.96
4-41	 N-(1-((3,5-dimetilisoxazol-4-il)metil)-1H-pirazol-4-il)-2-metoxibenzamida	2.10
4-42	 (R)-N-(1-((3,5-dimetilisoxazol-4-il)metil)-1H-pirazol-4-il)-2-fenilpropanamida	3.72

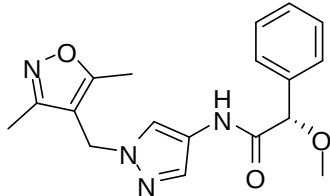
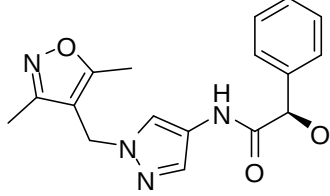
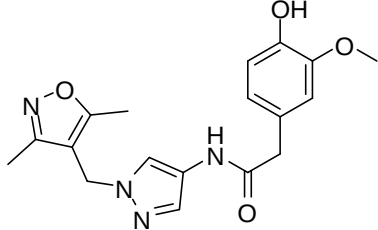
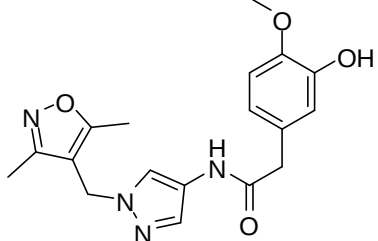
Composto No.	Composto	IC ₅₀ de hT2R8 (μM)
4-43	 N-(1-((3,5-dimetilisoxazol-4-il)metil)-1H-pirazol-4-il)-2-metoxi-2-fenilacetamida	3.43
4-44	 N-(1-((3,5-dimetilisoxazol-4-il)metil)-1H-pirazol-4-il)-2,2-difenilacetamida	5.19
4-45	 N-(1-((3,5-dimetilisoxazol-4-il)metil)-1H-pirazol-4-il)-4-metil-1H-pirrol-2-carboxamida	0.72
4-46	 N-(1-((3,5-dimetilisoxazol-4-il)metil)-1H-pirazol-4-il)nicotinamida	1.05
4-47	 N-(1-((3,5-dimetilisoxazol-4-il)metil)-1H-pirazol-4-il)-2-metoxibenzamida	1.35

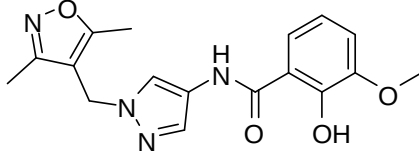
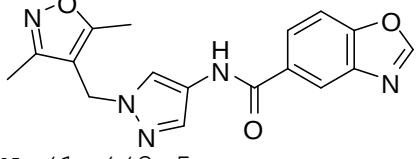
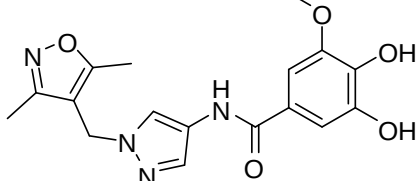
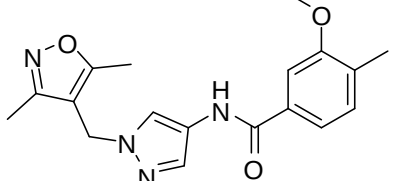
Composto No.	Composto	IC ₅₀ de hT2R8 (μM)
4-48	 N-(1-((3,5-dimetilisoxazol-4-il)metil)-1H-pirazol-4-il)-6-metilpicolinamida	1.95
4-49	 N-(1-((3,5-dimetilisoxazol-4-il)metil)-1H-pirazol-4-il)-1-metil-1H-pirrol-2-carboxamida	3.40
4-50	 N-(1-((3,5-dimetilisoxazol-4-il)metil)-1H-pirazol-4-il)isonicotinamida	4.59
4-51	 N-(1-((3,5-dimetilisoxazol-4-il)metil)-1H-pirazol-4-il)-2-metilfurano-3-carboxamida	7.87
4-52	 N-(1-((3,5-dimetilisoxazol-4-il)metil)-1H-pirazol-4-il)-1,3-dimetil-1H-pirazol-5-carboxamida	18.05

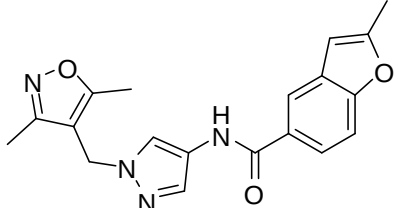
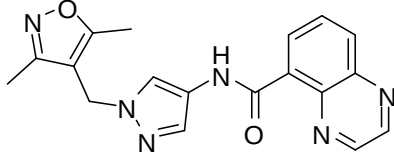
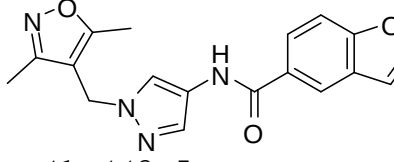
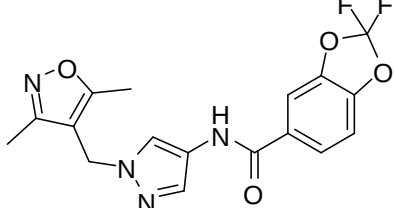
Composto No.	Composto	IC ₅₀ de hT2R8 (μM)
4-53	 N-(1-((3,5-dimetilisoxazol-4-il)metil)-1H-pirazol-4-il)-2,5-dimetilfurano-3-carboxamida	3.03
4-54	 N-(1-((3,5-dimetilisoxazol-4-il)metil)-1H-pirazol-4-il)-5-metilfurano-2-carboxamida	3.19
4-55	 N-(1-((3,5-dimetilisoxazol-4-il)metil)-1H-pirazol-4-il)-3-fenilpropanamida	0.49
4-56	 N-(1-((3,5-dimetilisoxazol-4-il)metil)-1H-pirazol-4-il)-4-fenilbutanamida	0.83
4-57	 N-(1-((3,5-dimetilisoxazol-4-il)metil)-1H-pirazol-4-il)-2-metoxibenzamida	4.16

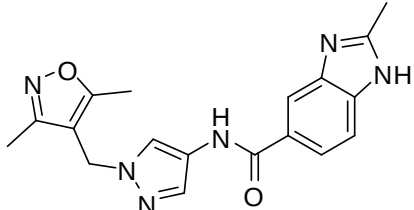
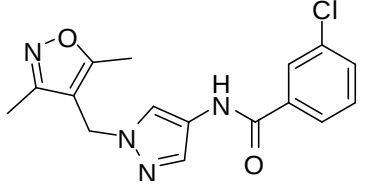
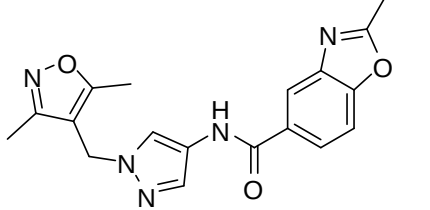
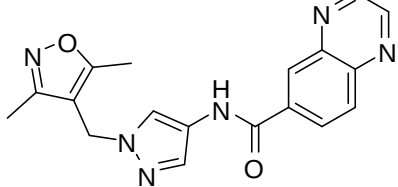
Composto No.	Composto	IC ₅₀ de hT2R8 (μM)
4-58	 N-(1-((3,5-dimetilisoxazol-4-il)metil)-1H-pirazol-4-il)-2-(furano-3-il)acetamida	8.66
4-59	 N-(1-((3,5-dimetilisoxazol-4-il)metil)-1H-pirazol-4-il)-3-etoxibenzamida	0.22
4-60	 N-(1-((3,5-dimetilisoxazol-4-il)metil)-1H-pirazol-4-il)-3-metilpentanamida	1.94
4-61	 N-(1-((3,5-dimetilisoxazol-4-il)metil)-1H-pirazol-4-il)ciclohexanocarboxamida	2.20
4-62	 N-(1-((3,5-dimetilisoxazol-4-il)metil)-1H-pirazol-4-il)-2-(adamant-1-il)acetamida	3.77

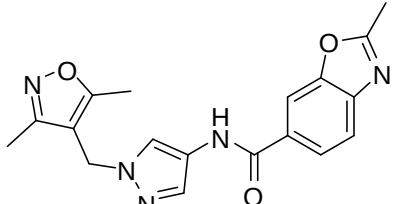
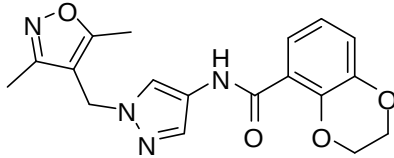
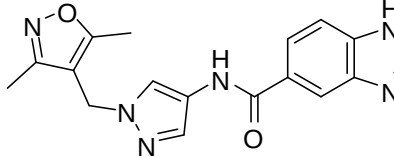
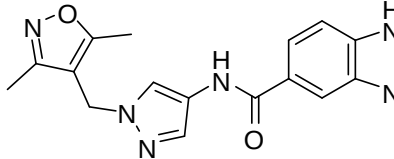
Composto No.	Composto	IC ₅₀ de hT2R8 (μM)
4-63	 1-((3,5-dimetilisoxazol-4-il)metil)-N-metil-1H-pirazol-4-amina	8.76
4-64	 N,N-bis(2,3-dimetoxibenzil)-1-((3,5-dimetilisoxazol-4-il)metil)-1H-pirazol-4-amina	12.60
4-65	 N-(1-((3,5-dimetilisoxazol-4-il)metil)-1H-pirazol-4-il)-N-metil-2-fenilpropanamida	2.81
4-66	 N-(1-((3,5-dimetilisoxazol-4-il)metil)-1H-pirazol-4-il)-N-metil-1-fenilciclopropanecarboxamida	8.23

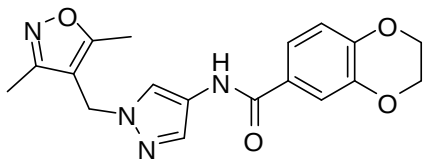
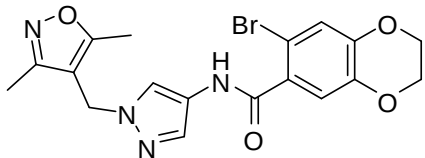
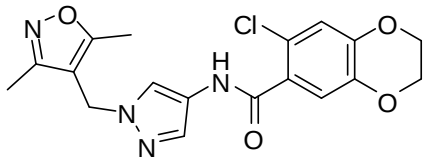
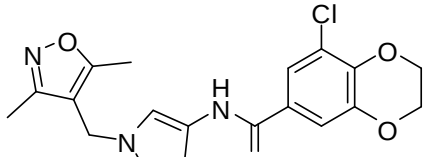
Composto No.	Composto	IC ₅₀ de hT2R8 (μM)
4-67	 (S)-N-(1-((3,5-dimetilisoxazol-4-il)metil)-1H-pirazol-4-il)-2-metoxi-2-fenilacetamida	8.6
4-68	 (R)-N-(1-((3,5-dimetilisoxazol-4-il)metil)-1H-pirazol-4-il)-2-metoxi-2-fenilacetamida	5.0
4-69	 N-(1-((3,5-dimetilisoxazol-4-il)metil)-1H-pirazol-4-il)-2-(4-hidroxi-3-metoxifenil)acetamida	4.7
4-70	 N-(1-((3,5-dimetilisoxazol-4-il)metil)-1H-pirazol-4-il)-2-(3-hidroxi-4-metoxifenil)acetamida	3.1

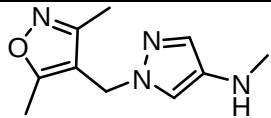
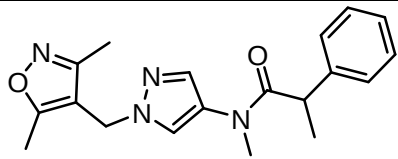
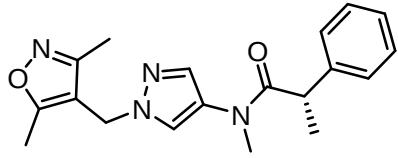
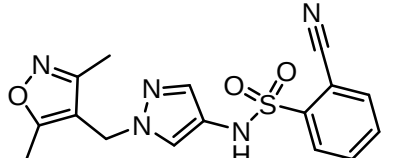
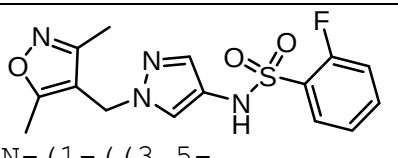
Composto No.	Composto	IC ₅₀ de hT2R8 (μM)
4-71	 N-(1-((3,5-dimetilisoxazol-4-il)metil)-1H-pirazol-4-il)-2-hidroxi-3-metoxibenzamida	2.9
4-72	 N-(1-((3,5-dimetilisoxazol-4-il)metil)-1H-pirazol-4-il)benzo[d]oxazol-5-carboxamida	2.6
4-73	 N-(1-((3,5-dimetilisoxazol-4-il)metil)-1H-pirazol-4-il)-3,4-dihidroxi-5-metoxibenzamida	2.2
4-74	 N-(1-((3,5-dimetilisoxazol-4-il)metil)-1H-pirazol-4-il)-3-metoxi-4-metilbenzamida	2.2

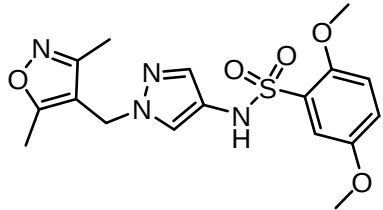
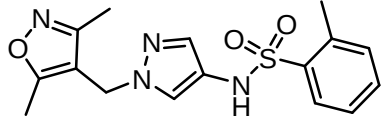
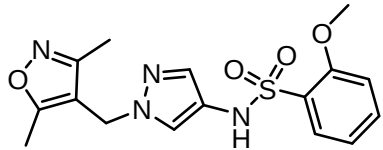
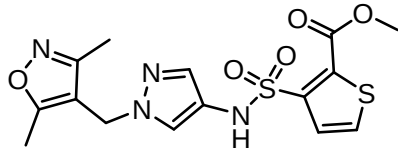
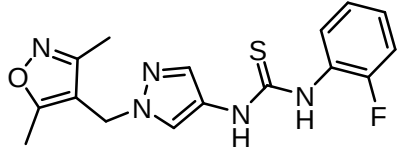
Composto No.	Composto	IC ₅₀ de hT2R8 (μM)
4-75	 N-(1-((3,5-dimetilisoxazol-4-il)metil)-1H-pirazol-4-il)-2-metilbenzofurano-5-carboxamida	2.1
4-76	 N-(1-((3,5-dimetilisoxazol-4-il)metil)-1H-pirazol-4-il)quinoxalina-5-carboxamida	1.7
4-77	 N-(1-((3,5-dimetilisoxazol-4-il)metil)-1H-pirazol-4-il)benzofurano-5-carboxamida	1.4
4-78	 N-(1-((3,5-dimetilisoxazol-4-il)metil)-1H-pirazol-4-il)-2,2-difluorobenzo[d][1,3]dioxol-5-carboxamida	1.3

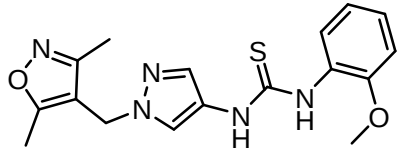
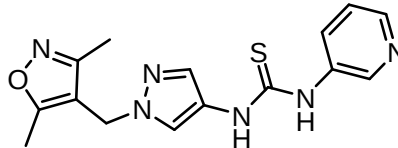
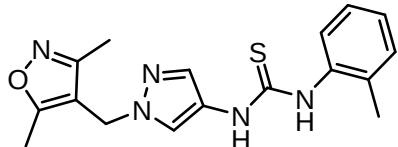
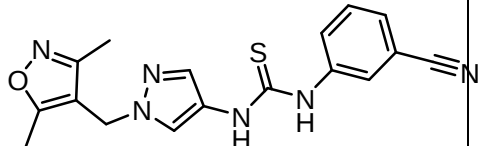
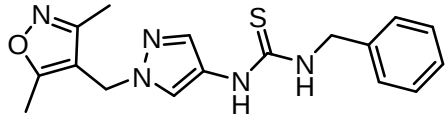
Composto No.	Composto	IC ₅₀ de hT2R8 (μM)
4-79	 N-(1-((3,5-dimetilisoxazol-4-il)metil)-1H-pirazol-4-il)-2-metil-1H-benzo[d]imidazol-5-carboxamida	1.0
4-80	 3-cloro-N-(1-((3,5-dimetilisoxazol-4-il)metil)-1H-pirazol-4-il)benzamida	0.9
4-81	 N-(1-((3,5-dimetilisoxazol-4-il)metil)-1H-pirazol-4-il)-2-etilbenzo[d]oxazol-5-carboxamida	0.8
4-82	 N-(1-((3,5-dimetilisoxazol-4-il)metil)-1H-pirazol-4-il)quinoxalina-6-carboxamida	0.8

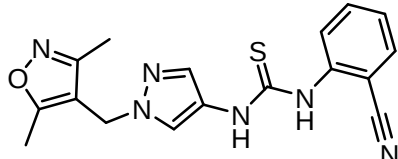
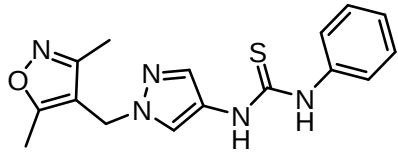
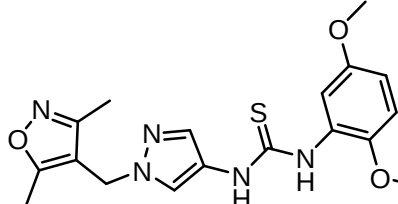
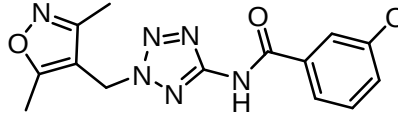
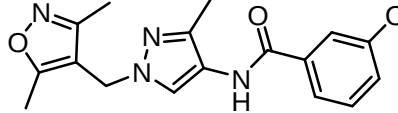
Composto No.	Composto	IC ₅₀ de hT2R8 (μM)
4-83	 N-(1-((3,5-dimethylisoxazol-4-yl)methyl)-1H-pirazol-4-yl)-2-methylbenzo[d]oxazol-6-carboxamida	0.7
4-85	 N-(1-((3,5-dimethylisoxazol-4-yl)methyl)-1H-pirazol-4-yl)-1H-benzo[d]imidazol-5-carboxamida	0.6
4-86	 2-(1H-benzo[d]imidazol-6-yl)-N-(1-((3,5-dimethylisoxazol-4-yl)methyl)-1H-pirazol-4-yl)acetamida	0.6
4-87	 N-(1-((3,5-dimethylisoxazol-4-yl)methyl)-1H-pirazol-4-yl)-1H-benzo[d][1,2,3]triazol-5-carboxamida	0.6

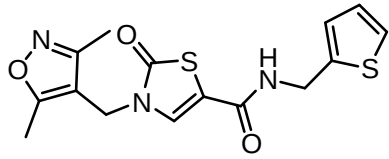
Composto No.	Composto	IC ₅₀ de hT2R8 (μM)
4-88	 N-(1-((3,5-dimetilisoxazol-4-il)metil)-1H-pirazol-4-il)-2,3-dihidrobenzo[b][1,4]dioxina-6-carboxamida	0.4
4-89	 7-bromo-N-(1-((3,5-dimetilisoxazol-4-il)metil)-1H-pirazol-4-il)-2,3-dihidrobenzo[b][1,4]dioxina-6-carboxamida	0.3
4-90	 7-cloro-N-(1-((3,5-dimetilisoxazol-4-il)metil)-1H-pirazol-4-il)-2,3-dihidrobenzo[b][1,4]dioxina-6-carboxamida	0.1
4-91	 8-cloro-N-(1-((3,5-dimetilisoxazol-4-il)metil)-1H-pirazol-4-il)-2,3-dihidrobenzo[b][1,4]dioxina-6-carboxamida	0.1

Composto No.	Composto	IC ₅₀ de hT2R8 (μM)
4-96	 1-((3,5-dimetilisoxazol-4-il)metil)-N-metil-1H-pirazol-4-amina	8.764
4-97	 N-(1-((3,5-dimetilisoxazol-4-il)metil)-1H-pirazol-4-il)-N-metil-2-fenilpropanamida	2.126
4-98	 (S)-N-(1-((3,5-dimetilisoxazol-4-il)metil)-1H-pirazol-4-il)-N-metil-2-fenilpropanamida	2.811
4-99	 2-ciano-N-(1-((3,5-dimetilisoxazol-4-il)metil)-1H-pirazol-4-il)benzenosulfonamida	1.358
4-100	 N-(1-((3,5-dimetilisoxazol-4-il)metil)-1H-pirazol-4-il)-2-fluorobenzenosulfonamida	8.510

Composto No.	Composto	IC ₅₀ de hT2R8 (μM)
4-101	 N-(1-((3,5-dimetilisoxazol-4-il)metil)-1H-pirazol-4-il)-2,5-dimetoxibenzenosulfonamida	1.631
4-102	 N-(1-((3,5-dimetilisoxazol-4-il)metil)-1H-pirazol-4-il)-2-metilbenzenosulfonamida	2.153
4-103	 N-(1-((3,5-dimetilisoxazol-4-il)metil)-1H-pirazol-4-il)-2-metoxibenzenosulfonamida	3.801
4-104	 metil 3-(N-(1-((3,5-dimetilisoxazol-4-il)metil)-1H-pirazol-4-il)sulfamoil)tiofeno-2-carboxilato	1.252
4-105	 1-(1-((3,5-dimetilisoxazol-4-il)metil)-1H-pirazol-4-il)-3-(2-fluorofenil)tioureia	1.629

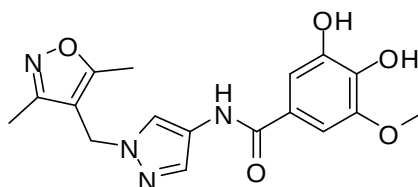
Composto No.	Composto	IC ₅₀ de hT2R8 (μM)
4-106	 1-(1-((3,5-dimetilisoxazol-4-il)metil)-1H-pirazol-4-il)-3-(2-metoxifenil)tioureia	2.607
4-107	 1-(1-((3,5-dimetilisoxazol-4-il)metil)-1H-pirazol-4-il)-3-(piridin-3-il)tioureia	2.999
4-108	 1-(1-((3,5-dimetilisoxazol-4-il)metil)-1H-pirazol-4-il)-3-o-tolilthioureia	3.013
4-109	 1-(3-cianofenil)-3-(1-((3,5-dimetilisoxazol-4-il)metil)-1H-pirazol-4-il)tioureia	0.783
4-110	 1-benzil-3-(1-((3,5-dimetilisoxazol-4-il)metil)-1H-pirazol-4-il)tioureia	1.097

Composto No.	Composto	IC ₅₀ de hT2R8 (μM)
4-111	 1-(2-cianofenil)-3-(1-((3,5-dimetilisoxazol-4-il)metil)-1H-pirazol-4-il)tioureia	2.347
4-112	 1-(1-((3,5-dimetilisoxazol-4-il)metil)-1H-pirazol-4-il)-3-feniltioureia	2.492
4-113	 1-(2,5-dimetoxifenil)-3-(1-((3,5-dimetilisoxazol-4-il)metil)-1H-pirazol-4-il)tioureia	5.240
4-114	 N-(2-((3,5-dimetilisoxazol-4-il)metil)-2H-tetrazol-5-il)-3-metoxibenzamida	1.866
4-115	 N-(1-((3,5-dimetilisoxazol-4-il)metil)-3-metil-1H-pirazol-4-il)-3-metoxibenzamida	9.248

Composto No.	Composto	IC ₅₀ de hT2R8 (μM)
4-116	 3-((3,5-dimetilisoxazol-4-il)metil)-2-oxo-N-(tiofen-2-ilmetil)-2,3-dihidrotiazol-5-carboxamida	2.279

Exemplo 4-67 a 4-91:

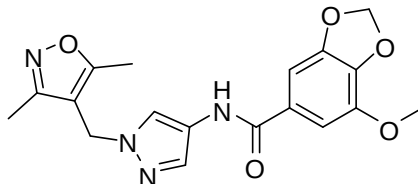
Preparado como no Exemplo 4-73 a partir de cloridrato de 1-((3,5-dimetilisoxazol-4-il)metil)-1H-pirazol-4-amina (Exemplo 4-1a) e seus ácidos carboxílicos correspondents
 5 funcionalizados. A caracterização foi feita por LCMS onde as massas desejadas foram encontradas.

Exemplo 4-73: N-(1-((3,5-dimetilisoxazol-4-il)metil)-1H-pirazol-4-il)-3,4-dihidroxi-5-metoxibenzamida**4-73**

Cloridrato de 1-((3,5-dimetilisoxazol-4-il)metil)-1H-pirazol-4-amina (Exemplo 4-1a) (228 mg, 1 mmol), ácido 3,4-dihidroxi-5-metoxibenzoico (184 mg, 1 mmol), HOBT (135mg, 1 mmol), e EDC (191mg, 1 mmol) foram dissolvidos em 2 mL DMF em
 15 um frasco de micro-ondas seguido pela adição de trietilamina (101mg, 1 mmol). A reação foi colocada em um reator de micro-onda a 165 °C por 5 minutos. O produto cru foi purificado usando diretamente HPLC Varian (10%-95% ACN in H₂O: 25 gradiente de minuto). As frações puras foram combinadas e
 20 concentradas para produzir N-(1-((3,5-dimetilisoxazol-4-il)metil)-1H-pirazol-4-il)-3,4-dihidroxi-5-metoxibenzamida. (280 mg, 70%). LC/MS; [M+H] calculado para C₁₇H₁₈N₄O₅; esperado 359.1; encontrado 359.1.

O composto teve um IC₅₀ no receptor de sabor amargo hT2R8 de 2.2 µM

Exemplo 4-92: N-(1-((3,5-dimetilisoxazol-4-il)metil)-1H-pirazol-4-il)-7-metoxibenzo[d][1,3]dioxol-5-carboxamida

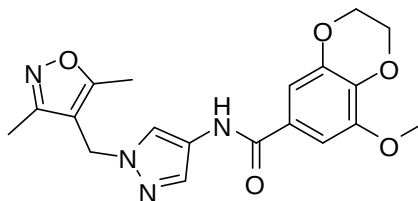


4-92

N-(1-((3,5-dimetilisoxazol-4-il)metil)-1H-pirazol-4-il)-3,4-dihidroxi-5-metoxibenzamida (Exemplo 73) (50 mg, 0.14 mmol) e Carbonato de Césio (113 mg, 2.5 mmol) foram dissolvidos em 1 mL de acetona seguido pela adição de dibromometano (239 mg, 1.4 mmol). A reação foi colocada em um reator de micro-onda a 120 °C por 20 minutos. A solução clara da reação foi removida e evaporada sob vácuo. O produto cru foi dissolvido em 1 mL etanol e purificada por HPLC Varian (10%-95% ACN em H₂O: 25 gradiente de minuto). As frações puras foram combinadas e concentradas para produzir N-(1-((3,5-dimetilisoxazol-4-il)metil)-1H-pirazol-4-il)-2-(7-metoxibenzo[d][1,3]dioxol-5-il)acetamida. (12 mg, 23%). LC/MS; [M+H] calculado para C₁₈H₁₈N₄O₅; esperado 371.1; encontrado 371.1.

O composto teve um IC₅₀ no receptor de sabor amargo hT2R8 de 0.7 µM

Exemplo 4-93: N-(1-((3,5-dimetilisoxazol-4-il)metil)-1H-pirazol-4-il)-8-metoxi-2,3-dihidrobenzo[b][1,4]dioxina-6-carboxamida



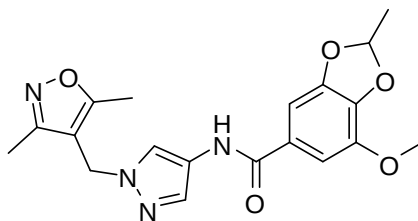
4-93

Preparado como no Exemplo 4-92 a partir de N-(1-((3,5-dimetilisoxazol-4-il)metil)-1H-pirazol-4-il)-3,4-dihidroxi-5-

metoxibenzamida (Exemplo 4-73), Carbonato de Césio e dibromoetano. Rendimento 20 %. MS M+H calculado 385.1, encontrado 385.1.

O composto teve um IC₅₀ no receptor de sabor amargo hT2R8 de 0.7 µM

Exemplo 4-94: N-(1-((3,5-dimetilisoxazol-4-il)metil)-1H-pirazol-4-il)-7-metoxi-2-metilbenzo[d][1,3]dioxol-5-carboxamida



4-94

10

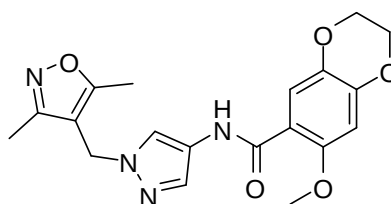
Preparado como no Exemplo 4-92 a partir de N-(1-((3,5-dimetilisoxazol-4-il)metil)-1H-pirazol-4-il)-3,4-dihidroxibenzamida (Exemplo 4-73), Carbonato de Césio e 1,1-dibromoetano. Rendimento 25 %. MS M+H calculado 385.1, encontrado 385.1.

15

O composto teve um IC₅₀ no receptor de sabor amargo hT2R8 de 0.7 µM.

Exemplo 4-95: N-(1-((3,5-dimetilisoxazol-4-il)metil)-1H-pirazol-4-il)-7-metoxi-2,3-dihidrobenczo[b][1,4]dioxina-6-carboxamida

20



4-95

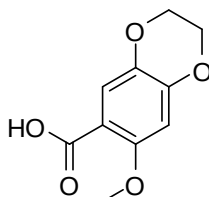
Preparado como no Exemplo 4-73 a partir de cloridrato de 1-((3,5-dimetilisoxazol-4-il)metil)-1H-pirazol-4-amina (Exemplo 4-1a) e ácido 7-metoxi-2,3-dihidrobenczo[b][1,4]dioxina-6-carboxílico (Exemplo 4-95a). Rendimento 50 %. MS M+H calculado 385.1, encontrado 385.1. ¹H NMR (400 MHz, DMSO): 2.136 (s, 3H), 2.410 (s, 3H), 3.851 (s, 3H), 4.214 (bs, 2H), 4.296 (bs, 2H), 5.120 (s, 2H), 6.688 (s,

25

1H), 7.290 (s, 1H), 7.6006 (s, 1H), 8.069 (s, 1H), 9.856 (s, 1H).

O composto teve um IC₅₀ no receptor de sabor amargo hT2R8 de 0.7 µM

5 **Exemplo 4-95a: 7-Metoxi-2,3-dihidrobenzo[b][1,4]dioxina-6-ácido carboxílico**



4-95a

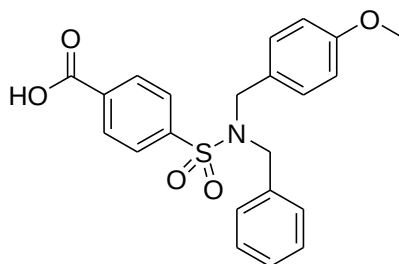
Em um frasco de micro-onda 2mL, metil 7-bromo-2,3-dihidrobenzo[b][1,4]dioxina-6-carboxilato (273 mg, 1 mmol) e CuBr (14.3 mg, 0.1 mmol) foram dissolvidos em DMF seco e foi colocado em banho de gelo. Metóxido de sódio (540 mg, 10 mmol) foi adicionado à mistura da reação gota a gota enquanto agitando a 0 °C. A reação foi aquecida a temperatura ambiente e agitada por 45 minutos. A reação foi então colocada em um reator de micro-onda por 5 minutos a 135°C. A mistura da reação foi dissolvida em água e lavada com acetado de etila. A camada de água foi coletada e acidificada para o pH 4 com 1M HCl. O produto foi extraído usando acetado de etila depois seco sobre sulfato de sódio. O solvente foi evaporado sob vácuo para resultar no intermediário desejado de ácido 7-metoxi-2,3-dihidrobenzo[b][1,4]dioxina-6-carboxílico que foi usado diretamente sem purificação adicional. Rendimento 57 %. MS M+H calculado 211.1, encontrado 211.1.

25 **Exemplo 5**

Antagonistas hT2R14: Fabricando os compostos da invenção

Os seguintes Exemplos são dados para ilustrar uma variedade de modalidades exemplares da invenção e não são destinados a serem limitantes de modo algum.

30 **Exemplo 5-1: ácido 4-(N-benzil-N-(4-metoxibenzil)sulfamoyl)benzoico**

**5-1**

Benzoato de benzil 4-(N-benzil-N-(4-metoxibenzil)sulfamoyl) (Exemplo 5-1a) (517mg, 1 mmol) foi agitado com uma solução 10/1/2 de 6N NaOH(aq)/THF/MeOH (27 mL) a temperatura ambiente por 6 horas. A solução foi acidificada com 3N HCl (aq) a um pH de ~3 (ca. 50 mL), e a fase aquosa foi extraída com acetado de etila (3x, 75 mL). Os extratos orgânicos combinados foram secos sobre sulfato de sódio e concentrados no rotovapor. O resíduo foi pego no MeOH (15 mL) e o purificado pela HPLC de fase reversa (5-95% acetonitrila em H₂O gradiente: 25 minutos) em três alíquotas de 5 mL. As frações puras foram combinadas e concentradas para um sólido branco. O produto foi dissolvido em 15 mL de etanol absoluto e evaporado no rotovapor (4x) para fornecer ácido 4-(N-benzil-N-(4-metoxibenzil)sulfamoyl)benzoico puro (174 mg, 42%) como um sólido branco. M.p 161-163 °C. ¹H NMR (CDCl₃, 400 MHz): δ 3.78 (s, 3H), 4.32 (s, 2H), 4.36 (s, 2H), 6.78 (d, J=8.4 Hz, 2H), 6.99(d, J=8.8 Hz, 2H), 7.09-7.07 (m, 2H), 7.27-7.24 (m, 3H), 7.93 (d, J=8.8 Hz, 2H), 8.24 (d, J=8 Hz, 2H). MS 412 (MH⁺).

O composto teve um IC₅₀ no receptor de sabor amargo de hT2R14 de 0.22 µM

Exemplo 5-1a: Benzoato de benzil 4-(N-benzil-N-(4-metoxibenzil)sulfamoyl)

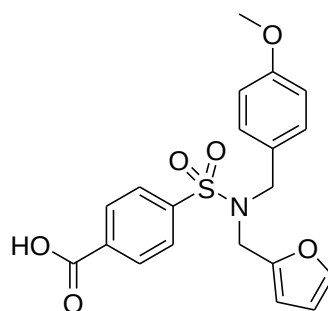
Ácido 4-(N-(4-metoxibenzil)sulfamoyl)benzoico (Exemplo 5-1b) (450, mg, 1.4 mmol), brometo de benzila (770 mg, 4.5 mmol), e Carbonato de Césio (1.5g, 4.5 mmol) em DMF (10 mL) foram agitados a 80 °C por 2 horas. A solução foi resfriada a temperatura ambiente, diluída com H₂O (200 mL) e extraída com acetado de etila (3x, 100 mL). As camadas orgânicas

combinadas foram secas sobre sulfato de sódio, filtradas e concentradas sob vácuo. O resíduo foi purificado pela cromatografia em sílica gel (10% acetado de etila em hexanos) para produzir benzoato de benzil 4-(N-benzil-N-(4-metoxibenzil)sulfamoil) (517 mg, 73 %) como um sólido branco. ¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ 3.76 (s, 3H), 4.28 (s, 2H), 4.32 (s, 2H), 5.40 (s, 2H), 6.79 (d, J=8 Hz, 2H), 6.96 (d, J=8 Hz, 2H), 7.04-7.07 (m, 2H), 7.21-7.23 (m, 3H), 7.35-7.47 (m, 5H), 7.85 (d, J=8 Hz, 2H), 8.17 (d, J=8.4 Hz, 2H).

Exemplo 5-1b: ácido 4-(N-(4-metoxibenzil)sulfamoil)benzoico

Ácido 4-(Clorosulfonil)benzoico (5 g, 22.7 mmol) foi adicionado, em três porções como um sólido, a uma solução em agitação de 4-metoxi benzilamina (6.1 g, 45 mmol) e trietilamina (2.3 g, 22.7 mmol) em acetona (100 mL) resfriado a 0 °C através de um banho de água gelo surante um período de 10 minutos. O banho de gelo foi removido e a reação foi agitada por 4 horas adicionais. A mistura da reação foi diluída com a solução de 5% ácido acético em H₂O (150 mL) e extraída com acetado de etila (3x, 100 mL). Os extratos orgânicos combinados foram secos sobre sulfato de sódio, filtrados e concentrados no rotovapor. O sólido branco resultante foi triturado com hexanos/acetado de etila (9/1) para produzir ácido 4-(N-(4-metoxibenzil)sulfamoil)benzoico (5.1 g, 70 %) como um sólido branco. ¹H NMR (400 MHz, DMSO d₆) δ 3.68 (s, 3H), 3.91 (s, 2H), 6.79 (d, J=8.4 Hz, 2H), 7.10 (d, J=8.8 Hz, 2H), 7.80 (d, J=8.8 Hz, 2H), 8.02 (d, J=8.4 Hz, 2H).

Exemplo 5-2: ácido 4-(N-(furano-2-ilmetil)-N-(4-metoxibenzil)sulfamoil)benzoico

**5-2**

Benzoato de 4-Metoxibenzil 4-(N-(furano-2-ilmetil)-N-(4-metoxibenzil)sulfamoil) (Exemplo 5-2a) (750 mg, 1.4 mmol) foi agitado com uma 2/2/1 mistura de 2N LiOH/THF/MeOH aquoso (45 mL) a temperatura ambiente por 3 horas. A solução foi acidificada com 1N aq HCl aquoso para um pH de ~3 (ca. 100 mL) e extraída com acetado de etila (3x, 100 mL). Os extratos orgânicos combinados foram secos sobre sulfato de sódio e concentrados no rotovapor. O resíduo foi pego no MeOH (9 mL) e purificado pela HPLC de fase reversa (5-95% ACN em H₂O gradiente: 40 minutos) em três alíquotas de 3 mL. As frações puras foram combinadas e concentradas para um sólido branco. O produto foi dissolvido em etanol absoluto e evaporado (4x, 20 mL) para fornecer ácido 4-(N-(furano-2-ilmetil)-N-(4-metoxibenzil)sulfamoil)benzoico puro (205 mg, 36 %) como um sólido branco. M.p. 151 -152 °C. ¹H NMR (DMSO-d₆, 400 MHz): δ 3.71 (s, 3H), 4.24 (s, 2H), 4.27 (s, 2H), 6.14 (d, 1H, J=3.2 Hz), 6.26 (m, 1H), 6.87 (d, 2H, J=9.2 Hz), 7.14 (d, 2H, J=8.8 Hz), 7.41 (s, 1H), 7.89 (d, 2H, J=8 Hz), 8.06 (d, 2H, J=8.4 Hz), 13.48 (bs, 1H). MS 400 (M-H).

O composto teve um IC₅₀ no receptor de sabor amargo de hT2R14 de 0.59 µM

Exemplo 5-2a: benzoato4-metoxibenzil 4-(N-(furano-2-ilmetil)-N-(4-metoxibenzil)sulfamoil):

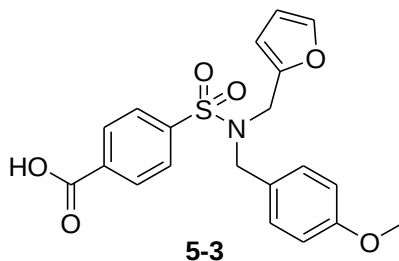
Ácido 4-(N-(furano-2-ilmetil)sulfamoil)benzoico (Exemplo 5-2b) (500 mg, 1.8 mmol), cloreto de p-metoxi benzil (624 mg, 4.0 mmol), e carbonato de césio (1.3 g, 4.0 mmol) foram dissolvidos em DMF (10 mL) e agitados a 80 °C por 1 hora. A mistura foi resfriada a temperatura ambiente, diluída com H₂O (200 mL), e extraída com acetado de etila (3 x 100 mL). Os

orgânicos combinados foram secos sobre sulfato de sódio e concentrados no rotovapor. O produto foi purificado pela cromatografia em sílica gel (15% acetado de etila em hexanos) para fornecer o benzoato de 4-metoxibenzil 4-(N-(furano-2-ilmetil)-N-(4-metoxibenzil)sulfamoil) (753 mg, 80%) como um óleo claro. ¹H NMR (DMSO-d₆, 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).

Exemplo 5-2b: 4-(N-(furano-2-ilmetil)sulfamoil)benzoico ácido:

Ácido 4-(Clorosulfonil)benzoico (5.0 g, 22.7 mmol) foi adicionado em três porções durante um período de 10 minutos a um solução em agitação de furfuril amina (6.6 g, 68 mmol) em acetona (200 mL) resfriado a 0 °C através de um banho de água gelo. Após a adição de cloreto de sulfonil estar completa o banho de gelo foi removido e a solução foi agitada por 1 hora a temperatura ambiente. A mistura was concentrada e submetida à cromatografia em sílica gel (90% acetado de etila, 8% hexanos e 2% acético ácido) para produzir 4.4 de ácido 4-(N-(furano-2-ilmetil)sulfamoil)benzoico (4.4 g, 68%) como um sólido branco. ¹H NMR (DMSO-d₆, 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).

Exemplo 5-3: ácido 4-(N-(4-etoxibenzil)-N-(furano-2-ilmetil)sulfamoil)benzoico



4-ciano-N-(4-etoxibenzil)-N-(furano-2-ilmetil)benzenosulfonamida (Exemplo 5-3a) (300 mg, 0.8 mmol) foi agitado em um mistura 1/1 de dioxano/1.5 N NaOH aquoso (100 mL) a 80 °C por 16 horas. A mistura foi resfriada, acidificada com 1N HCl aquoso (100 mL), e extraída com acetado de etila (3x, 75 mL). Os extratos orgânicos combinados foram secos sobre sulfato de sódio, filtrados, e concentrados no rotovapor. O sólido foi triturado com acetado de etila/hexanos (~1/9) e coletado por filtração para produzir ácido 4-(N-(4-etoxibenzil)-N-(furano-2-ilmetil)sulfamóil)benzoico (250 mg, 69 %) como um sólido branco. NMR (DMSO-d₆, 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).

O composto teve um IC₅₀ no receptor de sabor amargo de hT2R14 de 3.0 µM

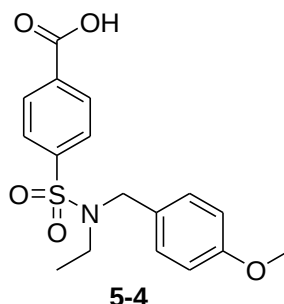
Exemplo 5-3a: 4-ciano-N-(4-etoxibenzil)-N-(furano-2-ilmetil)benzenosulfonamida:

Cloreto de 4-cianobenzeno-1-sulfonil (600 mg, 2.9 mmol) foi adicionado a um solução em agitação de N-(4-etoxibenzil)-1-(furano-2-il)metanamina (Exemplo 5-3b) (685 mg, 2.9 mmol) e trietilamina (455 mg, 4.5 mmol) em DCM (100 mL) e a reação foi agitada por 2 horas. A reação foi diluída com H₂O (200mL) e extraída com DCM (3x, 75 mL). Os extratos orgânicos combinados foram secos sobre sulfato de sódio, filtrados e concentrados no rotovapor. O resíduo foi purificado pela cromatografia em sílica gel (10% acetado de etila em hexanos) para produzir 4-ciano-N-(4-etoxibenzil)-N-(furano-2-ilmetil)benzenosulfonamida (665 mg, 68 %) como um sólido esbranquiçado. NMR (DMSO-d₆, 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).

Exemplo 5-3b : 4 N-(4-etoxibenzil)-1-(furano-2-il)metanamina:

4-etoxi benzaldeído (5 g, 33 mmol) e furfuril amina (4.2 g, 43 mmol) em uma mistura de metanol (50 mL), trimetilortoformato (10 mL) e AcOH (1 mL) foram agitados a temperatura ambiente, sob uma atmosfera de nitrogênio por 16 horas. O borohidreto de sódio (1.4 g, 35 mmol) foi adicionado, em 4 porções, durante um período de 30 minutos (reação exotérmica). A reação foi agitada por mais 2 horas a temperatura ambiente. O solvente foi removido sob vácuo e o resíduo pego em acetado de etila (150 mL). A fase orgânica foi lavada com H₂O (200 mL) e a fase aquosa foi extraída de volta com acetado de etila (2x, 100 mL). As camadas orgânicas combinadas foram concentradas e o resíduo foi purificado em sílica gel (70% acetado de etila em hexanos com ~0.5 % trietilamina) para produzir N-(4-etoxibenzil)-1-(furano-2-il)metanamina (6.1 g, 80 %) como um óleo claro. NMR (CDCl₃, 400 MHz): δ 1.40 (t, J=7.2 Hz, 3H), 3.71 (s, 2H), 3.76 (s, 2H), 4.02 (q, J=7.2 Hz, 2H), 6.17 (d, J=4 Hz, 1H), 6.31 (m, 1H), 6.84 (d, J=8.8 Hz, 2H), 7.23 (d, J=8.8 Hz, 2H), 7.36 (m, 1H).

Exemplo 5-4: ácido 4-(N-etil-N-(4-metoxibenzil)sulfamoil)benzoico

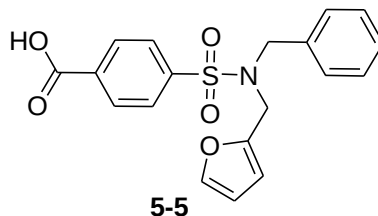


Ácido 4-(N-(4-metoxibenzil)sulfamoil)benzoico (Exemplo 5-1b) (160 mg, 0.5 mmol) e carbonato de cézio (325 mg, 1 mmol) foram colocados em um frasco de micro-ondas e dissolvidos em 2 mL DMF. O iodeto de etila (155 mg, 1 mmol) foi adicionado na mistura da reação. A reação foi colocada em um reator de micro-onda e aquecida a 165°C por 5 minutos. A

mistura da reação foi dissolvida em acetado de etila e lavada com água. A camada orgânica foi seca sobre sulfato de sódio e evaporada sob vácuo. O produto cru foi dissolvido em solução 4/1 de 6N NaOH(aq)/tetrahydrofurano (3 mL) e agitada a temperatura ambiente por 6 horas. A solução foi acidificada com 3N HCl (aq) para um pH de ~3 e o produto foi extraído com acetado de etila (3x, 75 mL). Os extratos orgânicos combinados foram secos sobre sulfato de sódio e concentrados sob vácuo. O resíduo foi pego no metanol (3 mL) e purificado pela HPLC de fase reversa (5-95 % acetonitrila em H₂O gradiente: 25 minutos). O composto foi conhecido por inibir o hT2R14 com IC₅₀ de 20 µM. Rendimento 35%. MS M+H calculado 350.11, encontrado 350.0.

O composto teve um IC₅₀ no receptor de sabor amargo de hT2R14 de 10 µM.

Exemplo 5-5: ácido 4-(N-benzil-N-(furano-2-ilmetil)sulfamoil)benzoico

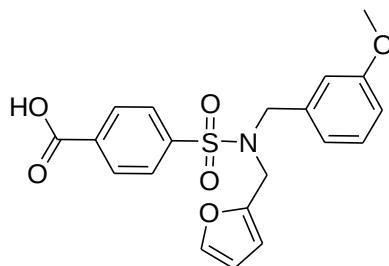


Ácido 4-(N-(furano-2-ilmetil)sulfamoil)benzoico (Exemplo 5-2b) (140 mg, 0.5 mmol) e carbonato de cézio (325 mg, 1 mmol) foram colocados em um frasco de micro-ondas e dissolvidos em 2 mL DMF. (Bromometil)benzeno (170 mg, 1 mmol) foi adicionado na mistura da reação. A reação foi colocada em um reator de micro-onda e aquecida a 165 °C por 5 minutos. A mistura da reação foi dissolvida em acetado de etila e lavada com água. A camada orgânica foi seca sobre sulfato de sódio e evaporada sob vácuo. O produto cru foi dissolvido em solução 4/1 de 6N NaOH(aq)/tetrahydrofurano (3 mL) e agitada a temperatura ambiente por 6 horas. A solução foi acidificada com 3N HCl (aq) para um pH de ~3 e o produto foi extraído com acetado de etila (3x, 75 mL). Os extratos orgânicos combinados foram secos sobre sulfato de sódio e concentrados

sob vácuo. O resíduo foi pegado no metanol (3 mL) e purificado pela HPLC de fase reversa (5-95 % acetonitrila em H₂O gradiente: 25 minutos). Rendimento 35 %. MS M+H calculado 372.4, encontrado 372.0.

5 O composto teve um IC₅₀ no receptor de sabor amargo de hT2R14 de 4.6 µM

Exemplo 5-6: ácido 4-(N-(furano-2-ilmetil)-N-(3-metoxibenzil)sulfamoil)benzoico

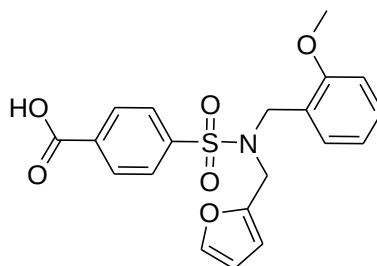


5-6

10 Preparado como no Exemplo 5-5 a partir de 1-(bromometil)-3-metoxibenzeno e ácido 4-(N-(furano-2-ilmetil)sulfamoil)benzoico (Exemplo 5-2b). Rendimento 35 %. MS M+H calculado 402.3, encontrado 402.0.

15 O composto teve um IC₅₀ no receptor de sabor amargo de hT2R14 de 10 µM

Exemplo 5-7: ácido 4-(N-(furano-2-ilmetil)-N-(2-metoxibenzil)sulfamoil)benzoico

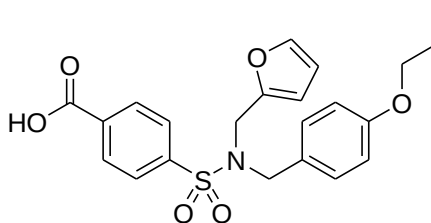


5-7

20 Preparado como no Exemplo 5-5 a partir do 1-(bromometil)-2-metoxibenzeno e ácido 4-(N-(furano-2-ilmetil)sulfamoil)benzoico (Exemplo 5-2b). Rendimento 35%. MS M+H calculado 402.3, encontrado 402.0.

O composto teve um IC₅₀ no receptor de sabor amargo de hT2R14 de 12 µM

Exemplo 5-8: ácido 4-(N-(4-propoxibenzil)-N-(furan-2-ilmetil)sulfamoil)benzoico



5-8

4-ciano-N-(4-propoxibenzil)-N-(furan-2-ilmetil)benzenosulfonamida (Exemplo 5-8a) (300 mg, 0.8 mmol) foi agitado em uma mistura 1/1 de dioxano/1.5 N NaOH aquoso (100 mL) a 80°C por 16 horas. A mistura foi resfriada, acidificada com 1N aquoso HCl (100 mL), e extraída com acetado de etila (3x, 75 mL). Os extratos orgânicos combinados foram secos sobre sulfato de sódio, filtrados, e concentrados no rotovapor. O sólido foi triturado com acetado de etila/hexanos (~1/9) e coletado por filtração para produzir ácido 4-(N-(4-propoxibenzil)-N-(furan-2-ilmetil)sulfamoil)benzoico (165 mg, 63 %) como um sólido branco. NMR (DMSO-d₆, 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).

O composto teve um IC₅₀ em receptor amargo hT2R14 de 2.5 µM

Exemplo 5-8a: 4-ciano-N-(4-propoxibenzil)-N-(furan-2-ilmetil)benzenosulfonamida:

cloreto de 4-cianobenzeno-1-sulfonil (600 mg, 2.9 mmol) foi adicionado a uma solução agitada de N-(4-propoxibenzil)-1-(furan-2-il)metanamina (Exemplo 5-8b) (685 mg, 2.9 mmol) e trietilamina (455 mg, 4.5 mmol) em DCM (100 mL) e a reação foi agitada por 2 horas. A reação foi diluída com H₂O (200 mL) e extraída com DCM (3x, 75 mL). Os extratos orgânicos combinados foram secos sobre sulfato de sódio, filtrados e concentrados no rotovapor. O resíduo foi purificado pela

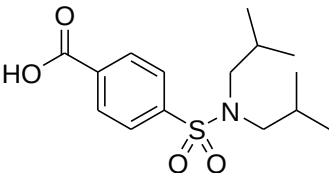
cromatografia em sílica gel (10% acetado de etila em hexanos) para produzir 4-ciano-N-(4-propoxibenzil)-N-(furan-2-ilmetil)benzenosulfonamida (500 mg, 50 %) como um sólido esbranquiçado. NMR (DMSO- d_6 , 400 MHz): δ 0.95 (t, $J=7.2$ Hz, 3H), 1.70 (m, $J=6.4$ Hz, 2H), 3.88 (t, $J=6.4$ Hz, 2H), 4.25 (s, 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).

Exemplo 5-8b : 4 N-(4-propoxibenzil)-1-(furan-2-il)metanamina:

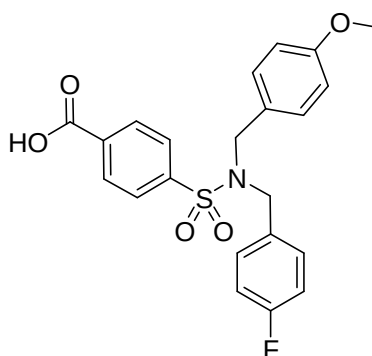
4-Propoxi benzaldeído (5 g, 31 mmol) e furfuril amina (3.9 g, 40 mmol) em uma mistura de metanol (50 mL), trimetilortoformato (10 mL) e AcOH (~1 mL) foram agitados a temperatura ambiente, sob uma atmosfera de nitrogênio por 16 horas. Borohidreto de sódio (1.4 g, 35 mmol) foi adicionado em 4 porções, por um período de 30 minutos (reação exotérmica). A reação foi agitada por um adicional de 2 horas a temperatura ambiente. O solvente foi removido no rotovapor e o resíduo tirado em acetado de etila (150 mL). A fase orgânica foi lavada com H₂O (200 mL) e a fase aquosa foi extraída com acetado de etila (2x, 100 mL). As camadas orgânicas combinadas foram concentradas e o resíduo foi purificado em sílica gel (70 % acetado de etila em hexanos com ~2% trietilamina) para produzir N-(4-propoxibenzil)-1-(furan-2-il)metanamina (5.3 g, 75 %) como um óleo amarelo. NMR (CDCl₃, 400 MHz): δ 1.03 (t, $J=7.2$ Hz, 3H), 1.79 (m, $J=6.4$ Hz, 2H), 3.71 (s, 2H), 3.76 (s, 2H), 3.90 (t, $J=6.8$ Hz, 2H), 6.17 (d, $J=3.2$ Hz, 1H), 6.32 (m, 1H), 6.85 (d, $J=8.4$ Hz, 2H), 7.22 (d, $J=8.8$ Hz, 2H), 7.37 (m, 1H).

Compostos adicionais foram experimentalmente testados e encontrados como tendo um nível relativamente alto de eficácia como inibidores de receptor amargo hT2R14. Os resultados deste teste são mostrados abaixo, na Tabela B.

Tabela B

Composto No.	Composto	hT2R14 IC ₅₀ (μM)
5-9	 Ácido 4-(N,N-diisobutilsulfamoil)benzoico	15

Exemplo 5-10: ácido 4-(N-(4-fluorobenzil)-N-(4-metoxibenzil)sulfamoil)benzoico



Benzoato de metil 4-(N-(4-fluorobenzil)-N-(4-metoxibenzil)sulfamoil) (Exemplo 5-10a) (3.7 g, 8.3 mmol) foi dissolvido em MeOH/THF (1:1.5, 30 mL) e tratado com NaOH aquoso (3 N, 15 mL). A mistura foi agitada a temperatura ambiente durante a noite, então MeOH e THF foram removidos *in vacuo*. A solução aquosa resultante foi acidificada com 6 N aq HCl to a pH de ~3 e extraída com EtOAc (3 x 40 mL). As camadas orgânicas combinadas foram lavadas com água e salmoura, secas sobre Na₂SO₄ e concentradas. O produto cru foi purificado por recristalização de EtOH para produzir ácido 4-(N-(4-fluorobenzil)-N-(4-metoxibenzil)sulfamoil)benzoico puro como um sólido branco cristalino (2.1 g, 58.6%). MS (M-H, 428.1); ¹H NMR (400MHz, DMSO-d₆): δ, ppm: 3.66 (s, 3H), 4.23 (s, 2H), 4.26 (s, 2H), 6.72 (d, 2H, J=8 Hz), 6.95 (m, 6H), 7.92 (d, 2H J=8 Hz), 8.07(d, 2H, J=8 Hz). O composto teve um IC₅₀ em receptor amargo hT2R14 de 1.97 μM.

Exemplo 5-10a: Benzoato de metil 4-(N-(4-fluorobenzil)-N-(4-metoxibenzil)sulfamoil)

Benzoato de metil 4-(N-(4-metoxibenzil)sulfamoil) (Exemplo 5-10b) (4.3 g, 12.8 mmol) foi dissolvido em acetona (70 mL). Carbonato de césio (8.57g, 25.6 mmol) e (brometo de 4-fluorobenzil (1.76 mL, 14.08 mmol) foram adicionados e a
 5 mistura foi agitada a temperatura ambiente durante a noite. Os sais inorgânicos foram filtrados e a acetona foi removida *in vacuo*. O resíduo foi redissolvido em acetado de etila, lavado com água e salmoura, então a camada orgânica foi seca sobre sulfato de magnésio e concentrada. O produto cru foi
 10 purificado por recristalização com acetado de etila/hexanos para produzir benzoato de metil 4-(N-(4-fluorobenzil)-N-(4-metoxibenzil)sulfamoil) puro (3.7 g, 65 %) como um sólido branco. ¹H NMR (400MHz, CDCl₃): δ, ppm: 3.77 (s, 3H), 3.98 (s, 3H), 4.27 (s, 2H), 4.28(s, 2H), 6.74 (d, 2H, J=8 Hz),
 15 6.92 (m, 4H), 7.03(m, 2H), 7.88 (d, 2H J=8 Hz), 8.16(d, 2H, J=8 Hz).

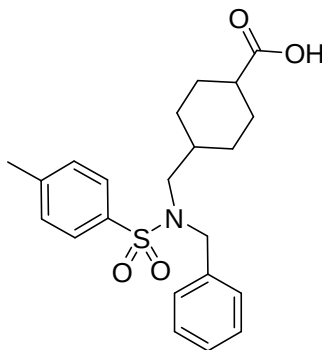
Exemplo 5-10b: Benzoato de metil 4-(N-(4-metoxibenzil)sulfamoil).

Em uma solução de benzoato de metil 4-(clorosulfonil) (Exemplo 5-10c) (4 g, 17.09 mmol) em diclorometano (40 mL) a
 20 0°C em banho de gelo, foi adicionado (4-metoxifenil)metanamina (2.56 mL, 19.65 mmol) e trietilamina (2.38 mL, 17.1 mmol). O banho de gelo foi então removido e a mistura foi permitida amornar a temperatura ambiente com
 25 agitação por um adicional de 2 horas. Depois de completa (monitorada por TLC 40 % acetado de etila/hexanos), o solvente foi removido *in vacuo*. O resíduo foi redissolvido em acetado de etila (200 mL), lavado com 1N HCl (aq, 20 mL), água (20 mL) e salmoura (20 mL) então seco sobre sulfato de
 30 magnésio. A solução foi concentrada e o produto purificado por recristalização com acetado de etila quente/hexanos para produzir benzoato de metil 4-(N-(4-metoxibenzil)sulfamoil) puro (4.3 g, 74.8 %) como um sólido branco. ¹H NMR (400MHz, DMSO-d₆): δ, ppm: 3.67 (s, 3H), 3.78 (s, 3H), 3.93 (s, 2H),
 35 6.78 (m, 2H), 7.09 (m, 2H), 7.87(m, 2H), 8.08 (m, 2H), 8.25(br, s, 1H).

Exemplo 5-10c: Benzoato de metil 4-(clorosulfonil)

Ácido 4-Clorosulfonil benzoico (5 g, 23 mmol) e cloreto de tionila (20 mL) em dicloroetano (10 mL) foi aquecido a 80°C por 2 horas. A mistura da reação foi concentrada por evaporação rotatória para dar um sólido amarronzado. O sólido foi resfriado em gelo por 5 minutos e metanol gelado (40 mL) foi adicionado com agitação a 0°C por 5 minutos. A mistura da reação foi permitida amornar a temperatura ambiente e agitada por um adicional de 10 min. A adição de água gelada (40 mL), produziu um sólido branco que foi coletado por filtragem e seco sob vácuo para produzir benzoato de metil 4-(clorosulfonil) (4.5 g, 84 %) puro. ¹H NMR (400MHz, DMSO-d₆): δ, ppm: 3.84 (s, 3H), 7.70 (d, 2H, J=8.4Hz), 7.93 (d, 2H, J=8.4Hz).

Exemplo 5-11: ácido carboxílico 4-((N-benzil-4-metilfenilsulfonamido)metil)ciclohexano-

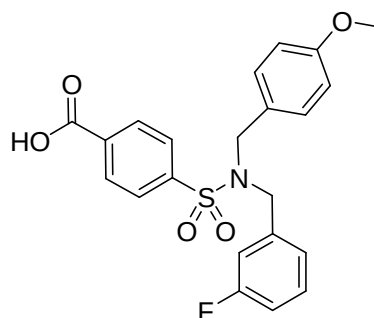


Na suspensão de 4-(aminometil)ciclohexanoácido carboxílico (1.57 g, 10 mmol) em 100 mL de 2,2-dimetoxipropano, foi adicionado HCl (10 mL, 36% aq). A mistura foi agitada a temperatura ambiente por 18 h e então concentrada. O resíduo foi dissolvido em um volume mínimo de MeOH e Dietil éter foi adicionado ao sal de HCl precipitado, de metil 4-(aminometil)ciclohexanocarboxilato como um sólido esbranquiçado. Esse material foi usado sem purificação adicional ou caracterização.

Em uma mistura do sal de HCl de metil 4-(aminometil)ciclohexanocarboxilato (208 mg, 1 mmol) em 5 mL de diclorometano, a 0°C em banho de gelo, foram adicionados

trietilamina (360 uL, 2.58 mmol) e 4-metilbenzeno-1-sulfonil
 cloreto (190 mg, 1 mmol). O banho de gelo foi permitido
 amornar lentamente a temperatura ambiente e agitado durante a
 noite. O solvente foi removido *in vacuo*. O resíduo foi
 5 redissolvido em acetado de etila (20 mL), lavado com 1N HCl
 (5 mL), água (5 mL) e salmoura (5 mL), então seco sobre
 sulfato de magnésio e concentrado. Esse produto cru (162mg,
 0.5mmol) foi redissolvido em acetona (5mL) e tratado com
 carbonato de potássio (110 mg, 0.79 mmol) e (4-
 10 fluorofenil)metanamina (1.76 mL, 14.08 mmol). A mistura foi
 agitada em um frasco de pressão a 80°C durante a noite, então
 resfriado e os sais inorgânicos foram filtrados. A acetona
 foi removida *in vacuo* e o resíduo foi redissolvido em acetado
 de etila e lavado com água seguido pela salmoura. A camada
 15 orgânica foi seca sobre sulfato de magnésio e concentrada. O
 produto cru (162 mg, 0.4 mmol) foi dissolvido em MeOH/THF
 (1:1.5, 10mL) e tratado com NaOH aquoso (10N, 400 uL). A
 mistura foi agitada at 100°C for 20 min em um micro-ondas, e
 então MeOH e THF foram removidos *in vacuo*. O resíduo foi
 20 acidificado com 6 N aq HCl a um pH de ~3 e extraído com
 EtOAc; As camada orgânicas combinadas foram lavadas com água
 e salmoura, secas sobre Na₂SO₄ e concentradas. O produto cru
 foi purificado por recristalização de EtOH para produzir 4-
 ((N-benzil-4-metilfenilsulfonamido) metil)ciclohexanoácido
 25 carboxílico puro como um sólido branco (120mg, 74%). MS (M+H,
 402); ¹H NMR (400MHz, DMSO-d₆): δ, ppm: 0.68 (m, 2H), 0.91
 (m, 2H), 1.06 (br, s, 1H), 1.50 (d, 2H), 1.72(d, 2H),
 2.0(1H), 2.41 (s, 3H), 2.86 (m, 2H), 4.21(s, 2H), 7.30(m,
 5H), 7.43(m, 2H), 7.73(m, 2H), 11.97(br, s, 1H).
 30 O composto teve um IC₅₀ em receptor amargo hT2R14 de
 0.014 µM.

Exemplo 5-12: ácido 4-(N-(3-fluorobenzil)-N-(4-metoxibenzil)sulfamoyl)benzoico

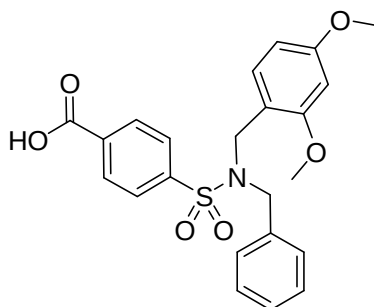


Benzoato de metil 4-(N-(4-metoxibenzil)sulfamoil) (Exemplo 5-10b) (500 mg, 1.49 mmol), brometo de 3-fluorobenzil (280 mg, 2.98 mmol), e carbonato de césio (971 mg, 2.98 mmol) foram colocados em DMF (12 mL) e agitados a 90°C por 4 horas. A solução foi resfriada a temperatura ambiente, diluída com H₂O (200 mL) e extraída com acetado de etila (3x, 100 mL). As camadas orgânicas combinadas foram secas sobre MgSO₄, filtradas e concentradas sob vácuo. O resíduo foi purificado pela cromatografia em sílica gel (10-20 % acetado de etila in hexano) para produzir metil 4-(N-(3-fluorobenzil)-N-(4-metoxibenzil) sulfamoil)benzoato (528 mg, 80 %) como um sólido branco.

Metil 4-(N-(3-fluorobenzil)-N-(4-metoxibenzil)sulfamoil)benzoato (500 mg, 1.12 mmol) foi dissolvido em MeOH/THF (1:1, 40 mL) e tratado com a solução de NaOH aquoso (10 N, 8 mL). A mistura foi agitada a temperatura ambiente durante a noite, então MeOH e THF foram removidos por evaporação rotatória. A solução aquosa resultante foi lavada com EtOAc (10 mL) e acidificada com 6 N aq HCl (~15 mL) a pH~4. A solução aquosa foi extraída com EtOAc (3x, 40 mL) e as camadas orgânicas combinadas foram lavadas com água, salmoura, secas sobre MgSO₄ e concentradas. O produto cru foi purificado por recristalização de EtOH para produzir o composto título ácido 4-(N-(3-fluorobenzil)-N-(4-metoxibenzil)sulfamoil)benzoico como um sólido branco cristalino (150 mg) em 30% rendimento.

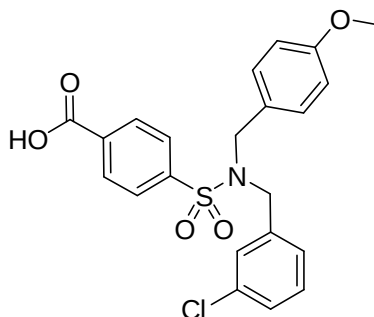
MS (M-H, 428.1); ¹H NMR (400MHz, DMSO-d₆): δ, ppm: 3.65 (s, 3H), 4.27 (s, 2H), 4.29 (s, 2H), 6.75-7.00 (m, 7H), 7.20 (m, 1H), 7.95 (d, 2H, J=8 Hz); 8.10 (d, 2H, J=8 Hz).

Exemplo 5-13: ácido 4-(N-benzil-N-(2,4-dimetoxibenzil)sulfamoil)benzoico



Preparado como no Exemplo 5-10 de (2,4-dimetoxifenil)metanamina, benzoato de metil 4-(clorosulfonil) (Exemplo 5-10c) e brometo de benzila. MS (M - H, 440.10); ¹H NMR (400MHz, DMSO-d₆): δ, ppm: 3.50(s, 6H), 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).

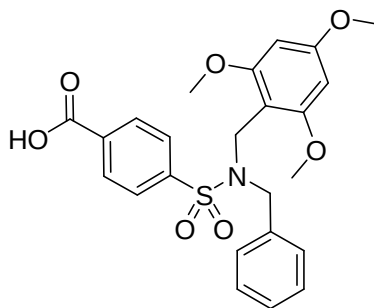
Exemplo 5-14: ácido 4-(N-(3-clorobenzil)-N-(4-metoxibenzil)sulfamoil)benzoico



Preparado como no exemplo 5 a 10 a partir de Metil 4-(N-(4-metoxibenzil)sulfamoil)benzoato (Exemplo 5-10b) e 1-(bromometil)-3-clorobenzeno. MS (M-H, 444.1); ¹H NMR (400MHz, DMSO-d₆): δ, ppm: 3,69 (s, 3H), 4,30 (m, 4H), 6,76-7,24 (m, 8H), 7,99 (m, 2H), 8,13 (m, 2H).

O composto tinha IC₅₀ em receptor amargo hT2R14 de 1.88 μM.

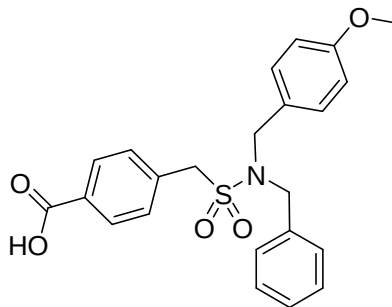
Exemplo 5-15: 4-(N-benzil-N-(2,4,6-trimetoxibenzil)sulfamoil)ácido benzoico



Preparado como no exemplo 5-10 de (2,4,6-trimetoxifenil)metanamina, metil 4-(clorosulfonil)benzoato
 5 (Exemplo 5-10c) e benzil bromido. MS (M - H, 470,10); ¹H NMR (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). Análise elementar (encontrado, %): C 61,05; H 5,49; N 2,98;
 10 (calculado, %): C61.13; H 5.34 e N 2.97

O composto tinha IC₅₀ em receptor amargo hT2R14 de 10.76 μM.

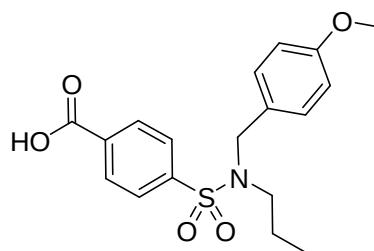
Exemplo 5-16: 4-((N-benzil-N-(4-metoxibenzil)sulfamoil)metil)ácido benzoico



15

Preparado como no exemplo 5-10 a partir de Metil 4-(N-(4-metoxibenzil)sulfamoil)benzoato (Exemplo 5-10b) e benzil bromido. MS (M-H, 424.1); ¹H NMR (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).

Exemplo 5-17: 4-(N-(4-metoxibenzil)-N-propilsulfamoil)ácido benzoico

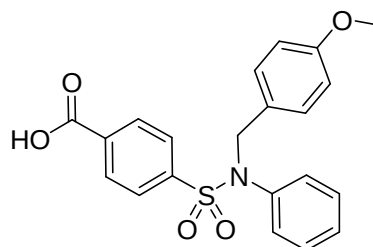


Preparado como no exemplo 5 a 10 a partir de Metil 4-(N-(4-metoxibenzil)sulfamoil)benzoato (Exemplo 5-10b) e *n*-propil bromido. MS (M-H, 362.1); ¹H NMR (400MHz, CDCl₃): δ, ppm:

5 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).

O composto tinha IC₅₀ em receptor amargo hT2R14 de 3,75 μM.

10 **Exemplo 5-18: 4-(N-(4-metoxibenzil)-N-fenilsulfamoil)**

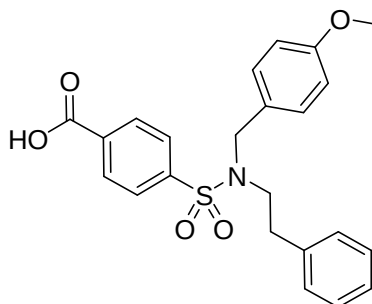


ácido benzoico

Preparado como no exemplo 5-10 a partir de aniline, metil 4-(clorosulfonil) benzoato (Exemplo 5-10c) e 1-(clorometil)-4-metoxibenzeno. MS (M - H, 396.1); ¹H NMR (400MHz, DMSO-d₆): δ, ppm: 3.66(s, 3H), 4.73(s, 2H), 6,78(d, J=8,4Hz, 2H), 7,00(d, J=7,6Hz, 2H), 7,12(d, J=8.0Hz, 2H), 7.24(d, J=8,0Hz, 2H), 8,11(d, J=8.4Hz, 2H), 13.49(s, 1H).

15

Exemplo 5-19: 4-(N-(4-metoxibenzil)-N-fenetilsulfamoil)
ácido benzoico

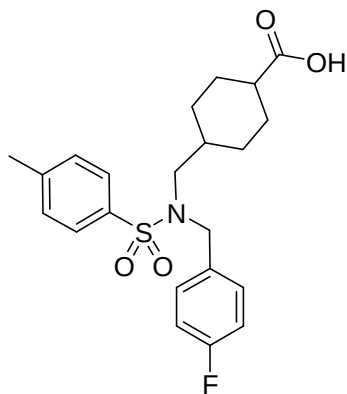


20

Preparado como no exemplo 5-10 a partir de 2-feniletanamina, metil 4-(clorosulfonil)-benzoato (Exemplo 5-10c) e 1-(clorometil)-4-metoxibenzeno. MS (M-H, 424.1); ^1H NMR (400MHz, DMSO-d₆): δ , ppm: 2,51 (m, 2H), 3,23 (m, 2H), 3,74 (s, 3H), 4,31 (s, 2H), 4,31 (s, 2H), 6,92 (m, 2H), 6,98 (m, 2H), 7,20-7,27 (m, 5H), 7,85 (m, 2H), 8,06 (m, 2H).

O composto tinha IC₅₀ em receptor amargo hT2R14 de 4.58 μM .

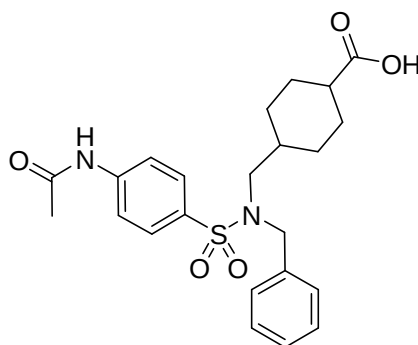
Exemplo 5-20: 4-((N-(4-fluorobenzil)-4-metilfenilsulfonamido)metil)-ciclohexanocarboxílico ácido



Preparado como no exemplo 5-11 a partir de 1-(bromometil)-4-fluorobenzeno, 4-(aminometil)ciclohexanocarboxílico ácido e 4-metilbenzeno-1-cloreto de sulfonil. MS (M+H, 420); ^1H NMR (400MHz, DMSO-d₆): δ , ppm: 0,71 (m, 2H), 0,95 (m, 2H), 1,15 (br, s, 1H), 1,51 (d, 2H), 1,76 (d, 2H), 2,0 (1H), 2,40 (s, 3H), 2,85 (m, 2H), 4,22 (s, 2H), 7.14 (m, 2H), 7.32 (m, 2H), 7,40 (m, 2H), 7,69 (m, 2H), 11,93 (br, s, 1H).

O composto tinha IC₅₀ em receptor amargo hT2R14 de 0,083 μM .

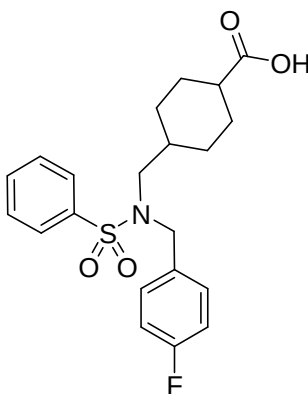
Exemplo 5-21: 4-((4-acetamido-N-benzilfenilsulfonamido)metil)-ciclohexanocarboxílico ácido



Preparado como no exemplo 5-11 a partir de acetamidobenzeno-1-cloreto de sulfonil, 4-(aminometil) ácido ciclohexanocarboxílico e benzil bromido. MS (M+H, 445.2); ¹H NMR (400MHz, DMSO-d₆): δ, ppm: 0.65 (m, 2H), 0,68 (m, 2H), 1.05 (m, 1H), 1.48 (m, 2H), 1,70 (m, 2H), 1,92 (m, 1H), 2,00 (s, 3H), 2,82 (s, 2H), 4.21 (s, 2H), 7.27 (m, 5H), 7,76(m, 4H), 7,62(m, 2H), 10,1(s, 1H), 11,93(br, s, 1H).

O composto tinha IC₅₀ em receptor amargo hT2R14 de 1,619 μM.

Exemplo 5-22: 4-((N-(4-fluorobenzil)fenilsulfonamido)metil)-ciclohexanocarboxílico ácido

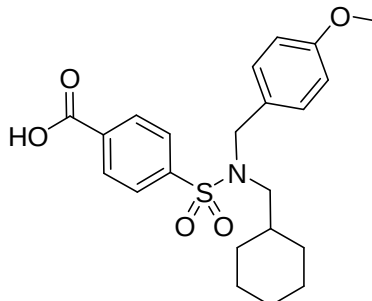


Preparado como no exemplo 5-11 a partir de benzenocloreto de sulfonil, 4-(aminometil)-ácido ciclohexanocarboxílico e 1-(bromometil)-4-fluorobenzeno. MS (M+H, 406); ¹H NMR (400MHz, DMSO-d₆): δ, ppm: 0,77 (m, 2H), 0,94 (m, 2H), 0,98 (m, 2H), 1.50 (m, 2H), 1,75 (m, 2H), 1,77 (m, 1H), 2,80 (d, 2H), 4,28 (s, 2H), 7,20 (m, 2H), 7,38(m, 2H), 7,62(m, 2H), 7,70(m, 1H), 7,88(m, 2H), 11.93(br, s, 1H).

O composto tinha IC₅₀ em receptor amargo hT2R14 de 0,240

μM.

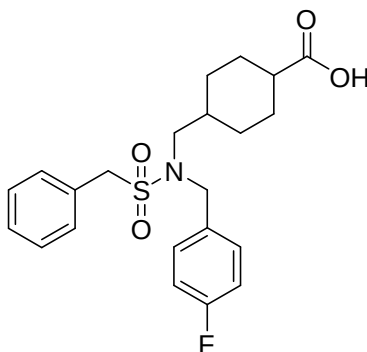
Exemplo 5-23: 4-(N-(ciclohexilmetil)-N-(4-metoxibenzil)sulfamoil)-ácido benzoico



5 Preparado como no exemplo 5-10 a partir de Metil 4-(N-(4-metoxibenzil)sulfamoil)benzoato (Exemplo 5-10b) e ciclohexilmetanamina. MS (M-H, 416,1); ¹H NMR (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).

O composto tinha IC50 em receptor amargo hT2R14 de 3,47 μM.

Exemplo 5-24: 4-((N-(4-fluorobenzil)-1-fenilmetilsulfonamido)metil)-ácido ciclohexanocarboxílico

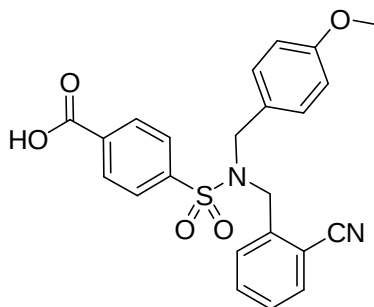


Preparado como no exemplo 5-10 a partir de fenilmethanecloreto de sulfonil e metil 4-(aminometil)ciclohexanocarboxilato e 1-(bromometil)-4-fluorobenzeno.

20 MS (M-H, 418); ¹H NMR (400MHz, DMSO-d6): δ, ppm: 0,639 (m, 2H), 0,897 (m, 2H), 1,034 (m, 1H), 1,467 (d, amplo, 2H, J=11,2Hz), 1,709 (d, amplo, 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, amplo, 1H)

O composto tinha IC50 em receptor amargo hT2R14 de 9.57 μ M.

Exemplo 5-25: 4-(N-(2-cianobenzil)-N-(4-metoxibenzil)sulfamoil) ácido benzoico



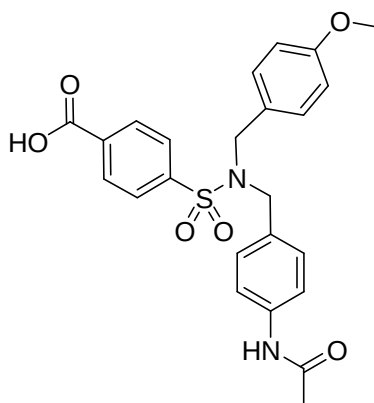
5

Preparado como no exemplo 5-10 a partir de Metil 4-(N-(4-metoxibenzil)sulfamoil)-benzoato (Exemplo 5-10b) e α -bromo-*o*-tolunitrile. MS(M-H, 435.1); ^1H NMR (400MHz, DMSO- d_6): δ , ppm: 3.664 (s, 2H), 4.348 (s, 2H), 4.498 (s, 2H), 6.728 (d, 2H, J= 8,4 Hz), 7.036 (d, 2H, j= 8,4 Hz), 7.352 (t, 2H, J=9,2Hz), 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, amplo, 1H).

O composto tinha IC50 em receptor amargo hT2R14 de 4,61 μ M.

15

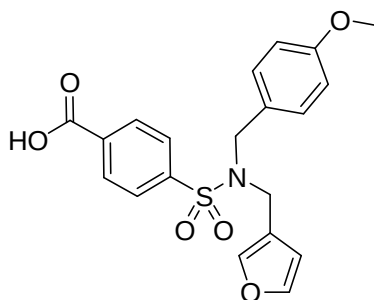
Exemplo 5-26: 4-(N-(4-acetamidobenzil)-N-(4-metoxibenzil)sulfamoil) ácido benzoico



Preparado como no exemplo 5-10 a partir de Metil 4-(N-(4-metoxibenzil)sulfamoil)benzoato (Exemplo 5-10b) e N-(4-(clorometil)fenil)acetamida. MS (M-H, 467.1); ^1H NMR (400MHz, DMSO- d_6): δ , ppm: 2,0(s, 3H), 3,69s, 3H), 4,23(s, 4H), 6,78(d, 2H, J=7.6Hz), 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).

20

Exemplo 5-27: 4-(N-(furano-3-ilmetil)-N-(4-metoxibenzil)sulfamoil)ácido benzoico



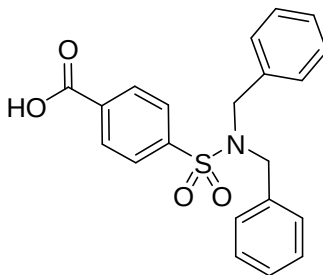
110 mg de 1-(furano-3-il)-N-(4-metoxibenzil)metanamina
 5 (exemplo 5-27a) foi misturado com metil 4-(clorosulfonil)benzoato (exemplo 5-10c) (117mg, 0,5mmol) e trietil amina (100uL) em DCM (5mL). A mistura foi mexida durante a noite em temperatura ambiente e concentrada. O resíduo foi dissolvido novamente em etil acetato (20 mL),
 10 lavado com 1N HCl (aq., 2mL), seguido por água (5mL) e água salgada (5mL) então seca por sulfato de magnésio. O produto bruto foi purificado por preparado TLC (40 % Etil Acetato/hexanos) para resultar em metil 4-(N-(furano-3-ilmetil)-N-(4-metoxibenzil)sulfamoil)benzoato como um sólido
 15 branco. Saponificação como no exemplo 5-10 gave 4-(N-(furano-3-ilmetil)-N-(4-metoxibenzil)sulfamoil)ácido benzoico como um sólido cristalino branco (68 mg, 64% rendimento). MS (M-H, 400.1); ¹H NMR (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
 20 (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).

Exemplo 5-27a: 1-(furano-3-il)-N-(4-metoxibenzil)metanamina

A mistura de 3-Furaldeído (5 mmol, 437 µL) e (4-metoxifenil)metanamina em MeOH (20 mL) foi misturada a
 25 temperatura ambiente durante a noite então sódio borohidrato (300 mg, 7,89 mmol) foi adicionado lentamente. A mistura resultante foi misturada a temperatura ambiente por 15 minutos e eliminada com NaOH (1 N, aq). O metanol foi
 30 removido *em vacuo* e a pasta fluida resultante foi dissolvida novamente em etil acetato então, lavada com água, água

salgada, seca por sódio sulfato e concentrada. A purificação por cromatografia de sílica gel (Etil acetato: Hexanos 7:3) resultou em 1-(furano-3-il)-N-(4-metoxibenzil)metanamina como um óleo. MS (M+H, 218.10); ^1H NMR (400MHz, CDCl_3): δ , ppm: 3.64(s, 2H), 3.74(s, 2H), 3.80(s, 3H), 6.39(m, 1H), 6.86(m, 1H), 6.88(m, 1H), 7.23(m, 1H), 7.25(m, 1H), 7.35(m, 1H), 7.38(m, 1H).

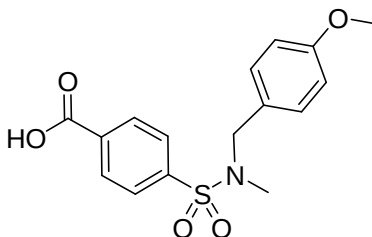
Exemplo 5-28: 4-(N,N-dibenzilsulfamoil)ácido benzoico



Preparado como no exemplo 5-27 a partir de dibenzilamina e metil 4-(clorosulfonil)-benzoato (Exemplo 5-10c). MS (M-H, 380.1); ^1H NMR (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, amplo, 1H).

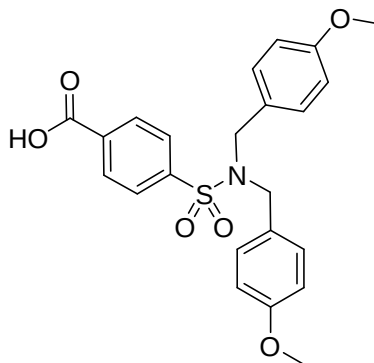
O composto tinha IC_{50} em receptor amargo hT2R14 de 7,74 μM .

Exemplo 5-29: 4-(N-(4-metoxibenzil)-N-metilsulfamoil)ácido benzoico



Preparado como no exemplo 5-27 a partir de 1-(4-metoxifenil)-N-metilmetanamina e metil 4-(clorosulfonil)-benzoato (Exemplo 5-10c). MS (M-H, 335.1); ^1H NMR (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). Análise elementar: (encontrado): C 57.47%, H 4.77% e N 4.31%; (teórico): C 57.30%, H 5.11% e N 4.18%

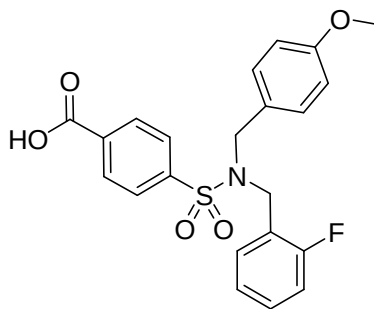
Exemplo 5-30: 4-(N,N-bis(4-metoxibenzil)sulfamoil)ácido

benzoico

Preparado como no exemplo 5-27 a partir de bis(4-metoxibenzil)amina e metil 4-(clorosulfonil)-benzoato (Exemplo 5-10c). MS (M-H, 440.1); ^1H NMR (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). Análise elementar: (encontrado): C 62,45%, H 5,19% e N 3,06%; (teórico): C 62,57%, H 5,25% e N 3,17%

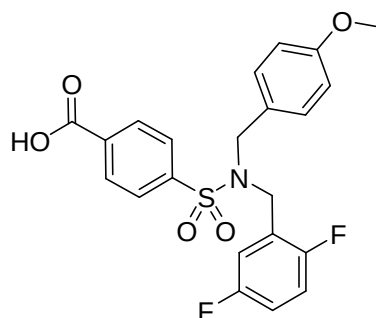
O composto tinha IC₅₀ em receptor amargo hT2R14 de 4,14 μM .

Exemplo 5-31: 4-(N-(2-fluorobenzil)-N-(4-metoxibenzil)sulfamoil)ácido benzoico



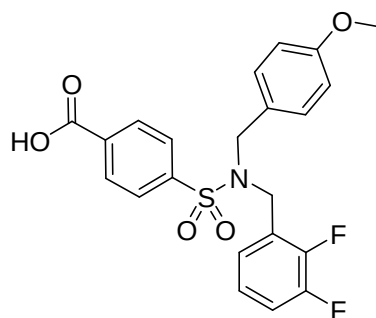
Preparado como no exemplo 5-10 a partir de Metil 4-(N-(4-metoxibenzil)sulfamoil)-benzoato (Exemplo 5-10b) e 1-(bromometil)-2-fluorobenzeno. ^1H NMR (400MHz, DMSO-d₆): δ , ppm: 3,66 (s, 3H), 4,29 (s, 2H), 4,37 (s, 2H), 6,72 (d, 2H, J=8 Hz), 7,01-7,03 (m, 6H), 7,93 (d, 2H, J=8 Hz), 8,08 (d, 2H, J=8Hz).

Exemplo 5-32: 4-(N-(2,5-difluorobenzil)-N-(4-metoxibenzil)sulfamoil)-ácido benzoico



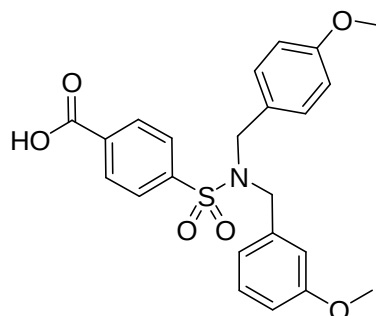
Preparado como no exemplo 5-10 a partir de Metil 4-(N-(4-metoxibenzil)sulfamoil)-benzoato (Exemplo 5-10b) e 2-(bromometil)-1,4-difluorobenzeno. ^1H NMR (400MHz, DMSO- d_6):
 5 δ , ppm: 3,66 (s, 3H), 4,31 (s, 2H), 4,33 (s, 2H), 6,74-7.06 (m, 7H), 7,95 (d, 2H, $J=8$ Hz), 8,09 (d, 2H, $J=8$ Hz).

Exemplo 5-33: 4-(N-(2,3-difluorobenzil)-N-(4-metoxibenzil)sulfamoil)ácido benzoico



10 Preparado como no exemplo 5-10 a partir de Metil 4-(N-(4-metoxibenzil)sulfamoil)-benzoato (Exemplo 5-10b) e 1-(bromometil)-2,3-difluorobenzeno. ^1H NMR (400MHz, DMSO- d_6):
 δ , ppm: 3,30 (s, 3H), 4,29 (s, 2H), 4,32 (s, 2H), , 6,87 (d, 2H, $J=8$ Hz), 7,02-7.20 (m, 5H), 7,95 (d, 2H, $J=8$ Hz). 8,05 (d,
 15 2H, $J=8$ Hz).

Exemplo 5-34: 4-(N-(3-metoxibenzil)-N-(4-metoxibenzil)sulfamoil)-ácido benzoico

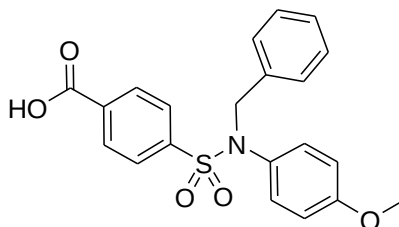


20 Preparado como no exemplo 5-10 a partir de Metil 4-(N-

(4-metoxibenzil)sulfamoil)benzoato (Exemplo 5-10b) e 3-metoxibenzil bromido. MS (M - H, 440.50); ^1H NMR (400MHz, DMSO-d₆): δ , ppm: 3,58(s, 3H), 3,68(s, 3H), 4,24(s, 2H), 4,25(s, 2H), 6,50(s, 1H), 6,64(d, J = 4 Hz, 1H), 6,73(m, 1H), 6,77(d, J = 8 Hz, 2H), 7,00(d, J = 8 Hz, 2H), 7,12(t, J=8 Hz, 1H), 7,94(d, J=8 Hz, 2H), 8,09(d, J=8 Hz, 2H), 13,49(s, 1H).

O composto tinha IC₅₀ em receptor amargo hT₂R₁₄ de 2,46 μM .

Exemplo 5-35: 4-(N-benzil-N-(4-metoxifenil)sulfamoil)ácido benzoico

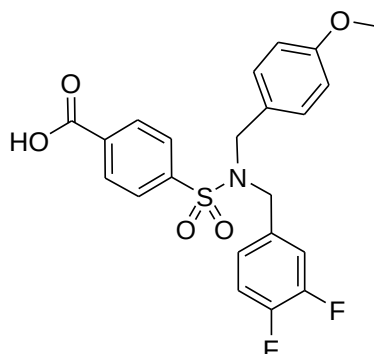


Preparado como no exemplo 5-10 a partir de Metil 4-(N-(4-metoxifenil)sulfamoil)-benzoato (exemplo 5-35a) e benzil bromido MS (M - H, 396); ^1H NMR (400MHz, DMSO-d₆): δ , ppm: 3,66(s, 3H), 4,75(s, 2H), 6,76(d, J = 8 Hz, 2H), 6,90(d, J = 8 Hz, 2H), 7,23(m, 5H), 7,74(d, J = 8 Hz, 2H), 8,11(d, J = 8 Hz, 2H), 13,51(s, 1H).

Exemplo 5-35a: Metil 4-(N-(4-metoxifenil)sulfamoil)benzoato

Para 4-metoxibenzenamina (580 mg, 4.71 mmol) e trietilamina (1.48 mL, 10.7 mmol) em diclorometano (10 mL) foi adicionado metil 4-(clorosulfonil)benzoato (1.00 g, 4.28 mmol). A mistura foi misturada por 16 horas a temperatura ambiente. A reação foi diluída com diclorometano (50 mL) e lavada consecutivamente com água, 10 % ácido cítrico, e água salgada. Os orgânicos foram secos por sódio sulfato e concentrado via evaporador rotativo. O material bruto resultante foi cromatografado em sílica gel usando 100 % de diclorometano as eluente disponível Metil 4-(N-(4-metoxifenil)sulfamoil)benzoato como um sólido cristalino branco (400 mg, 30 % rendimento)

Exemplo 5-36: 4-(N-(3,4-difluorobenzil)-N-(4-metoxibenzil)sulfamoil)ácido benzoico



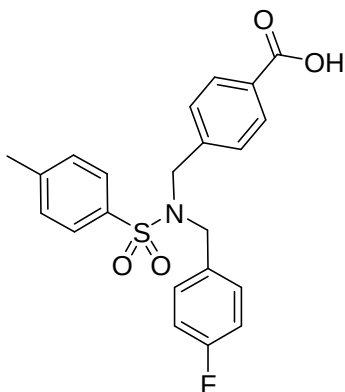
Preparado como no exemplo 5-10 a partir de N-(3,4-difluorobenzil)(4-metoxifenil)-metanamina (exemplo 5-36a) e metil 4-(clorosulfonil)benzoato (exemplo 5-10c). MS (M - H, 446); ¹H NMR (400MHz, DMSO-d₆): δ ppm: 3,69 (s, 3H), 4,20 (s, 4H), 6,73 (d, J = 8,8 Hz, 2H), 6,93 (m, 2H), 6,98 (d, J = 8,8 Hz, 2H), 7,22 (m, 1H), 7,74 (d, J = 8,4 Hz, 2H), 7,99 (d, J = 8,4 Hz, 2H).

Exemplo 5-36a: N-(3,4-difluorobenzil)(4-metoxifenil)metanamina

Para (4-metoxifenil)metanamina (1,77 mL, 13,6 mmol) e ácido acético (2,7 mL, 45 mmol) em diclorometano (15 mL) foi adicionado 3,4-difluorobenzaldeído (1,0 mL, 9,08 mmol). A mistura foi aquecida em micro-ondas a 100 °C por 15 min. A reação foi resfriada em temperatura ambiente e a resina de hidreto de ciano boro macroporosa (9,8 g, 22,7 mmol) foi adicionada em porções. A mistura foi misturada a temperatura ambiente por 16 horas. A resina foi filtrada e enxaguada com diclorometano e os orgânicos foram lavados com bicarbonato de sódio saturado até a borbulha cessar. Os orgânicos foram secos por sulfato de sódio e concentrado via rotovap. O material bruto resultante foi purificado por cromatografia de sílica gel usando gradiente de metanol diclorometano como eluente para fornecer N-(3,4-difluorobenzil)(4-metoxifenil)metanamina como um óleo amarelado (1,9 g, 80 % rendimento). MS (M + H, 264); ¹H NMR (400MHz, DMSO-d₆): δ, ppm: 2,63 (br s, 1H), 3,56 (s, 2H), 3,61 (s, 2H), 3,71 (s,

3H), 6,84 (d, $J = 8,8$ Hz, 2 H), 7,14 (m, 1H), 7,21 (d, $J = 8,4$ Hz, 2H), 7,34 (m, 2H).

Exemplo 5-37: 4-((N-(4-fluorobenzil)-4-metilfenilsulfonamido)metil)ácido benzoico

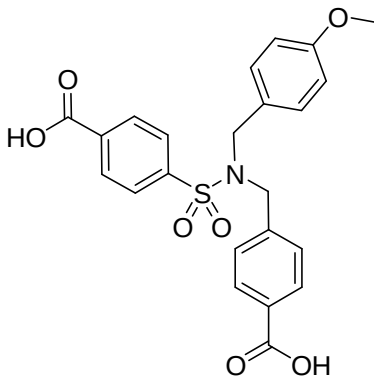


5

Preparado como no exemplo 5-11 a partir de 4-(aminometil) ácido fenilcarboxílico, 4-metilbenzeno-1-cloreto de sulfonil e 4-fluorobenzil bromido. ^1H NMR (400MHz, DMSO- d_6): δ , ppm: 3,11 (s, 3H), 4,21 (s, 2H), 4,24 (s, 2H), 6,94-7,08 (m, 6H), 7,40-7,42 (d, 2H, $J = 8\text{Hz}$), 7,63 (d, 2H, $J = 8\text{Hz}$), 7,73 (d, 2H, $J = 8\text{Hz}$)

O composto tinha IC_{50} em receptor amargo hT2R14 de 0,054 μM .

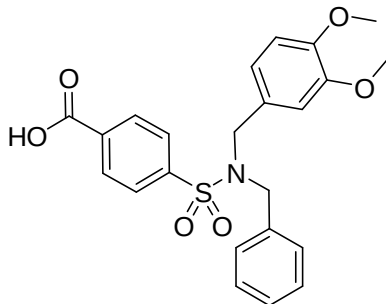
Exemplo 5-38: 4-((4-carboxi-N-(4-metoxibenzil)fenilsulfonamido)metil)-ácido benzoico



Preparado como no exemplo 5-10 a partir de metil 4-(bromometil)benzoato e Metil 4-(N-(4-metoxibenzil)sulfamoyl)benzoato (exemplo 5-10b). ^1H NMR (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=8Hz).

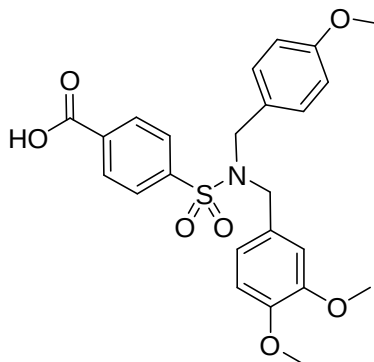
Exemplo 5-39: 4-(N-benzil-N-(3,4-dimetoxibenzil)sulfamoil)ácido benzoico



Preparado como no exemplo 5-10 a partir de (3,4-dimetoxifenil)metanamina, metil 4-(clorosulfonil)benzoato (Exemplo 5-10c) e cloreto de benzila. MS (M - H, 440,10); ¹H NMR (400MHz, CD₃OD): 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 Hz), 6,60 (m, 1H), 6,76 (d, 1H, J= 8,2 Hz), 7,12 (m, 2H), 7,21 (m, 3H), 7,95 (d, 2H, J = 8,6 Hz), 8,18 (d, 2H, J = 8,6 Hz).

O composto tinha IC₅₀ em receptor amargo hT2R14 de 0.678 μM.

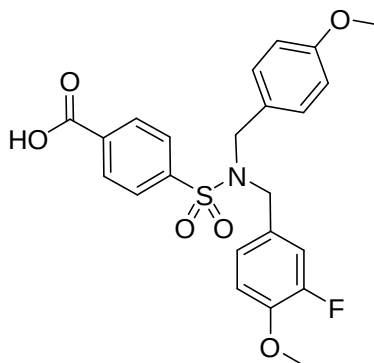
Exemplo 5-40: 4-(N-(3,4-dimetoxibenzil)-N-(4-metoxibenzil)sulfamoil)ácido benzoico



Preparado como no exemplo 5-10 a partir de (3,4-dimetoxifenil)metanamina, metil 4-(clorosulfonil)benzoato (Exemplo 5-10c) e 4-metoxibenzilbromido. MS (M - H, 470,10); ¹H NMR (400MHz, DMSO-d₆): 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, J₁ = 8,2 Hz, J₂ = 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).

O composto tinha IC50 em receptor amargo hT2R14 de 1,47 μ M.

Exemplo 5-41: 4-(N-(3-fluoro-4-metoxibenzil)-N-(4-metoxibenzil)sulfamoil)-ácido benzoico



5

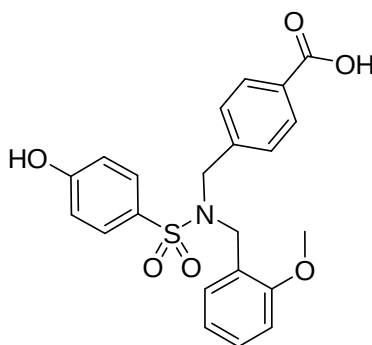
Preparado como no exemplo 5-10 a partir de 4-(bromometil)-2-fluoro-1-metoxibenzeno e metil 4-(N-(4-metoxibenzil)sulfamoil)benzoato (exemplo 5-10b). MS (M - H, 458,10); ^1H NMR (400MHz, CD_3OD): δ , ppm: 3,73 (s, 3H), 3,80 (s, 3H), 4,24 (s, 2H), 4,28 (s, 2H), 6,75 (m, 4H), 6,88 (m, 1H), 6,97 (d, 2H, J= 8,6 Hz), 7,88 (d, 2H, J= 8,3 Hz), 8,14 (d, 2H, J= 8,3 Hz).

10

O composto tinha IC50 em receptor amargo hT2R14 de 1,11 μ M.

15

Exemplo 5-42: 4-((4-hidróxi-N-(2-metoxibenzil)fenilsulfonamido)metil)-ácido benzoico



20

4-(N-(2-metoxibenzil)sulfamoil)fenil acetato (exemplo 5-42a) (50 mg, 0,15 mmol) foi dissolvido em acetona (1,0 mL) seguido pela adição de carbonato de cézio (97 mg, 0,30 mmol) e metil 4-(bromometil)benzoato (38 mg, 0,17 mmol). A mistura foi misturada a temperatura ambiente durante a noite e então os sais orgânicos foram filtrados. A acetona foi removida a vácuo e o resíduo foi dissolvido novamente em etil acetato e

lavado com água seguido por água salgada. A camada orgânica foi seca por sulfato de magnésio e concentrada. O produto bruto foi purificado por cromatografia em coluna com etil acetato/hexanos como o eluente para resultar em metil 4-((4-acetóxi-N-(2-metoxibenzil)fenilsulfonamido)metil)benzoato.

O metil 4-((4-acetóxi-N-(2-metoxibenzil)fenilsulfonamido)metil)benzoato (bruto) foi dissolvido em THF (1,0 mL) e tratado com NaOH aquoso (1N, 2,0 mL, 2,0 mmol). A mistura foi refluída por uma hora. Ao completar o THF foi removido a vácuo e a solução aquosa resultante foi acidificada com 6 N aq HCl para um pH of ~3. A fase aquosa foi extraída com EtOAc (2 x 15 mL) e as camadas orgânicas combinadas foram lavadas com água, água salgada, secas sobre Na₂SO₄ e concentradas. O produto bruto foi purificado por HPLC em fase reversa para resultar em 10,8mg do composto de título (15% de rendimento após duas etapas). MS (M-H, 426,1); ¹H NMR (400MHz, acetona-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).

O composto tinha IC₅₀ em receptor amargo hT2R14 de 2,56 μM.

Exemplo 5-42a: 4-(N-(2-metoxibenzil)sulfamoil)fenil acetato

A solução de 4-(clorosulfonil)fenil acetato (exemplo 5-42b) (531 mg, 2,265 mmol) em 5,0 mL de diclorometano, foi esfriada a 0 °C em banho de gelo. (2-metoxifenil)metanamina (325 μL, 2,492 mmol) e trietilamina (347 μL, 2,492 mmol) foi adicionada. O banho em gelo foi então removido e a mistura aquecida à temperatura ambiente e mexida por 2 horas. A mistura da reação foi concentrada e o produto bruto foi purificado por cromatografia em coluna (hexanos/etil acetato = 90/10 para 30/70) para produzir puro 4-(N-(2-metoxibenzil)sulfamoil)fenil acetato (743 mg, 89 %) como um sólido branco. MS (M+H, 336.1) ¹H NMR (400MHz, CDCl₃): δ, ppm: 2,32 (s, 3H), 3.71 (s, 3H), 4,18 (d, 2H, J = 5,8 Hz),

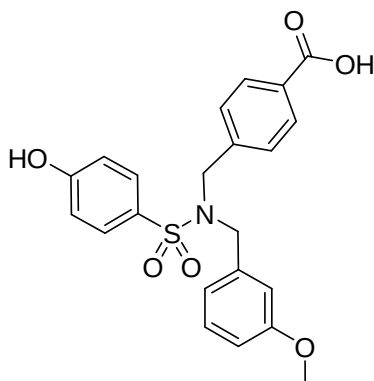
5,15 (t, 1H, J = 5,8 Hz), 6,71 (d, 1H, J = 8,2 Hz), 6,82 (br t, 1H, J = 7,4 Hz), 7,07 (br d, 1H, J = 7,4 Hz), 7,10 (d, 2H, J = 8,7 Hz), 7,19 (br t, 1H, J = 7,8 Hz), 7,74 (d, 2H, J = 8,7 Hz).

5 **Exemplo 5-42b: 4-(clorosulfonil)fenil acetato**

6.285 g (36,08 mmol) de ácido hidroxibenzenosulfônico-4 foi dissolvido na mistura de 30 mL de anidrido acético e 15 mL de ácido acético e refluído por 6 horas. Os voláteis foram evaporados e colocados sob alto-vácuo durante a noite. O
10 bruto product resultante foi dissolvido em 100 mL de DCM e tratado com 4,72 mL de cloreto de oxalila (54,12 mmol) e 139 µL de DMF (1,804 mmol) a 0°C. O movimento foi continuado até que a evolução do gás parou então a reação foi concentrada e dissolvida novamente em EtOAc. A camada orgânica foi lavada
15 duas vezes com 2 NH₂SO₄, e seca com água salgada e MgSO₄. A concentração resultou em 7,067g de 4-(clorosulfonil) fenil acetato como um óleo espesso que eventualmente se solidificou (83% rendimento após duas etapas).

¹H-NMR (400MHz, CDCl₃): δ, ppm: 2,35 (s, 3H), 7,37 (d, 2H, J = 8,9 Hz), 8,06 (d, 2H, J = 8,9 Hz). ¹³C-NMR (100 MHz, CDCl₃): δ, ppm: 21,13, 123,05, 128,91, 141,15, 155,80, 168,29.

Exemplo 5-43: 4-((4-hidroxi-N-(3-metoxibenzil)fenilsulfonamido)metil)-ácido benzoico



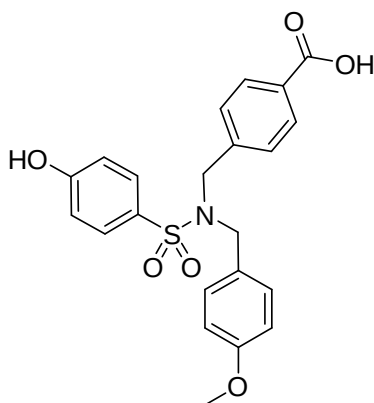
25

Preparado como no exemplo 5-42 a partir de (3-metoxifenil)metanamina e metil 4-(bromometil)benzoato. MS (M - H, 426,10); ¹H NMR (400MHz, acetona-d₆): 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).

O composto tinha IC50 em receptor amargo hT2R14 de 0,188 μ M.

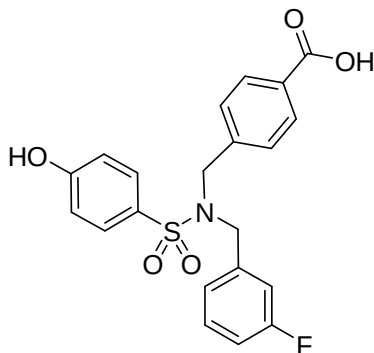
Exemplo 5-44: 4-((4-hidróxi-N-(4-metoxibenzil)fenilsulfonamido)metil)-ácido benzoico



Preparado como no exemplo 5-42 a partir de (4-metoxifenil)metanamina e metil 4-(bromometil)benzoato. MS (M - H, 426.10); ^1H NMR (400MHz, acetona- 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).

O composto tinha IC50 em receptor amargo hT2R14 de 3,43 μ M.

Exemplo 5-45: 4-((N-(3-fluorobenzil)-4-hidroxifenilsulfonamido)metil)ácido benzoico

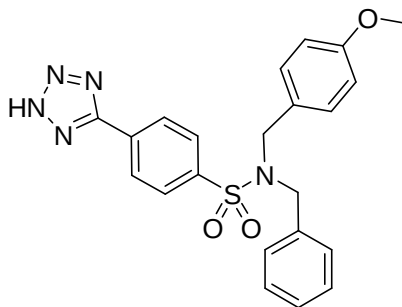


Preparado como no exemplo 5-42 a partir de (3-fluorofenil)metanamina e metil 4-(bromometil)benzoato. MS (M - H, 414.1), ^1H NMR (400MHz, acetona- d_6): δ , ppm: 4,37 (s, 2H), 4,42 (s, 2H), 6,94 (m, 3H), 7,06 (d, 2H, J = 8,3 Hz),

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).

O composto tinha IC50 em receptor amargo hT2R14 de 0,459 μ M.

5 **Exemplo 5-46: N-benzil-N-(4-metoxibenzil)-4-(1H-tetrazol-5-il)benzeno-sulfonamida**



N-benzil-4-ciano-N-(4-metoxibenzil)benzenosulfonamida (exemplo 5-46a, 400 mg, 1 mmol) e trimetiltina azida (400 mg, 2 mmol) foi dissolvido em tolueno (10 mL) e aquecido em micro-ondas a 150°C por 3 horas. Dois adicionais equivalentes de trimetiltina azida foram adicionados e a reação foi aquecida em micro-ondas a 150°C por mais 3 horas. A mistura foi esfriada e filtrada para resultar em bruto tin tetrazole que foi hidrolizado em MeOH/conc HCl (50 mL:20 mL). Água foi adicionada e o precipitado resultante foi coletado por filtração. O produto foi recristalizado com etanol absoluto e água para fornecer N-benzil-N-(4-metoxibenzil)-4-(1H-tetrazol-5-il)benzeno-sulfonamida como um sólido branco. MS (M + H, 436.10); ¹H NMR (400MHz, DMSO-d₆): δ , ppm: 3,65(s, 3H), 4,27(s, 2H), 4,30(s, 2H), 6,75(d, J = 8,4 Hz, 2H), 6,98(d, J = 8,4 Hz, 2H), 7,08(m, 2H), 7,20(m, 3H), 8,05(d, J = 8,4 Hz, 2H), 8,22(d, J = 9,2 Hz, 2H).

O composto tinha IC50 em receptor amargo hT2R14 de 3,67 μ M.

25 **Exemplo 5-46a: N-benzil-4-ciano-N-(4-metoxibenzil)benzenosulfonamida.**

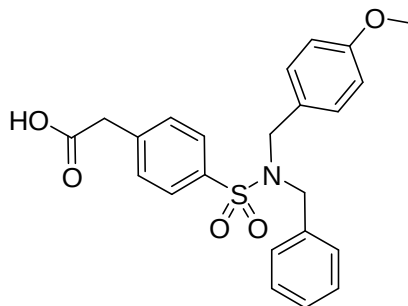
4-cianobenzeno-1-cloreto de sulfonil (600 mg, 3 mmol) foi adicionado a uma solução de N-benzil-1-(4-metoxifenil)metanamina (exemplo 5-46b, 750 mg, 3.3 mmol) e

triethylamina (500 mg, 3.6 mmol) em diclorometano (15 mL). A reação foi misturada à temperatura ambiente por 4 horas, então concentrada no evaporador rotativo. O bruto foi purificado em sílica gel para fornecer N-benzil-4-ciano-N-(4-metoxibenzil)benzeno-sulfonamida como um sólido branco. ¹H NMR (400MHz, DMSO-d₆): δ, ppm: 3,68(s, 3H), 4,26(s, 2H), 4,31(s, 2H), 6,75(d, J = 8,4 Hz, 2H), 6,97(d, J = 9,2 Hz, 2H), 7,07(m, 2H), 7,21(m, 3H), 7,98(d, J = 8,4 Hz, 2H), 8,04(d, J = 8,8 Hz, 2H).

Exemplo 5-46b: N-benzil-1-(4-metoxifenil)metanamina.

4-metoxibenzaldeído (5 g, 35 mmol) e benzilamina (3.8 g, 35 mmol) foram adicionados ao sódio triacetoxiborohidrato (10.4 g, 49 mmol) em dicloroetano (125 mL). A reação foi misturada à temperatura ambiente por 2 horas, então concentrada. A mistura foi diluída com diclorometano (200 mL), lavada com carbonato de hidrogênio de sódio aquoso saturado (200 mL), água salgada (200 mL) e seco por sulfato de magnésio. A amina bruta foi concentrada e purificada por cromatografia de sílica gel (70% etil acetato em hexanos) para produzir N-benzil-1-(4-metoxifenil)metanamina como um óleo. ¹H NMR (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).

Exemplo 5-47: 2-(4-(N-benzil-N-(4-metoxibenzil)sulfamoyl)fenil)ácido acético.



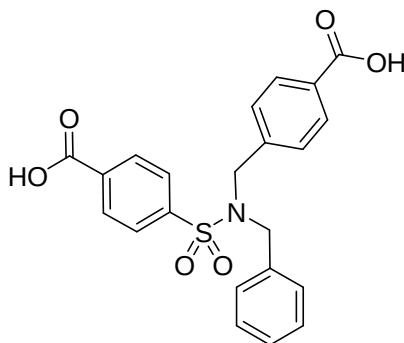
Preparado como no exemplo 5-27 a partir de Metil 2-(4-(clorosulfonil)fenil)acetato (exemplo 5-47a), 4-metoxibenzaldeído e benzilamina. MS (M - H, 424.10); ¹H NMR (400MHz, DMSO-d₆): δ, ppm: 3,66(s, 3H), 3,72(s, 2H), 4,18(s, 2H), 4,22(s, 2H), 6,73(d, J = 8,4 Hz, 2H), 6,91(d, J = 8,4

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).

Exemplo 5-47a: Metil 2-(4-(clorosulfonil)fenil)acetato.

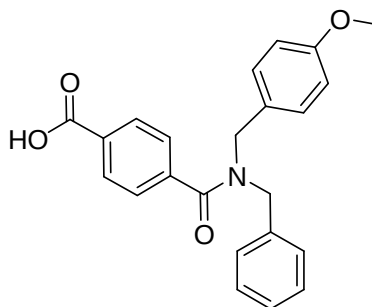
2-(4-(clorosulfonil)fenil)ácido acético (600 mg, 2.6 mmol) foi adicionado ao cloreto de tionil (3 mL) e aquecido a 80°C por 1 hora. A mistura da reação foi concentrada, esfriada a 0°C em um banho de gelo e Metanol gelado foi adicionado gota à gota. A mistura foi misturada por 30 minutos e concentrada para fornecer Metil 2-(4-(clorosulfonil)fenil)-acetato como um óleo. ¹H NMR (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).

Exemplo 5-48: 4-((N-benzil-4-carboxifenilsulfonamido)metil)ácido benzoico.



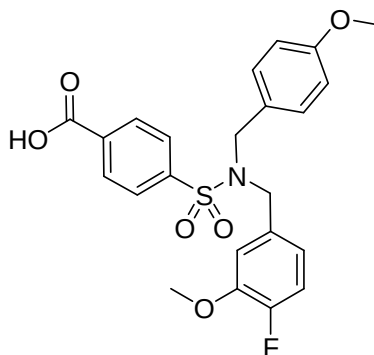
Preparado como no exemplo 5-10 a partir de metil-4-(clorosulfonil) benzoato (exemplo 5-10c), benzil amina e metil 4-(bromometil)benzoato MS (M + H, 426.10); ¹H NMR (400MHz, DMSO-d₆): δ, ppm: 4,29(s, 2H), 4,34(s, 2H), 7,03(m, 2H), 7,12(m, 2H), 7,68(d, J = 8 Hz, 2H), 7,94(d, J = 8,8 Hz, 2H), 8,06(d, J = 8,8 Hz, 2H), 13,03(s, 2H).

Exemplo 5-49: 4-(benzil(4-metoxibenzil)carbamoil)ácido benzoico



Preparado como no exemplo 5-27 a partir de 4-(clorocarbonil)benzoato e N-benzil-1-(4-metoxifenil)metanamina. ^1H NMR (400MHz, DMSO- d_6): δ , ppm: 3,72(d, J = 7,6 Hz, 3H), 4,26(s, 1H), 4,30(s, 1H), 4,50(s, 1H), 4,55(s, 1H), 6,89(m, 2H), 7,02(m, 1H), 7,10(m, 1H), 7,10(m, 1H), 7,20(m, 1H), 7,28(m, 4H), 7,55(m, 2H), 7,96(m, 2H), 13,13(s, 1H).

Exemplo 5-50: 4-(N-(4-fluoro-3-metoxibenzil)-N-(4-metoxibenzil)sulfamoil)-ácido benzoico



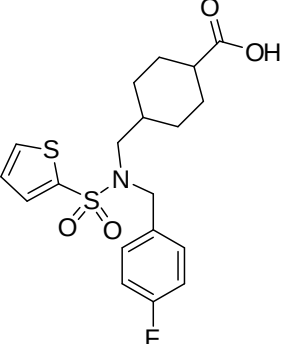
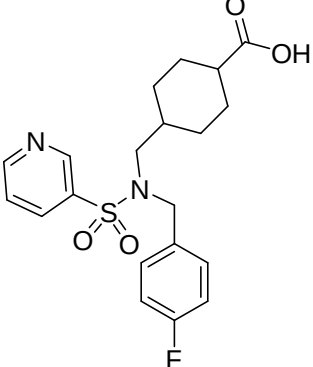
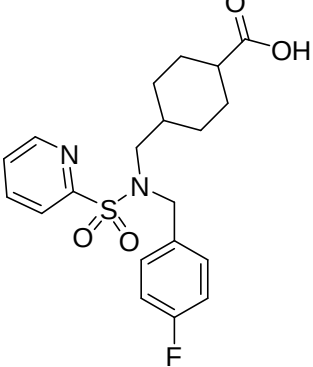
Preparado como no exemplo 5-10 a partir de 4-(bromometil)-4-fluoro-3-metoxibenzeno e metil 4-(N-(4-metoxibenzil)sulfamoil)benzoato (exemplo 5-10b). MS (M - H, 458,10); ^1H NMR (400MHz, DMSO- d_6): δ , ppm: 3,59(s, 3H), 3,67(s, 3H), 4,25(s, 2H), 4,25(s, 2H), 6,62(m, 2H), 6,77(d, J = 8,4 Hz, 2H), 7,02(m, 3H), 7,97(d, J = 8 Hz, 2H), 8,01(d, J = 8,8 Hz, 2H), 13,49(s, 1H).

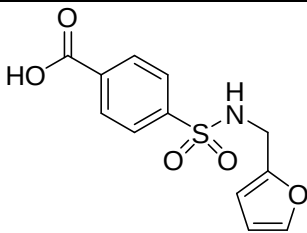
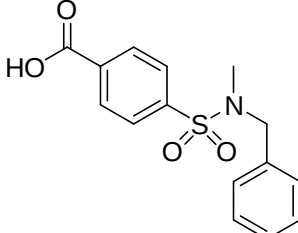
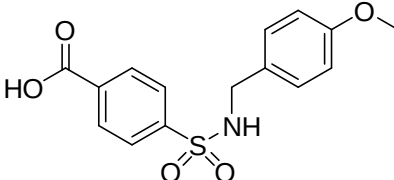
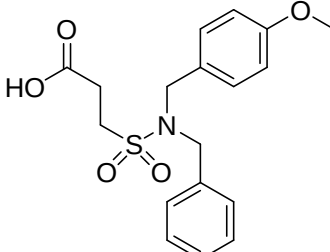
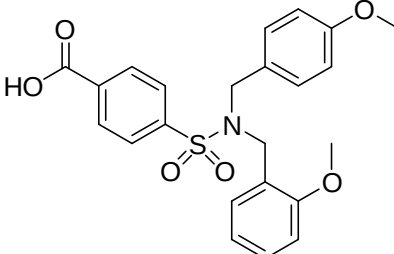
O composto tinha IC_{50} em receptor amargo hT2R14 de 1,65 μM .

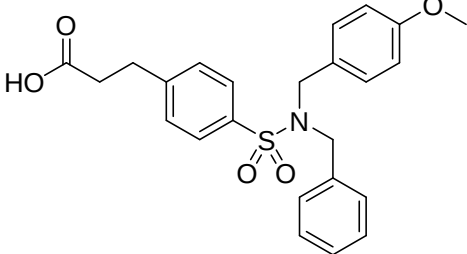
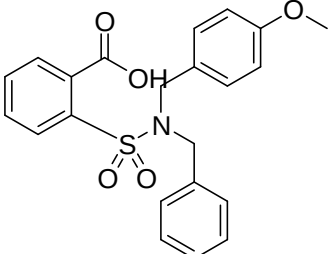
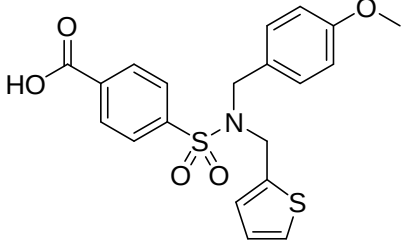
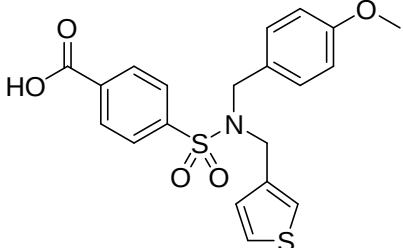
Os compostos adicionais foram testados experimentalmente e foi percebido ter um nível relativamente alto de eficácia como inibidor de receptor amargo hT2R14. Os resultados deste teste são mostrados abaixo na Tabela C.

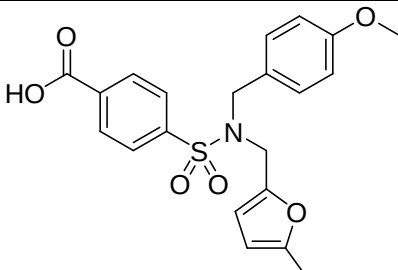
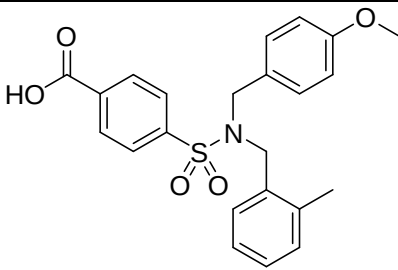
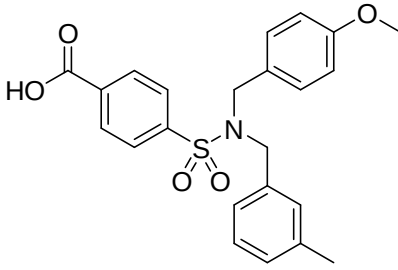
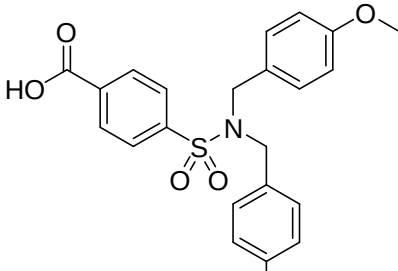
Tabela C

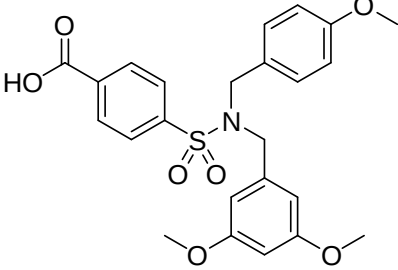
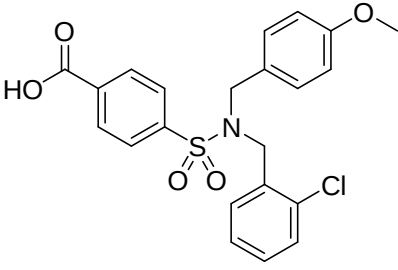
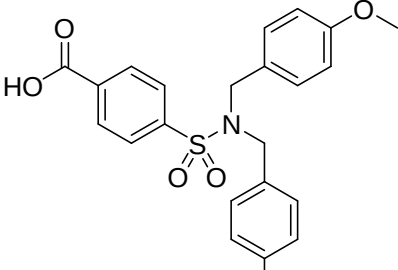
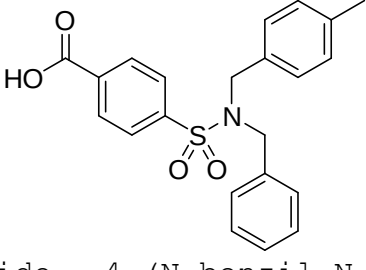
Composto No.	Composto	hT2R14 IC_{50} (μM)

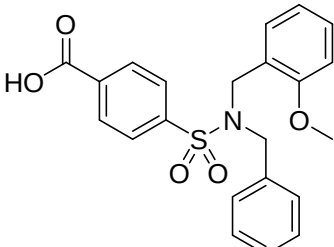
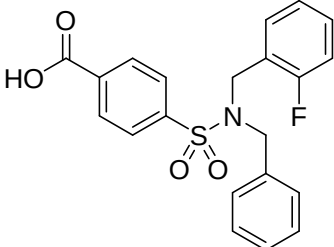
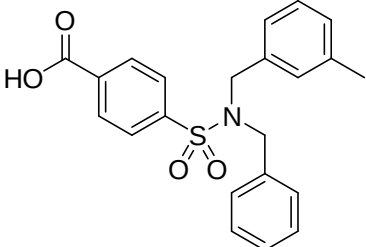
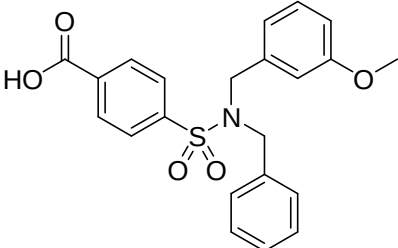
5-51	 Ácido 4-((N-(4-fluorobenzil)tiofeno-2-sulfonamido)metil)ciclohexanocarboxílico	0.342
5-52	 Ácido 4-((N-(4-fluorobenzil)piridina-3-sulfonamido)metil)ciclohexanocarboxílico	8.434
5-53	 Ácido 4-((N-(4-fluorobenzil)piridina-2-sulfonamido)metil)ciclohexanocarboxílico	

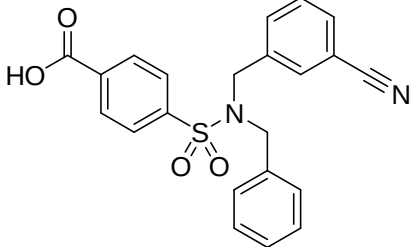
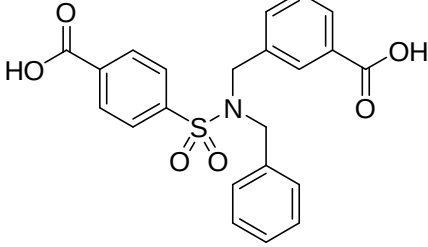
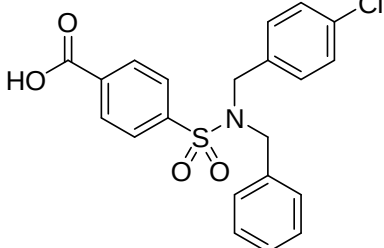
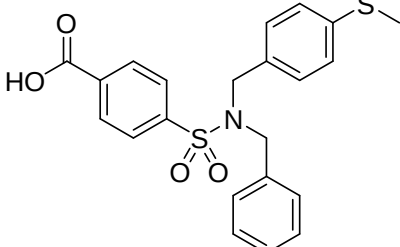
5-54	 Ácido 4-(N-(furano-2-ilmetil)sulfamoil)benzoico	
5-55	 Ácido 4-(N-benzil-N-metilsulfamoil)benzoico	
5-56	 Ácido 4-(N-(4-metoxi benzil)sulfamoil)benzoico	
5-57	 Ácido 3-(N-benzil-N-(4-metoxibenzil)sulfamoil)propanóico	
5-58	 Ácido 4-(N-(2-metoxibenzil)-N-(4-metoxibenzil)sulfamoil)benzoico	2.943

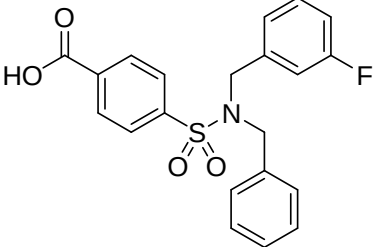
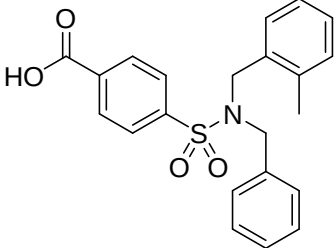
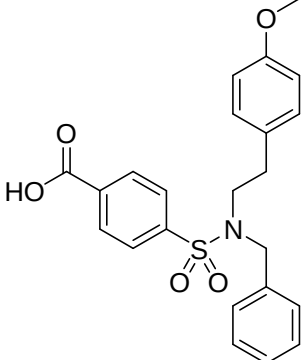
Composto No.	Composto	hT2R14 IC ₅₀ (μM)
5-59	 Ácido 3-(4-(N-benzil-N-(4-metoxibenzil)sulfamoil)fenil)propanóico	
5-60	 Ácido 2-(N-benzil-N-(4-metoxibenzil)sulfamoil)benzoico	
5-61	 Ácido 4-(N-(4-metoxibenzil)-N-(tiofen-2-ilmetil)sulfamoil)benzoico	
5-62	 Ácido 4-(N-(4-metoxibenzil)-N-(tiofen-3-ilmetil)sulfamoil)benzoico	

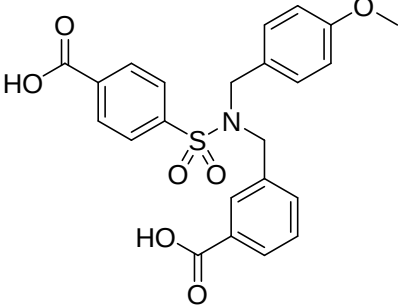
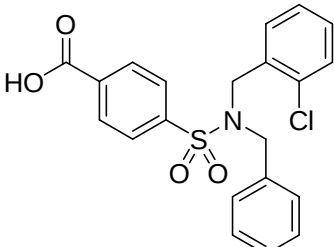
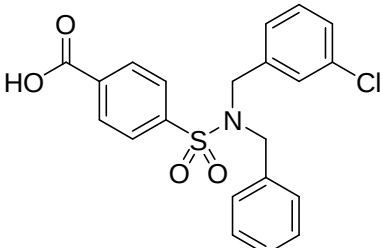
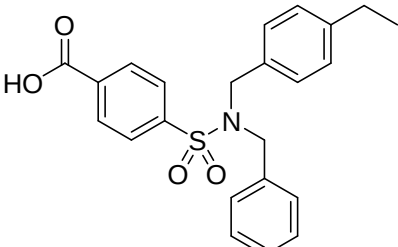
Composto No .	Composto	hT2R14 IC ₅₀ (µM)
5-63	 Ácido 4- (N- (4-metoxibenzil)-N- ((5-metilfuran-2-il)metil) sulfamoil) benzoico	
5-64	 Ácido 4- (N- (4-metoxibenzil)-N- (2-metilbenzil) sulfamoil) benzoico	
5-65	 Ácido 4- (N- (4-metoxibenzil)-N- (3-metilbenzil) sulfamoil) benzoico	
5-66	 Ácido 4- (N- (4-metoxibenzil)-N- (4-metilbenzil) sulfamoil) benzoico	

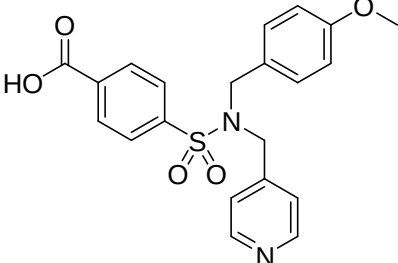
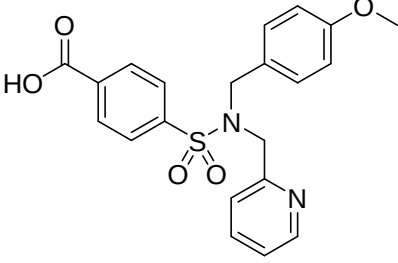
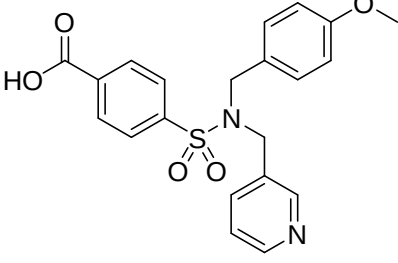
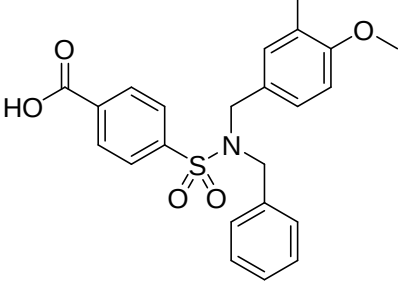
Composto No.	Composto	hT2R14 IC ₅₀ (μM)
5-67	 Ácido 4-(N-(3,5-dimetoxibenzil)-N-(4-metoxibenzil)sulfamoil)benzoico	12.141
5-68	 Ácido 4-(N-(2-clorobenzil)-N-(4-metoxibenzil)sulfamoil)benzoico	7.044
5-69	 Ácido 4-(N-(4-fluorobenzil)-N-(4-metoxibenzil)sulfamoil)benzoico	8.283
5-70	 Ácido 4-(N-benzil-N-(4-metilbenzil)sulfamoil)benzoico	5.394

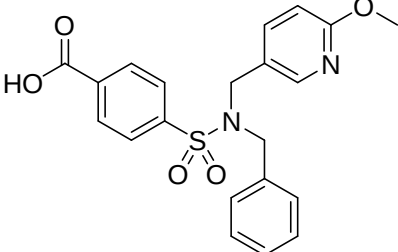
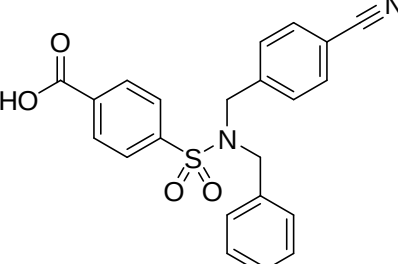
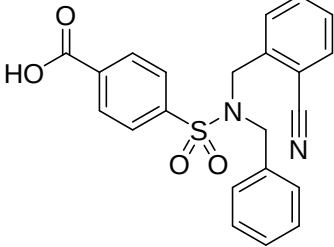
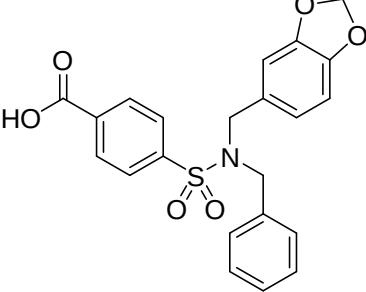
Composto No .	Composto	hT2R14 IC ₅₀ (μ M)
5-71	 Ácido 4-(N-benzil-N-(2-metoxibenzil)sulfamoyl)benzoico	5.061
5-72	 Ácido 4-(N-benzil-N-(2-fluorobenzil)sulfamoyl)benzoico	6.164
5-73	 Ácido 4-(N-benzil-N-(3-metilbenzil)sulfamoyl)benzoico	2.290
5-74	 Ácido 4-(N-benzil-N-(3-metoxibenzil)sulfamoyl)benzoico	5.991

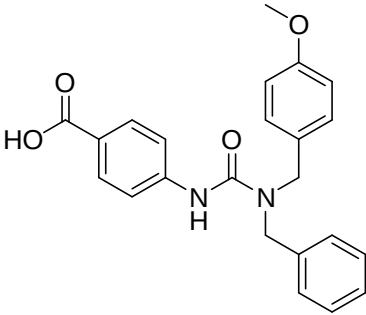
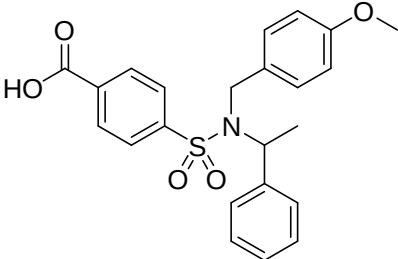
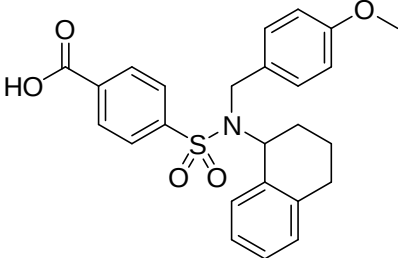
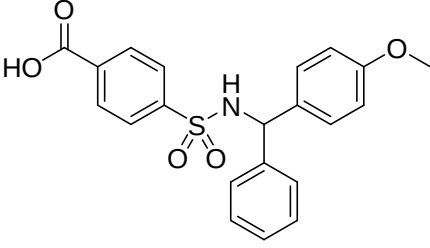
Composto No .	Composto	hT2R14 IC ₅₀ (μ M)
5-75	 Ácido 4-(N-benzil-N-(3-cianobenzil)sulfamoil)benzoico	
5-76	 Ácido 3-((N-benzil-4-carboxifenilsulfonamido)metil)benzoico	
5-77	 Ácido 4-(N-benzil-N-(4-clorobenzil)sulfamoil)benzoico	3.977
5-78	 Ácido 4-(N-benzil-N-(4-(metiltio)benzil)sulfamoil)benzoico	2.458

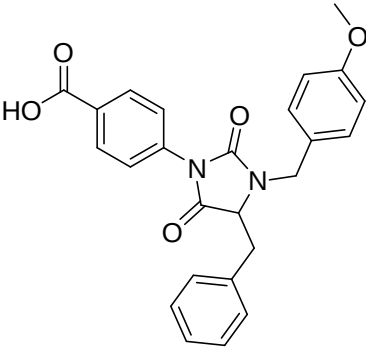
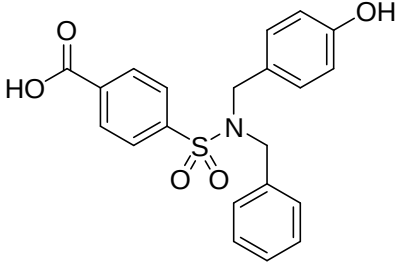
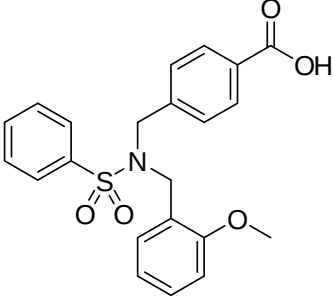
Composto No .	Composto	hT2R14 IC ₅₀ (μ M)
5-79	 Ácido 4-(N-benzil-N-(3-fluorobenzil) sulfamoil) benzoico	2.310
5-80	 Ácido 4-(N-benzil-N-(2-metilbenzil) sulfamoil) benzoico	2.926
5-81	 Ácido 4-(N-benzil-N-(4-metoxifenetil) sulfamoil) benzoico	

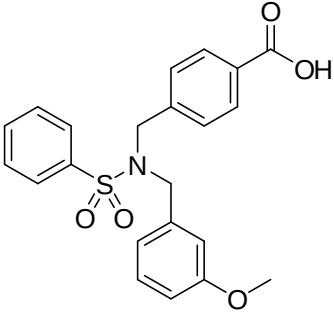
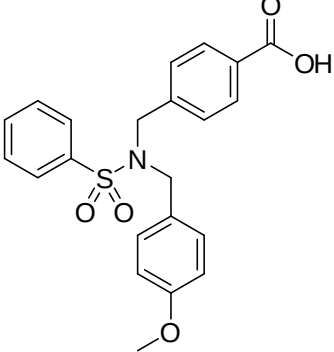
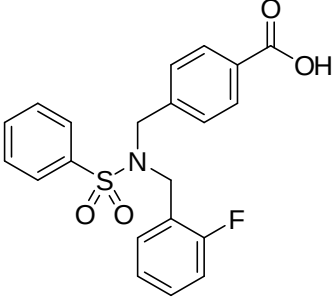
Composto No .	Composto	hT2R14 IC ₅₀ (µM)
5-82	 Ácido 3-((4-carboxy-N-(4-metoxibenzil)fenilsulfonamido)metil)benzoico	
5-83	 Ácido 4-(N-benzil-N-(2-clorobenzil)sulfamoil)benzoico	4.486
5-84	 Ácido 4-(N-benzil-N-(3-clorobenzil)sulfamoil)benzoico	4.286
5-85	 Ácido 4-(N-benzil-N-(4-etilbenzil)sulfamoil)benzoico	8.580

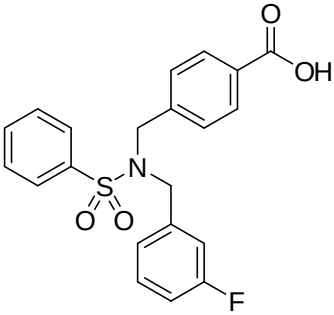
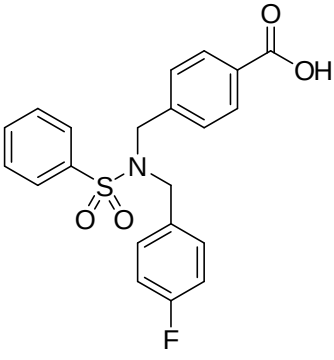
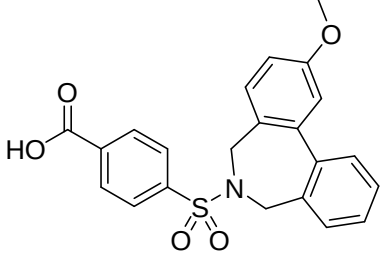
Composto No .	Composto	hT2R14 IC ₅₀ (μM)
5-86	 Ácido 4-(N-(4-metoxibenzil)-N-(piridin-4-ilmetil)sulfamoil)benzoico	
5-87	 Ácido 4-(N-(4-metoxibenzil)-N-(piridin-2-ilmetil)sulfamoil)benzoico	
5-88	 Ácido 4-(N-(4-metoxibenzil)-N-(piridin-3-ilmetil)sulfamoil)benzoico	
5-89	 Ácido 4-(N-benzil-N-(4-metoxi-3-metilbenzil)sulfamoil)benzoico	1.995

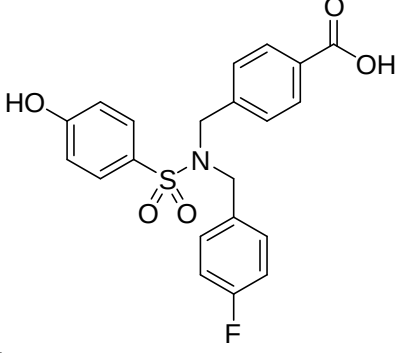
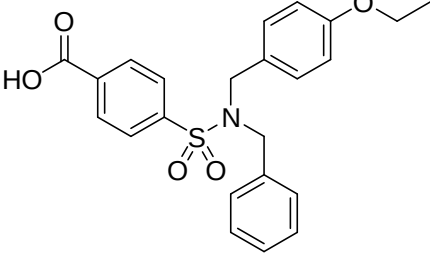
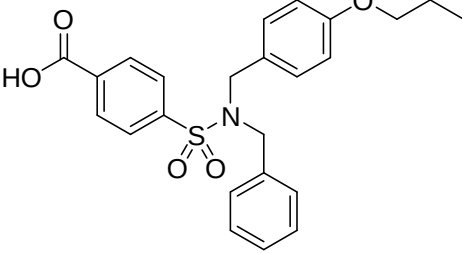
Composto No .	Composto	hT2R14 IC ₅₀ (μ M)
5-90	 Ácido 4-(N-benzil-N-((6-metoxipiridin-3-il)metil)sulfamoil)benzoico	3.258
5-91	 Ácido 4-(N-benzil-N-(4-cianobenzil)sulfamoil)benzoico	1.848
5-92	 Ácido 4-(N-benzil-N-(2-cianobenzil)sulfamoil)benzoico	4.627
5-93	 Ácido 4-(N-(benzo[d][1,3]dioxol-5-ilmetil)-N-benzilsulfamoil)benzoico	2.167

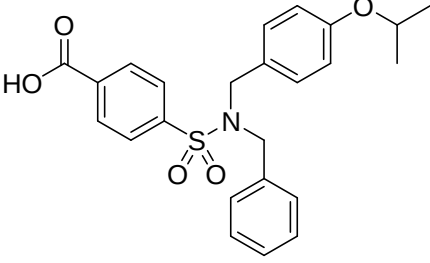
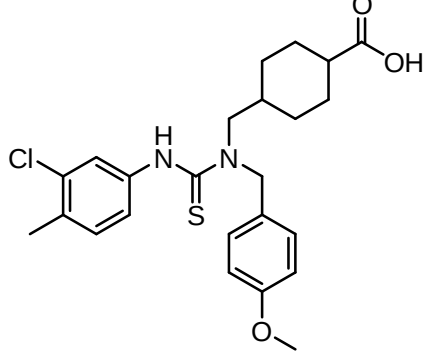
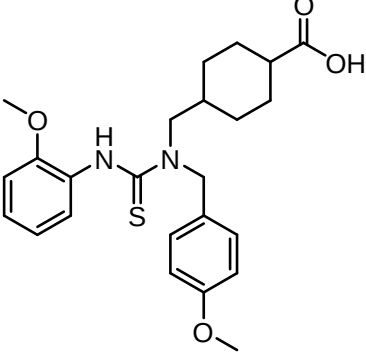
Composto No .	Composto	ht2R14 IC ₅₀ (µM)
5-94	 Ácido 4-(3-benzil-3-(4-metoxibenzil)ureido)benzoico	
5-95	 Ácido 4-(N-(4-metoxibenzil)-N-(1-feniletil)sulfamoil)benzoico	1.397
5-96	 Ácido 4-(N-(4-metoxibenzil)-N-(1,2,3,4-tetrahidronaftalen-1-il)sulfamoil)benzoico	2.415
5-97	 Ácido 4-(N-((4-metoxifenil)(fenil)metil)sulfamoil)benzoico	

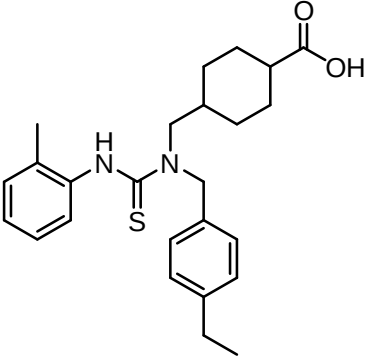
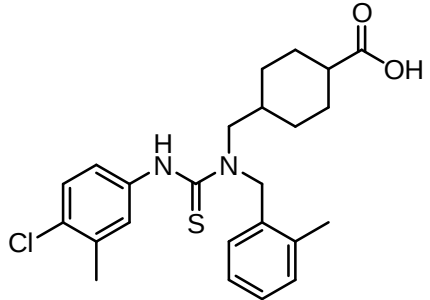
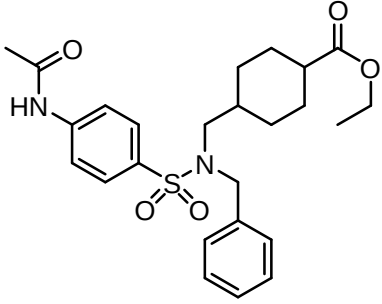
Composto No .	Composto	hT2R14 IC ₅₀ (μ M)
5-98	 Ácido 4-(4-benzil-3-(4-metoxibenzil)-2,5-dioxoimidazolidin-1-il)benzoico	
5-99	 Ácido 4-(N-benzil-N-(4-hidroxibenzil)sulfamoil)benzoico	5.207
5-100	 Ácido 4-((N-(2-metoxibenzil)fenilsulfonamido)metil)benzoico	1.294

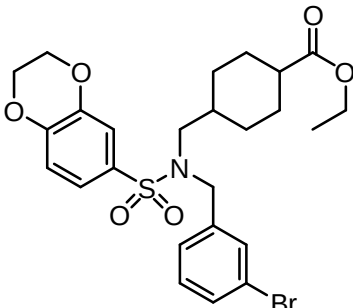
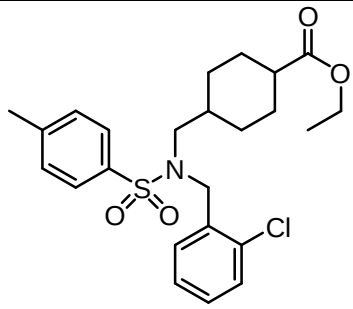
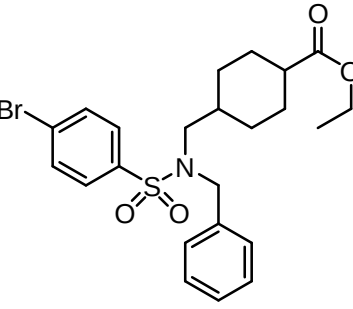
Composto No .	Composto	hT2R14 IC ₅₀ (μ M)
5-101	 Ácido 4-((N-(3-metoxibenzil) fenilsulfonamido) metil) benzoico	0.345
5-102	 Ácido 4-((N-(4-metoxibenzil) fenilsulfonamido) metil) benzoico	2.219
5-103	 Ácido 4-((N-(2-fluorobenzil) fenilsulfonamido) metil) -benzoico	0.429

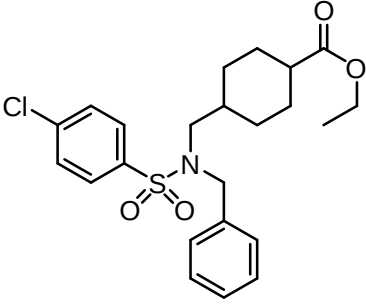
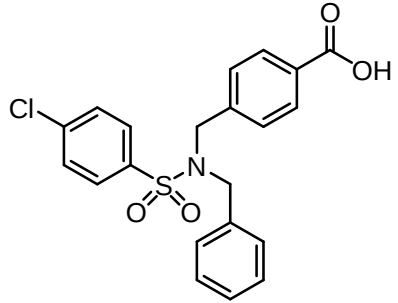
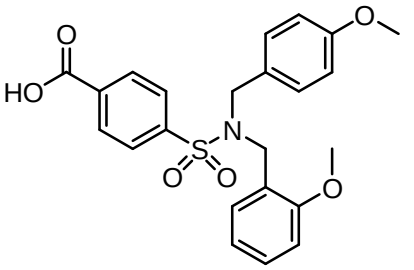
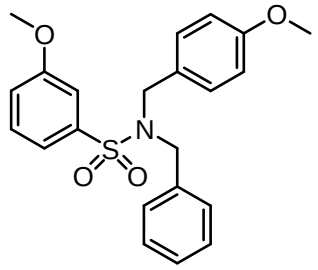
Composto No .	Composto	hT2R14 IC ₅₀ (µM)
5-104	 Ácido 4-((N-(3-fluorobenzil)fenilsulfonamido)metil)-benzoico	0.406
5-105	 Ácido 4-((N-(4-fluorobenzil)fenilsulfonamido)metil)-benzoico	0.935
5-106	 Ácido 4-(2-metoxi-5H-dibenzo[c,e]azepin-6(7H)-ilsulfonil)benzoico	

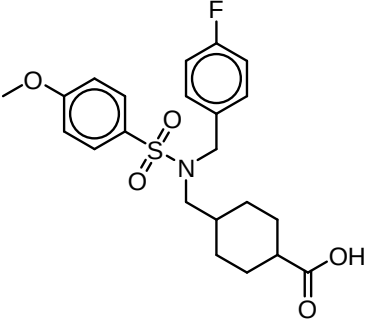
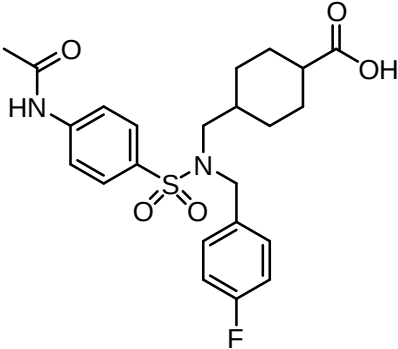
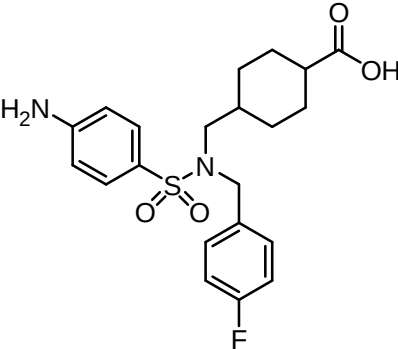
Composto No .	Composto	hT2R14 IC ₅₀ (µM)
5-107	 Ácido 4-((N-(4-fluorobenzil)-4-hidroxi fenilsulfonamido)metil) benzoico	4.086
5-108	 Ácido 4-(N-benzil-N-(4-etoxibenzil) sulfamoil) benzoico	
5-109	 Ácido 4-(N-benzil-N-(4-propoxibenzil) sulfamoil) benzoico	

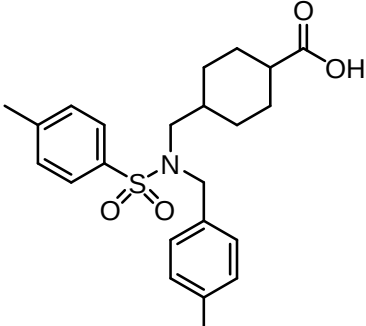
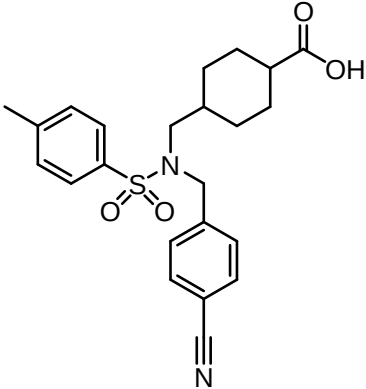
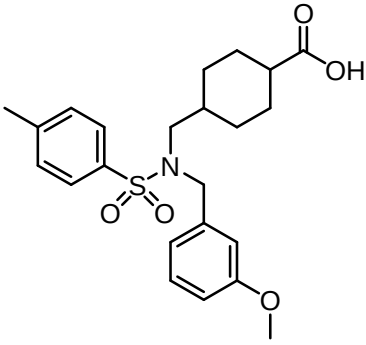
Composto No .	Composto	hT2R14 IC ₅₀ (μ M)
5-110	 Ácido 4-(N-benzil-N-(4-isopropoxibenzil) sulfamoyl) benzoico	
5-111	 Ácido 4-((3-(3-cloro-4-metilfenil)-1-(4-metoxibenzil)tioureido)metil) ciclohexanocarboxílico	6.136
5-112	 Ácido 4-((1-(4-metoxibenzil)-3-(2-metoxifenil)tioureido)metil) c iclohexanocarboxílico	8.852

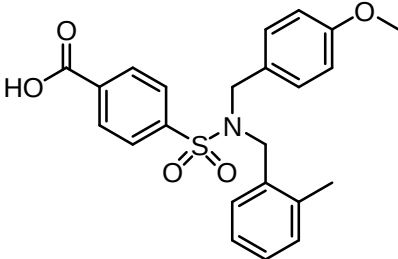
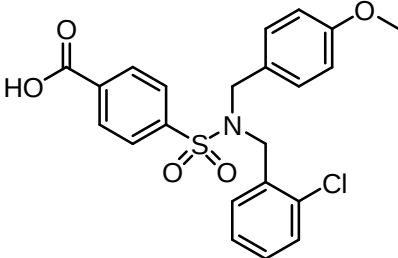
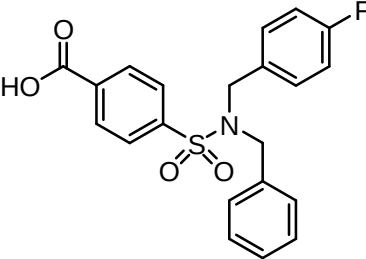
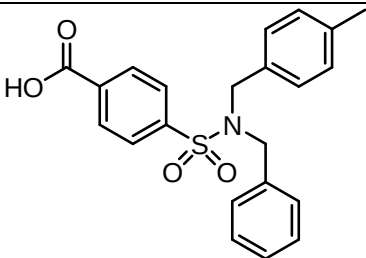
Composto No .	Composto	hT2R14 IC ₅₀ (μ M)
5-113	 Ácido 4-((1-(4- etilbenzil)-3-o- toliltioureido)metil)ciclo hexanocarboxílico	5.018
5-114	 Ácido 4-((3-(4-cloro-3- metilfenil)-1-(2- metilbenzil)tioureido)metil) ciclohexanocarboxílico	4.872
5-115	 etil 4-((4-acetamido-N- benzilfenilsulfonamido)metil) ciclohexanocarboxilato	0.334

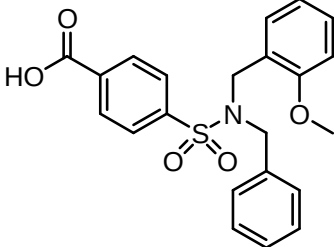
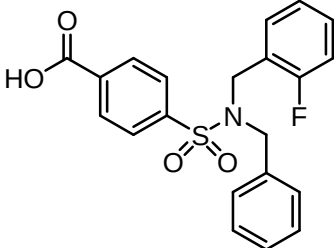
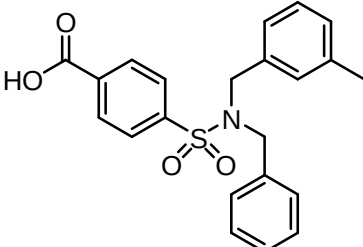
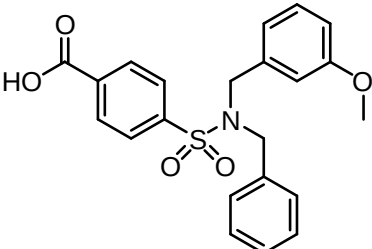
Composto No .	Composto	hT2R14 IC ₅₀ (μ M)
5-116	 etil 4-((N-(3-bromobenzil)-2,3-dihidrobenzo[b][1,4]dioxina-6-sulfonamido)metil)ciclohexanocarboxilato	2.567
5-117	 etil 4-((N-(2-clorobenzil)-4-metilfenilsulfonamido)metil)ciclohexanocarboxilato	2.816
5-118	 etil 4-((N-benzil-4-bromofenilsulfonamido)metil)ciclohexanocarboxilato	2.344

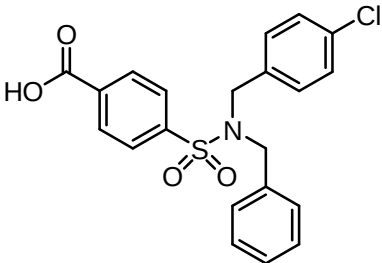
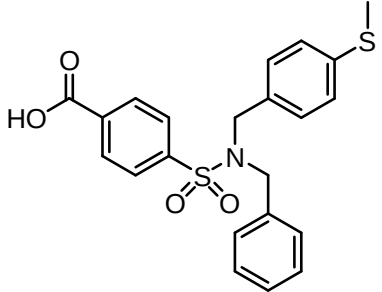
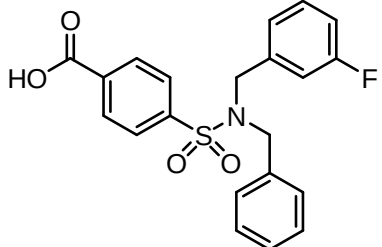
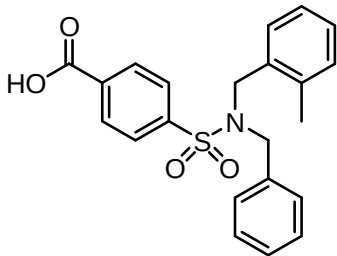
Composto No .	Composto	hT2R14 IC ₅₀ (μ M)
5-119	 etil 4-((N-benzil-4-clorofenilsulfonamido)metil) ciclohexanocarboxilato	0.672
5-120	 Ácido 4-((N-benzil-4-clorofenilsulfonamido)metil) benzoico	0.394
5-121	 Ácido 4-(N-(2-metoxibenzil)-N-(4-metoxibenzil) sulfamoil) benzoico	2.943
5-122	 N-benzil-3-metoxi-N-(4-metoxibenzil)benzeno sulfonamida	2.219

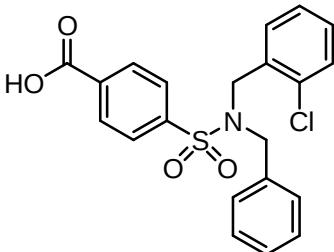
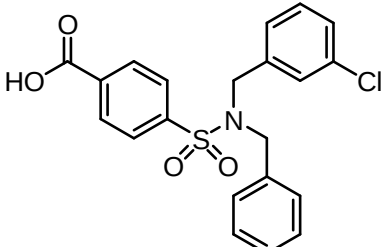
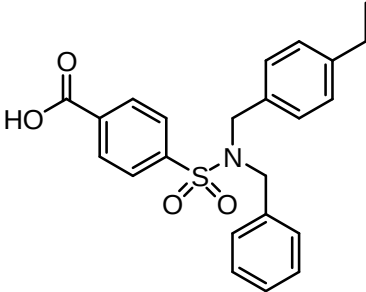
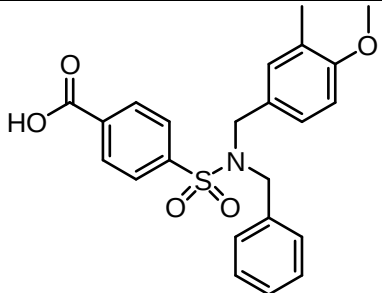
Composto No .	Composto	hT2R14 IC ₅₀ (μ M)
5-123	 Ácido 4-((N-(4-metoxifenilsulfonamido)metil)ciclohexanocarboxílico	0.092
5-124	 Ácido 4-((4-acetamido-N-(4-fluorobenzil)fenilsulfonamido)metil)ciclohexanocarboxílico	0.842
5-125	 Ácido 4-((4-amino-N-(4-fluorobenzil)fenilsulfonamido)metil)ciclohexanocarboxílico	1.651

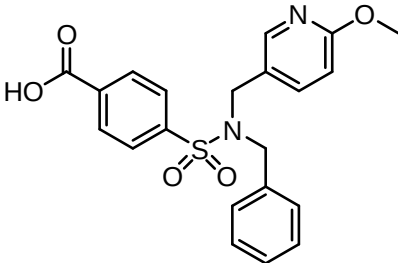
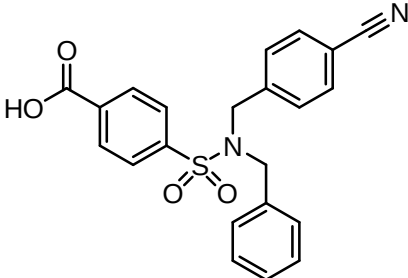
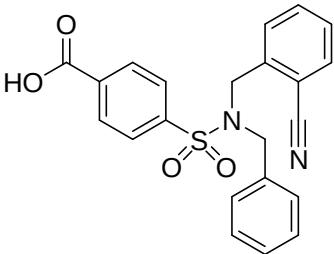
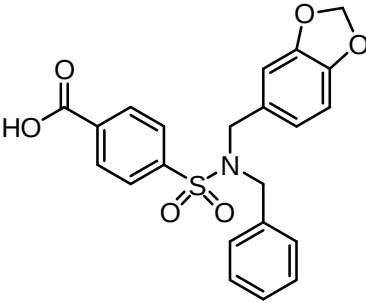
Composto No .	Composto	hT2R14 IC ₅₀ (μ M)
5-126	 Ácido 4-((4-metil-N-(4-metilbenzil)fenilsulfonamido)metil)ciclohexanocarboxílico	0.109
5-127	 Ácido 4-((N-(4-cianobenzil)-4-metilfenilsulfonamido)metil)ciclohexanocarboxílico	0.499
5-128	 Ácido 4-((N-(3-metoxibenzil)-4-metilfenilsulfonamido)metil)ciclohexanocarboxílico	0.036

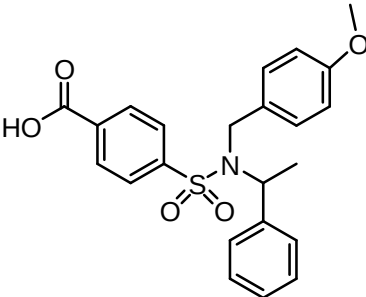
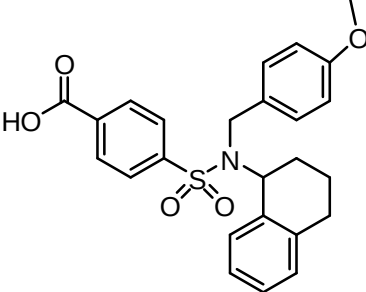
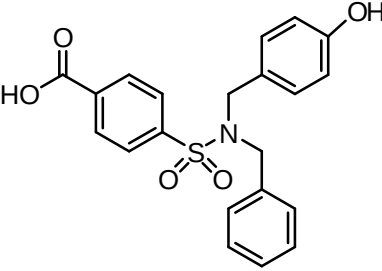
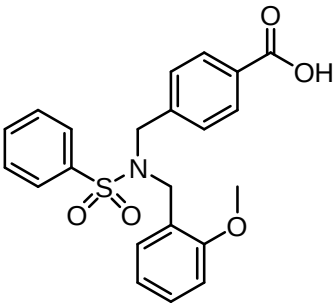
Composto No .	Composto	hT2R14 IC ₅₀ (μM)
5-129	 Ácido 4-(N-(4-metoxibenzil)-N-(2-metilbenzil)sulfamoil) benzoico	5.316
5-130	 Ácido 4-(N-(2-clorobenzil)-N-(4-metoxibenzil)sulfamoil) benzoico	7.044
5-131	 Ácido 4-(N-benzil-N-(4-fluorobenzil)sulfamoil) benzoico	8.283
5-132	 Ácido 4-(N-benzil-N-(4-metilbenzil)sulfamoil) benzoico	5.394

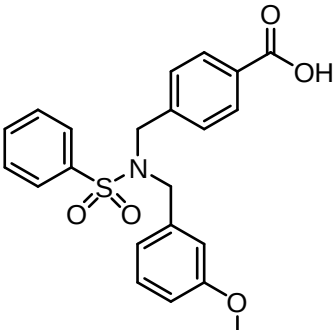
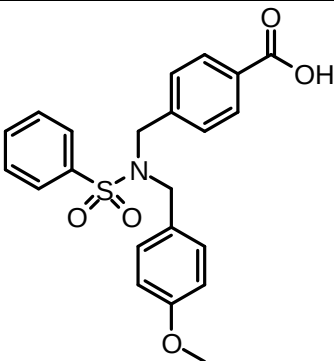
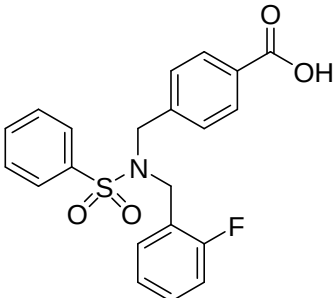
Composto No .	Composto	hT2R14 IC ₅₀ (μ M)
5-133	 Ácido 4-(N-benzil-N-(2-metoxibenzil)sulfamoil)benzoico	5.061
5-134	 Ácido 4-(N-benzil-N-(2-fluorobenzil)sulfamoil)benzoico	6.164
5-135	 Ácido 4-(N-benzil-N-(3-metilbenzil)sulfamoil)benzoico	2.290
5-136	 Ácido 4-(N-benzil-N-(3-metoxibenzil)sulfamoil)benzoico	5.991

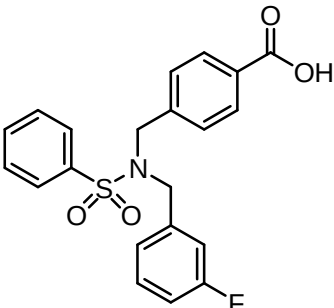
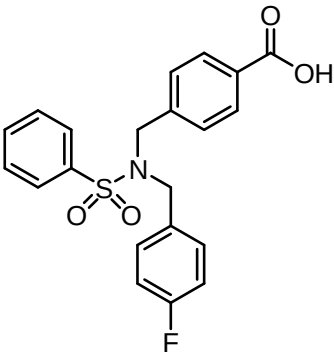
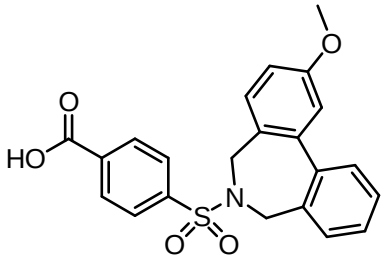
Composto No .	Composto	hT2R14 IC ₅₀ (μM)
5-137	 Ácido 4-(N-benzil-N-(4-clorobenzil)sulfamoil) benzoico	3.977
5-138	 Ácido 4-(N-benzil-N-(4-(metiltio)benzil)sulfamoil) benzoico	2.458
5-139	 Ácido 4-(N-benzil-N-(3-fluorobenzil)sulfamoil) benzoico	2.310
5-140	 Ácido 4-(N-benzil-N-(2-metilbenzil)sulfamoil) benzoico	2.926

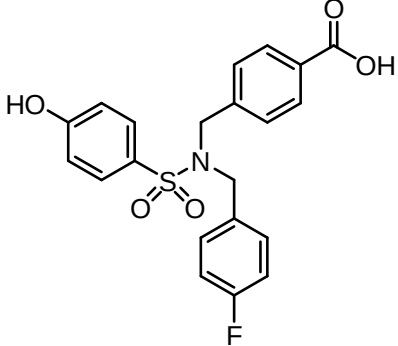
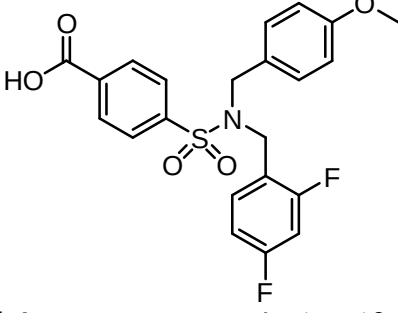
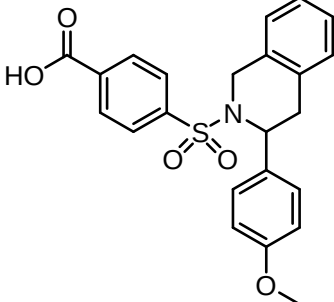
Composto No .	Composto	hT2R14 IC ₅₀ (μM)
5-141	 Ácido 4-(N-benzil-N-(2-clorobenzil)sulfamoil) benzoico	4.486
5-142	 Ácido 4-(N-benzil-N-(3-clorobenzil)sulfamoil) benzoico	4.286
5-143	 Ácido 4-(N-benzil-N-(4-etilbenzil)sulfamoil) benzoico	8.580
5-144	 Ácido 4-(N-benzil-N-(4-metoxi-3-metilbenzil)sulfamoil) benzoico	1.995

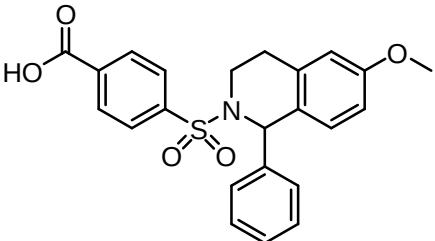
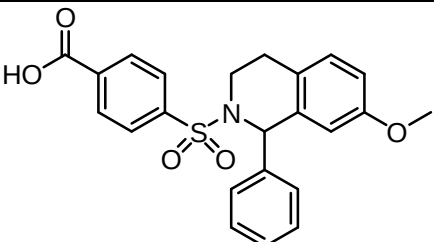
Composto No .	Composto	hT2R14 IC ₅₀ (μM)
5-145	 Ácido 4-(N-benzil-N-((6-metoxipiridin-3-yl)metil)sulfamoil)benzoico	3.258
5-146	 Ácido 4-(N-benzil-N-(4-cianobenzil)sulfamoil)benzoico	1.848
5-147	 Ácido 4-(N-benzil-N-(2-cianobenzil)sulfamoil)benzoico	4.627
5-148	 Ácido 4-(N-(benzo[d][1,3]dioxol-5-ylmetil)-N-benzilsulfamoil)benzoico	2.167

Composto No .	Composto	hT2R14 IC ₅₀ (μM)
5-149	 Ácido 4-((N-(4-metoxibenzil)-N-(1-feniletil) sulfamoil) benzoico	1.397
5-150	 Ácido 4-((N-(4-metoxibenzil)-N-(1,2,3,4-tetrahidronaftalen-1-il) sulfamoil) benzoico	2.415
5-151	 Ácido 4-((N-benzil-N-(4-hidroxibenzil) sulfamoil) benzoico	5.207
5-152	 Ácido 4-((N-(2-metoxibenzil) fenilsulfonamido) metil) benzoico	1.294

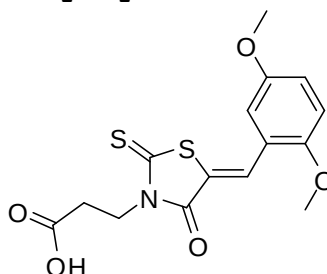
Composto No .	Composto	hT2R14 IC ₅₀ (μ M)
5-153	 Ácido 4-((N-(3-metoxibenzil)fenilsulfonamido)metil)benzoico	0.345
5-154	 Ácido 4-((N-(4-metoxibenzil)fenilsulfonamido)metil)benzoico	2.219
5-155	 4-((N-(2-ácido fluorobenzil)fenilsulfonamido)metil)benzoico	0.429

Composto No .	Composto	hT2R14 IC ₅₀ (μM)
5-156	 Ácido 4-((N-(3-fluorobenzil)fenilsulfonamido)metil)benzoico	0.406
5-157	 Ácido 4-((N-(4-fluorobenzil)fenilsulfonamido)metil)benzoico	0.935
5-158	 Ácido 4-(2-metoxi-5H-dibenzo[c,e]azepin-6(7H)-ilsulfonil)benzoico	3.571

Composto No .	Composto	hT2R14 IC ₅₀ (μ M)
5-159	 Ácido 4-((N-(4-fluorobenzil)-4-hidroxifenilsulfonamido)metil)benzoico	4.086
5-160	 Ácido 4-(N-(2,4-difluorobenzil)-N-(4-metoxibenzil)sulfamoil)benzoico	1.255
5-161	 Ácido 4-(3-(4-metoxifenil)-3,4-dihidroisoquinolin-2(1H)-ilsulfonil)benzoico	6.267

Composto No.	Composto	hT2R14 IC ₅₀ (μM)
5-162	 Ácido 4-(6-metoxi-1-fenil-3,4-dihidroisoquinolin-2(1H)-il-sulfonil)benzoico	9.616
5-163	 Ácido 4-(7-metoxi-1-fenil-3,4-dihidroisoquinolin-2(1H)-il-sulfonil)benzoico	2.879

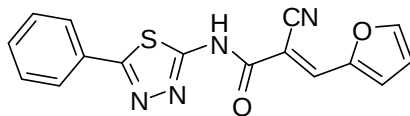
Exemplo 6-1: ácido (Z)-3-(5-(2,5-dimetoxibenzilideno)-4-oxo-2-tioxotiazolidin-3-il)propanóico



Ácido 3-(4-oxo-2-tioxotiazolidin-3-il)propanóico (200 mg, 1 mmol), 2,5-dimetoxi benzaldeído (168 mg, 1 mmol) e piperidinaa (0.3 mL) foram misturados em etanol (3 mL) e irradiados no microondcomo um 100°C. A reação foi resfriada, o sólido foi coletado por filtração, lavado com acetato de etila/hexanos (1/1) e recristalizado com etanol para dar 85 % de rendimento do composto título (309 mg, sólido marrom alaranjado). MS (M+H, 284); ¹H NMR (400MHz, DMSO-d₆): δ, ppm: 2.57 (t, 2H), 3.74 (s, J=6.8Hz, 3H), 3.84 (s, 3H), 4.19 (t, 2H), 6.90 (s, 1H), 7.10 (s, 2H), 7.86 (s, 1H).

O composto teve um IC₅₀ em receptor amargo hT2R14 de 2.75 μM.

Exemplo 6-2: (E)-2-ciano-3-(furan-2-il)-N-(5-fenil-1,3,4-tiadiazol-2-il)acrilamida

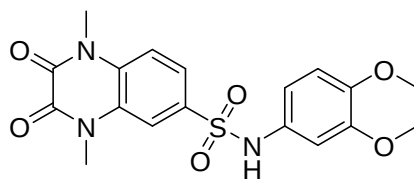


5-fenil-1,3,4-tiadiazol-2-amina (600 mg, 3.3 mmol),
 5 ácido cianoacético (300 mg, 3.6 mmol), e EDC-HCl (861 mg, 4.5 mmol) foram misturados em acetonitrila (15 mL) em temperatura ambiente por 2 horas. A mistura foi diluída com 1N HCl aquoso e a fase aquosa foi extraída com acetato de etila. Os extratos orgânicos combinados foram secos sobre sulfato de
 10 sódio, filtrados e concentrados *in vacuo*. O resíduo foi triturado com acetato de etila/hexanos (1/9) para dar 2-ciano-N-(5-fenil-1,3,4-tiadiazol-2-il)acetamida como um sólido branco que foi usado sem outra purificação.

312 mg de 2-ciano-N-(5-fenil-1,3,4-tiadiazol-2-il)acetamida e 150uL de furan-2-carbaldeído foram misturados
 15 em 2.5mL de DMF e aquecidos em microond como um 150°C por 15 minutos.. 5mL de H₂O foram adicionados e o precipitado resultante foi coletado e lavado com água (4 x) para dar o produto cru. Recristalização de etanol deu 180 mg de produto
 20 puro como um sólido marrom. MS (M+H, 323); ¹H NMR (400MHz, DMSO-d₆): δ, ppm: 6.82 (m, 1H), 7.43 (d, 1H), 7.49 (m, 4H), 7.87 (m, 2H), 8.15 (s, 1H), 8.22 (br, s, 1H).

O composto teve um IC₅₀ em receptor amargo hT2R14 de 0.499μM.

25 **Exemplo 6-3: N-(2-3-dihidrobenzo[b][1-4]dioxin-6-il)-1-4-dimetil-2-3-dioxo-1,2,3,4-tetrahydroquinoxalina-6-sulfonamida**



Cloreto de 1,4-dimetil-2,3-dioxo-1,2,3,4-tetrahydroquinoxalina-6-sulfonil (Exemplo 6-3a, 450 mg, 1.6
 30

mmol) foi adicionado a uma solução misturada de 2,3-dihidrobenczo[b][1,4]dioxin-6-amina (215 mg, 1.4 mmol) e trietilamina (170 mg, 1.7 mmol) in diclorometano (10 mL) . A reação foi misturada em temperatura ambiente durante a noite e então concentrada. O produto cru foi purificado por cromatografia em gel de sílica (0-30 % acetato de etila em hexanos) para dar N-(2,3-dihidrobenczo[b][1,4]dioxin-6-il)-1,4-dimetil-2,3-dioxo-1,2,3,4-tetrahydroquinoxalina-6-sulfonamida como um sólido branco. MS (M + H, 404.10); ¹H NMR (400MHz, DMSO-d₆): δ, ppm: 3.47(s, 3H), 3.49(s, 3H), 4.12(m, 4H), 6.55(m, 1H), 6.61(d, J = 2.4 Hz, 1H), 6.69(d, J = 8.4 Hz, 1H), 7.53(m, 1H), 7.59(d, J = 2 Hz, 1H), 10.00(s, 1H).

O composto teve um IC₅₀ em receptor amargo hT2R14 de 7.71 μM.

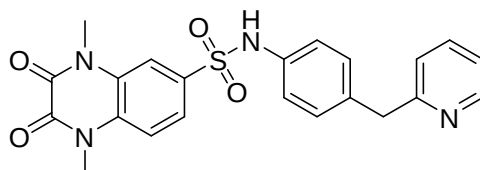
Exemplo 6-3a: cloreto de 1-4-dimetil-2,3-dioxo-1,2,3,4-tetrahydroquinoxalina-6-sulfonil

Ácido clorosulfônico (3 mL) foi aquecido a 65°C e 1,4-dimetilquinoxalina-2,3(1H,4H)-diona (Exemplo 6-3b, 1 g, 5.5 mmol) foi adicionado em porções por mais de 0.5 hora. A mistura de reação foi agitada por 4 horas então resfriada a temperatura ambiente e vertida lentamente em gelo. O precipitado resultante foi filtrado e lavado com água para dar 1,4-dimetil-2,3-dioxo-1,2,3,4-tetrahydroquinoxalina-6-sulfonil cloreto como um sólido branco. ¹H NMR (400MHz, DMSO-d₆): δ, ppm: 3.50(s, 6H), 7.25(m, 2H), 7.38(m, 4H).

Exemplo 6-3b: 1-4-dimetilquinoxalina-2,3(1H,4H)-diona

Em uma solução de NaH (2.5 g) em DMF (200 mL) foram adicionados quinoxalina-2,3(1H,4H)-diona (5 g) em porções, seguido da adição lenta de iodeto de metila (3.8 mL). A mistura de reação foi agitada em temperatura ambiente por 4 horas, então água foi adicionada (200 mL) O precipitado resultante foi coletado por filtração e lavado com água para dar 1,4-dimetilquinoxalina-2,3(1H,4H)-diona como um sólido branco em 95% de rendimento. ¹H NMR (400MHz, DMSO-d₆): δ, ppm: 3.50(s, 6H), 7.25(m, 2H), 7.38(m, 4H).

Exemplo 6-4: 1-4-dimetil-2,3-dioxo-N-(4-(piridin-2-ilmetil)fenil)-1,2,3,4-tetrahydroquinoxalina-6-sulfonamida.

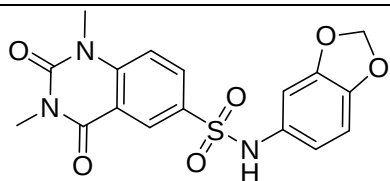
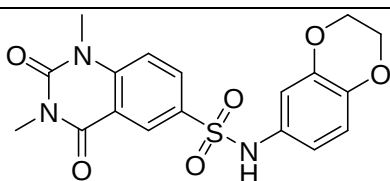


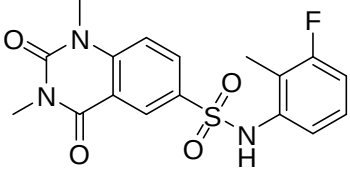
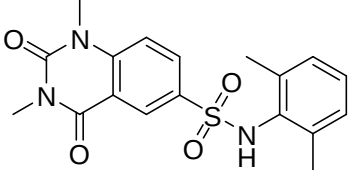
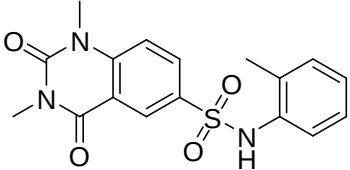
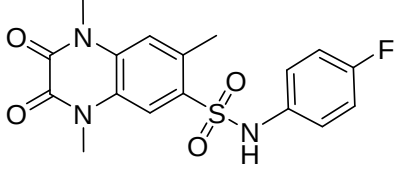
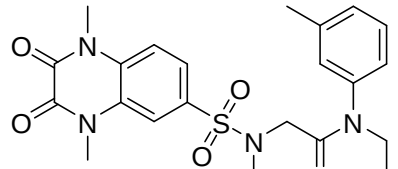
O composto está disponível comercialmente e foi
5 adquirido pela Ryan Scientific.

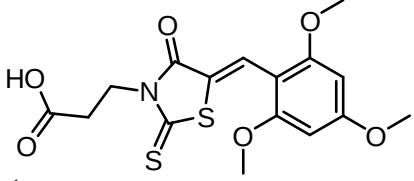
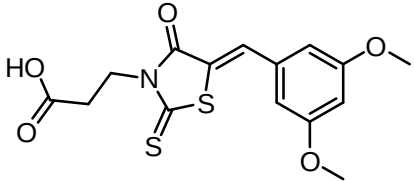
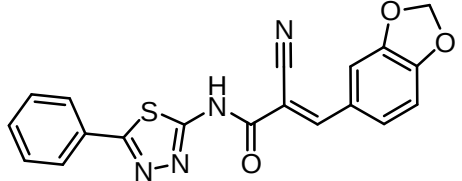
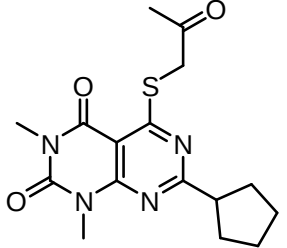
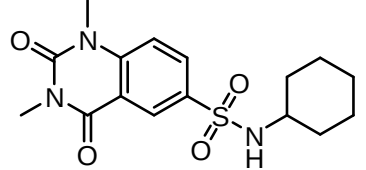
O composto teve um IC₅₀ em receptor amargo hT2R14 de 6.14
μM.

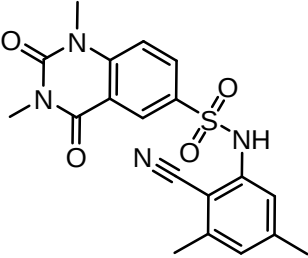
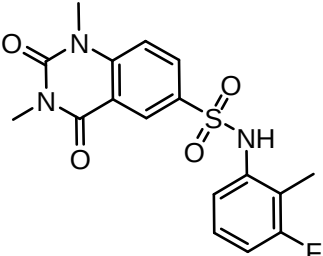
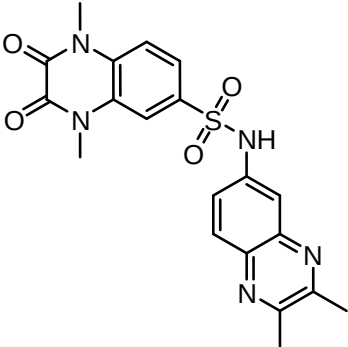
Compostos adicionais foram testados experimentalmente e
descobertos como tendo um nível relativamente alto de
10 eficiência como inibidores do receptor amargo hT2R14. Os
resultados desse teste são mostrados abaixo na Tabela D.

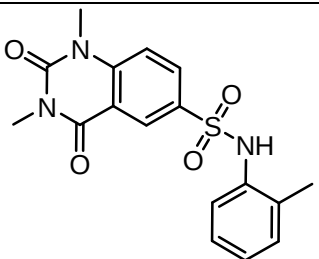
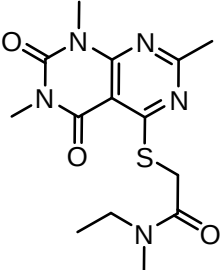
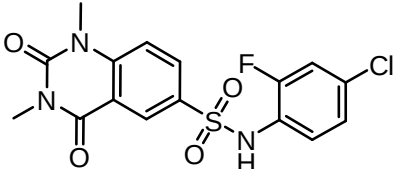
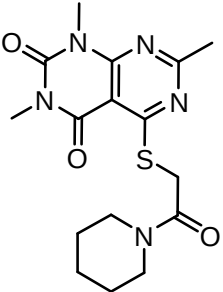
Tabela D

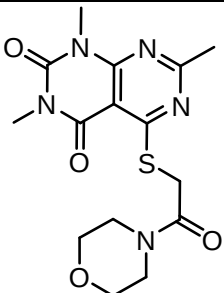
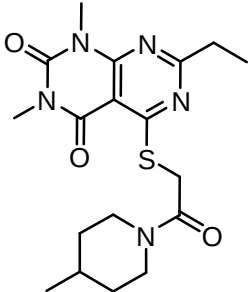
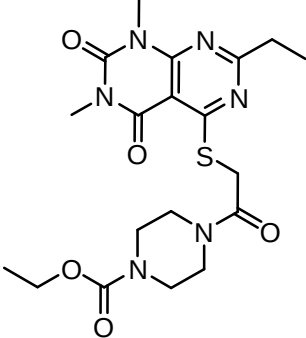
Composto No.	Composto	hT2R14 IC ₅₀ (μM)
6-5	 N-(benzo[d][1,3]dioxol-5-yl)-1,3-dimetil-2,4-dioxo-1,2,3,4-tetrahydroquinazolina-6-sulfonamida	0.264
6-6	 N-(2,3-dihydrobenzo[b][1,4]dioxin-6-yl)-1,3-dimetil-2,4-dioxo-1,2,3,4-tetrahydroquinazolina-6-sulfonamida	0.706

Composto No.	Composto	hT2R14 IC ₅₀ (µM)
6-7	 N-(3-fluoro-2-metilfenil)-1,3-dimetil-2,4-dioxo-1,2,3,4-tetrahydroquinazolina-6-sulfonamida	0.935
6-8	 N-(2,6-dimetilfenil)-1,3-dimetil-2,4-dioxo-1,2,3,4-tetrahydroquinazolina-6-sulfonamida	
6-9	 1,3-dimetil-2,4-dioxo-N-o-tolil-1,2,3,4-tetrahydroquinazolina-6-sulfonamida	1.726
6-10	 N-(4-fluorofenil)-1,4,7-trimetil-2,3-dioxo-1,2,3,4-tetrahydroquinoxalina-6-sulfonamida	12.623
6-11	 N-etil-N-m-tolil-2-(N,1,4-trimetil-2,3-dioxo-1,2,3,4-tetrahydroquinoxalina-6-sulfonamido)acetamida	14.926

Composto No.	Composto	hT2R14 IC ₅₀ (μM)
6-12	 Ácido (Z)-3-(4-oxo-2-tioxo-5-(2,4,6-trimetoxibenzilideno)thiazolidina-3-il)propanóico	9.371
6-13	 Ácido (Z)-3-(5-(3,5-dimetoxibenzilideno)-4-oxo-2-tioxothiazolidin-3-il)propanóico	5.378
6-14	 (E)-3-(benzo[d][1,3]dioxol-5-il)-2-ciano-N-(5-fenil-1,3,4-tiadiazol-2-il)acrilamida	2.906
6-15	 7-ciclopentil-1,3-dimetil-5-(2-oxopropiltio)pirimido[4,5-d]pirimidina-2,4(1H,3H)-diona	5.428
6-16	 N-ciclohexil-1,3-dimetil-2,4-dioxo-1,2,3,4-tetrahydroquinazolina-6-sulfonamida	7.239

Composto No.	Composto	hT2R14 IC ₅₀ (μM)
6-17	 N-(2-ciano-3,5-dimetilfenil)-1,3-dimetil-2,4-dioxo-1,2,3,4-tetrahydroquinazolina-6-sulfonamida	1.946
6-18	 N-(3-fluoro-2-metilfenil)-1,3-dimetil-2,4-dioxo-1,2,3,4-tetrahydroquinazolina-6-sulfonamida	0.935
6-19	 N-(2,3-dimetilquinoxalin-6-il)-1,4-dimetil-2,3-dioxo-1,2,3,4-tetrahydroquinoxalina-6-sulfonamida	6.332

Composto No.	Composto	hT2R14 IC ₅₀ (μM)
6-20	 1,3-dimetil-2,4-dioxo-N-o-tolil-1,2,3,4-tetrahidroquinazolina-6-sulfonamida	1.726
6-22	 N-etil-N-metil-2-(2,6,8-trimetil-5,7-dioxo-5,6,7,8-tetrahidropirimido[4,5-d]pirimidina-4-iltio)acetamida	0.861
6-23	 N-(4-cloro-2-fluorofenil)-1,3-dimetil-2,4-dioxo-1,2,3,4-tetrahidroquinazolina-6-sulfonamida	9.703
6-24	 1,3,7-trimetil-5-(2-oxo-2-(piperidina-1-il)etiltio)pirimido[4,5-d]pirimidina-2,4(1H,3H)-diona	0.292

Composto No.	Composto	hT2R14 IC ₅₀ (μM)
6-25	 1,3,7-trimetil-5-(2-morfolino-2-oxoetiltio)pirimido[4,5-d]pirimidina-2,4(1H,3H)-diona	1.006
6-26	 7-etil-1,3-dimetil-5-(2-(4-metilpiperidina-1-il)-2-oxoetiltio)pirimido[4,5-d]pirimidina-2,4(1H,3H)-diona	0.721
6-27	 etil 4-(2-(2-etil-6,8-dimetil-5,7-dioxo-5,6,7,8-tetrahidropirimido[4,5-d]pirimidina-4-iltio)acetil)piperazina-1-carboxilato	0.763

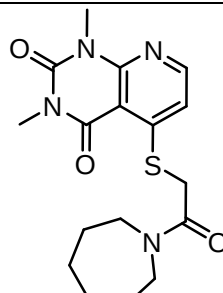
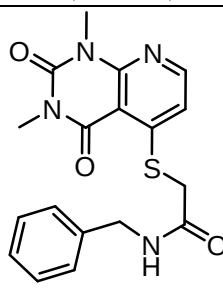
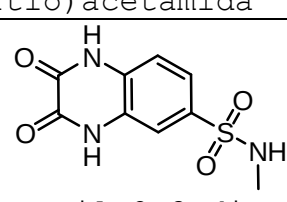
Composto No.	Composto	hT2R14 IC ₅₀ (μM)
6-28	 5-(2-(azepan-1-yl)-2-oxoethylthio)-1,3-dimetilpirido[2,3-d]pirimidina-2,4(1H,3H)-diona	2.377
6-29	 N-benzil-2-(1,3-dimetil-2,4-dioxo-1,2,3,4-tetrahidropirido[2,3-d]pirimidina-5-iltio)acetamida	0.710
6-30	 N-metil-2,3-dioxo-1,2,3,4-tetrahidroquinoxalina-6-sulfonamida	6.234

Tabela 7: Resultados representativos de peneiragem contra 23 receptores amargos.

Os compostos dos exemplos 5 e 6 acima foram peneirados contra um painel de 23 receptores amargos. Os receptores amargos foram ativados a EC80 com o agonista correspondente, e então tratados com os compostos acima a uma concentração de 25μM. Os dados estão resumidos na Tabela abaixo.

80% ou mais de inibição = ++++

10 60% a 80% inibição = +++

40% a 60% inibição = ++

20% a 40% inibição = +

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							+		+				++	+++	+		+	+	

Exemplo	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				+

*

Exemplo 7. Dados sensórios para o Exemplo 10-10.

Para determinar a eficiência de um antagonista individual, testes de sabor foram realizados com um antagonista específico T2R8, o composto de interesse e um bloqueador amargo de referência. Nós descrevemos previamente um bom antagonista hT2R8 que foi provado como tendo um efeito de sabor, Exemplo 4-8 do. Pedido de Patente Provisório 60/957,129, de 21 de agosto de 2007: N-(1-((3,5-dimetilisoxazol-4-il)metil)-1H-pirazol-4-il)benzo[d][1,3]dioxol-5-carboxamida. Foi mostrado que ele

reduz o amargo do café por si só e em combinação com um bloqueador amargo de amplo espectro. Como mostrado na Tabela 6, quando comparado com nosso antagonista de controle (Exemplo 10-8) o antagonista hT2R8 do Exemplo 10-10 mostra uma maior habilidade para bloquear o amargo percebido.

Número de Exemplo	ensaio HTS IC ₅₀	Selecionado como mais amargo		Valor p	Antagonista conc.
	µM	10-8	+ outro		µM
10-10	0.02-0.04	14	2	0.004	1

Tabela 6. Resultados de teste de sabor comparados com um bloqueador amargo de controle e um bloqueador amargo mais potente 10-10.

Como demonstrado pelos testes de sabor deste Exemplo, a percepção de amargo pode ser reduzida ou eliminada pela incorporação de antagonistas de hT2R8 e o antagonistas do Exemplo 10-10 parece ser a um análogo mais potente quando comparado a antagonistas amargos conhecidos como N-(1-((3,5-dimetilisoxazol-4-il)metil)-1H-pirazol-4-il)benzo[d][1,3]dioxol-5-carboxamida (7767). Segue que a percepção de amargo pode ser reduzida ou eliminada pela incorporação de antagonistas de hT2R8 em composições como comidas, bebidas e/or medicamentos onde o sabor amargo é elicitado pelos agonistas T2R8.

Exemplo 8. Identificação de antagonistas de hT2R8

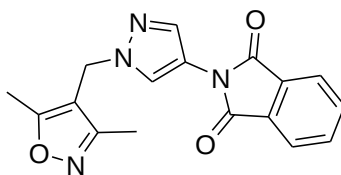
Para identificar antagonistas, linhas de células que expressam de maneira estável o hT2R8 junto com a proteína Gl6g44 quimérica promíscua foram geradas como descrito nos pedidos de patente anteriores. Um ensaio de alta taxa de transferência foi estabelecido usando as linhas de células estáveis e FLIPR (Fluorescent Imaging Plate Reader). Um agonista do hT2R8 foi usado para ativar os receptores em até 70-80% de sua respectiva atividade máxima. Para o hT2R8, o agonista usado foi andrografolídeo (200 µM). Para identificar os antagonistas, compostos com estruturas químicas diversas foram adicionados junto com o agonista. Os compostos que

causam uma redução estatisticamente significativa da atividade do receptor são unidos, e reconfirmados com curvas de inibição dependents de doses. O estrutura A e estrutura B foram identificados como antagonistas hT2R8 (Fig. 1).

5 Exemplos específicos são apresentados na Tabela 1.

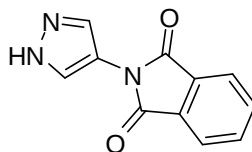
Exemplo 9. hT2R8 Antagonistas

Exemplo 9-1: 2-(1-((3,5-dimetilisoaxazol-4-il)metil)-1H-pirazol-4-il)isoindolina-1,3-diona.



10 2-(1H-pirazol-4-il)isoindolina-1,3-diona (Exemplo 9-1a) (1.5 g, 7 mmol), 4-(clorometil)-3,5-dimetilisoaxazol (1.5 g, 10 mmol), e carbonato de cézio (3.3g, 10 mmol) foram misturados em DMF (20 mL) at 80°C por 3 horas. A reação foi resfriada, diluída com H₂O (150 mL), e extraída com acetato de etila (3x, 75 mL). Os extratos orgânicos combinados foram secos sobre sulfato de sódio, filtrados e concentrados no rotovapor. O produto sólido foi triturado com acetato de etila/hexanos (1/9) e re-cristalizado de etanol absoluto de refluxo (30 mL) para dar 2-(1-((3,5-dimetilisoaxazol-4-il)metil)-1H-pirazol-4-il)isoindolina-1,3-diona (900 mg, 38%)
 15 como um sólido amarelo claro brilhoso. ¹H NMR (DMSO-d₆, 400 MHz) 1.36 (d, 3H, J=7.2 Hz), 1.36 (d, 3H, J=7.2 Hz), 2.41 (s, 3H), 5.22 (s, 2H), 7.81 (s, 1H), 7.91-7.83 (m, 4H), 8.21 (s, 1H). MS M+H calculado 323.11; encontrado 323.1. Ponto de fusão: 25 170-171°C. O composto título foi mostrado como inibindo o receptor amargo hT2R08 e teve um IC₅₀ de 0.18 µM.

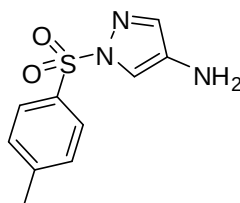
Exemplo 9-1a: 1-tosil-1H-pirazol-4-amina.



1-tosil-1H-pirazol-4-amina (Exemplo 9-1b) (3g, 12.7 mmol) e isobenzofuran-1,3-diona (1.9 g, 13 mmol) foram

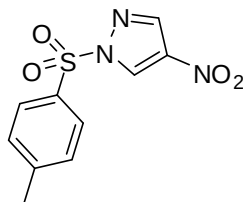
misturados em DMF/Acetonitrila (1/1) (20 mL) a 100°C por 1 hora. A mistura foi resfriada e diluída com H₂O. O precipitado foi coletado por filtração, lavado com água adicional seguido de acetato de etila e hexanos. O produto sólido foi seco sob alto vácuo para dar 2-(1H-pirazol-4-il)isoindolina-1,3-diona (2.5 g, 92%) como um sólido amarelo. MS M+H calculado 214.1; encontrado 214.1. ¹H NMR (CDCl₃, 400 MHz) δ 7.93-8.10 (m, 6H), 13.03 (bs, 1H).

Exemplo 9-1b: 1-tosil-1H-pirazol-4-amina.



4-nitro-1-tosil-1H-pirazol (Exemplo 9-1c) (3 g, 11.2 mmol) e 10 % paládio on carbono (800 mg) em MeOH (150 mL) foram agitados sob 2 atmosferas de hidrogênio no hidrogenador Parr por 3 horas. A mistura foi filtrada por celite, concentrada e purificada por cromatografia em gel de sílica (80% acetato de etila em hexanos) para dar 1-tosil-1H-pirazol-4-amina (1.9 g, 71%) como um sólido rosa. ¹H NMR (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).

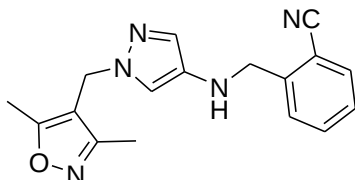
Exemplo 9-1c: 4-nitro-1-tosil-1H-pirazol.



4-nitro-1H-pirazol (500 mg, 4.4 mmol), 4-metilbenzeno-1-sulfonil cloreto (840 mg, 4.4 mmol), e trietilamina (510 mg, 5 mmol) foram misturados em DMF (25 mL) a 80°C por 1 hora. A reação foi resfriada, diluída com H₂O (200 mL) e extraída com acetato de etila (3x, 100 ml). A fase orgânica foi lavada com 1N HCl aquoso (200 mL) e H₂O (200 mL), seca sobre sulfato de sódio, filtrada e concentradas no rotovapor. O sólido foi

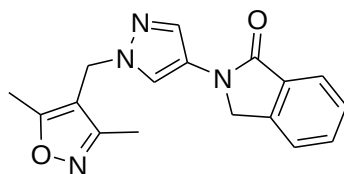
triturado com hexanos para dar 4-nitro-1-tosil-1H-pirazol (600 mg, 50%) como um sólido esbranquiçado. ^1H NMR (DMSO- d_6 , 400 MHz) δ 2.40 (s, 3H), 7.52 (d, 2H, $J=8.4$ Hz), 7.98 (d, 2H, $J=8.8$ Hz), 8.57 (s, 1H), 9.58 (s, 1H).

Exemplo 9-2: 2-((1-((3,5-dimetilisoxazol-4-il)metil)-1H-pirazol-4-ilamino)metil)benzonitrila



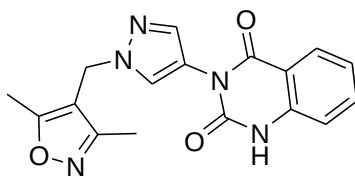
1-((3,5-dimetilisoxazol-4-il)metil)-1H-pirazol-4-amina-hidrocloreto (100 mg, 0.44 mmol), 2-(bromometil)benzonitrila (115 mg, 0.6 mmol), e trietilamina (0.5 mL, 3.5 mmol) em DMF (3 mL) foram irradiados e agitados no reator micro-ondas a 80°C por 10 minutos. A reação foi resfriada, diluída com H_2O (50 mL) e extraída com acetato de etila (3x, 30 mL). Os extratos orgânicos combinados foram secos sobre sulfato de sódio e concentrados no rotovapor. O resíduo foi dissolvido em etanol (70 mL), H_2O (3 mL) e ácido acético (1 mL) e a mistura ficou em refluxo por 2 horas. A solução foi concentrada no rotovapor, tirada em metanol (3 mL) e purificada por HPLC de fase reversa em alíquotas de 3-1 mL (5 a 95% acetonitrila em H_2O : gradiente de 16 minutos). As frações puras foram combinadas e concentradas no rotovapor. O resíduo foi triturado com acetato de etila/hexanos (1/9) para dar 2-(1-((3,5-dimetilisoxazol-4-il)metil)-1H-pirazol-4-il)isoindolin-1-ona (85 mg, 61%) como um sólido branco puro. ^1H NMR (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). O composto título foi mostrado como tendo inibido o receptor amargo hT2R08 e teve um valor IC_{50} maior do que 30 μM .

Exemplo 9-3: 2-(1-((3,5-dimetilisoxazol-4-il)metil)-1H-pirazol-4-il)isoindolin-1-ona



2-((1-((3,5-dimetilisoxazol-4-il)metil)-1H-pirazol-4-ilamino)metil)benzonitrila (Exemplo 9-2) (30 mg, 0.14 mmol) foi agitado em uma mistura de MeOH/ 2N NaOH aquoso (5 mL) a 100°C por 30 minutos no reator micro-ondas. A reação foi acidificada com 1N HCl aquoso (100 mL) e extraída com acetato de etila (3x, 70 mL). Os extratos orgânicos combinados foram secos sobre sulfato de sódio e concentrados. O resíduo foi dissolvido em MeOH (3 mL) e purificado por HPLC de fase reversa em alíquotas de 2-1.5 mL (5 a 95% acetonitrila em H₂O: gradiente de 16 minutos). As frações puras foram combinadas e concentradas para dar 2-(1-((3,5-dimetilisoxazol-4-il)metil)-1H-pirazol-4-il)isoindolin-1-ona (21 mg, 50%) como um sólido branco puro. ¹H NMR (DMSO-d₆, 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). O composto título foi mostrado como inibindo o receptor amargo hT2R08 e teve um IC₅₀ de 11 μ M.

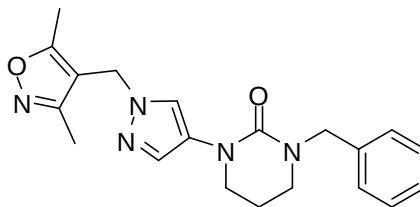
Exemplo 9-4: 3-(1-((3,5-dimetilisoxazol-4-il)metil)-1H-pirazol-4-il)quinazolina-2,4(1H,3H)-diona



1-((3,5-dimetilisoxazol-4-il)metil)-1H-pirazol-4-amina hidrocloreto (75 mg, 0.33 mmol), metil 2-isocianatobenzoato, e trietilamina (200 mg, 2 mmol) em acetonitrila (3 mL) foram irradiados no reator micro-ondas a 100°C por 30 minutos. A reação foi resfriada, diluída com H₂O (75 mL), e extraída com acetato de etila (3x, 50 mL). Os extratos orgânicos combinados foram secos sobre sulfato de sódio, filtrados e concentrados no rotovapor. O resíduo foi purificado por cromatografia em gel de sílica (75% acetato de etila em

hexanos) para dar 3-(1-((3,5-dimetilisoxazol-4-il)metil)-1H-pirazol-4-il)quinazolina-2,4(1H,3H)-diona (20 mg, 18%) como um rosa sólido claro. ¹H NMR (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). O composto título foi mostrado como inibindo o receptor amargo hT2R08 e teve um IC₅₀ de 1.5 μ M.

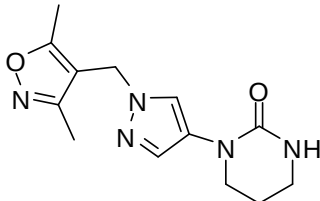
Exemplo 9-5: 1-benzil-3-(1-((3,5-dimetilisoxazol-4-il)metil)-1H-pirazol-4-il)tetrahidropirimidina-2(1H)-ona



1-(1-((3,5-dimetilisoxazol-4-il)metil)-1H-pirazol-4-il)tetrahidropirimidina-2(1H)-ona (Exemplo 9-5a) (50 mg, 0.18 mmol) e 60% hidreto de sódio (8 mg, 0.20 mmol) em DMF (3 mL) foram agitados em temperatura ambiente por 15 minutos, então resfriados a 0°C. Brometo de benzila (31 mg, 0.18 mmol) foi adicionado à mistura e deixado amornar em temperatura ambiente, e então agitado por 2 horas. A reação foi interrompida com metanol e concentrada. A reação foi diluída com salmoura (50 mL) e extraída com diclorometano (2x, 50 mL). Os extratos orgânicos combinados foram secos sobre sulfato de magnésio, filtrados e concentrados no rotovapor. O resíduo foi tirado em diclorometano (5 mL) e purificado por cromatografia em coluna de sílica (100% a 90% diclorometano em metanol: gradiente de 30 minutos) para dar 1-benzil-3-(1-((3,5-dimetilisoxazol-4-il)metil)-1H-pirazol-4-il)tetrahidropirimidina-2(1H)-ona (20 mg, 30%) como um sólido branco. ¹H NMR (DMSO-d₆, 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] calculado para C₂₀H₂₃N₅O₂; esperado 366.19; encontrado 366.15. O composto título foi mostrado como inibindo o receptor amargo hT2R08 e teve um

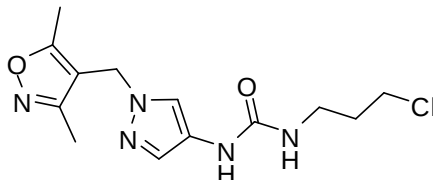
IC₅₀ de 1.65 µM.

Exemplo 9-5a: 1-(1-((3,5-dimetilisoxazol-4-il)metil)-1H-pirazol-4-il)tetrahidropirimidina-2(1H)-ona



5 1-(3-cloropropil)-3-(1-((3,5-dimetilisoxazol-4-il)metil)1H-pirazol-4-il)ureia (Exemplo 9-5b) (200 mg, 0.64 mmol) e 60% hidreto de sódio (28 mg, 0.71 mmol) em DMF (2 mL) foram agitados a 0°C por 15 minutos, então deixados amornar até temperatura ambiente e agitados por 2 horas. A reação
10 foi interrompida com metanol e concentrada. A reação foi diluída com salmoura (50 mL) e extraída com diclorometano (2x, 50 mL). Os extratos orgânicos combinados foram secos sobre sulfato de magnésio, filtrados e concentrados. O resíduo foi tirado em diclorometano (5 mL) e purificado por
15 cromatografia em coluna de sílica (100% a 90% diclorometano em metanol: gradiente de 30 minutos) para dar 1-(1-((3,5-dimetilisoxazol-4-il)metil)-1H-pirazol-4-il)tetrahidropirimidina-2(1H)-ona (84 mg, 48%) como um sólido branco. ¹H NMR (DMSO-*d*₆, 400 MHz): δ 1.85-1.91 (m, 2H), 2.10 (s, 3H), 2.37 (s, 3H), 3.12 (m, 2H), 3.48 (t, *J* = 6.0 Hz, 2H), 5.05 (s, 2H), 6.57 (s, 1H), 7.46 (s, 1H), 7.80 (s, 1H). LC/MS; [M+H] calculado para C₁₃H₁₇N₅O₂; esperado 276.14; encontrado 276.10.

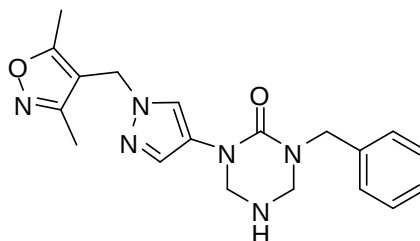
Exemplo 9-5b: 1-(3-cloropropil)-3-(1-((3,5-dimetilisoxazol-4-il)metil)-1H-pirazol-4-il)urea



1-((3,5-dimetilisoxazol-4-il)metil)-1H-pirazol-4-amina (342mg, 1.78 mmol) e isocianato de 2-cloropropil (213mg, 1.78 mmol) em acetonitrila (5 mL) foram aquecidos a 65°C por 16
30 horas. A reação foi resfriada a temperatura ambiente,

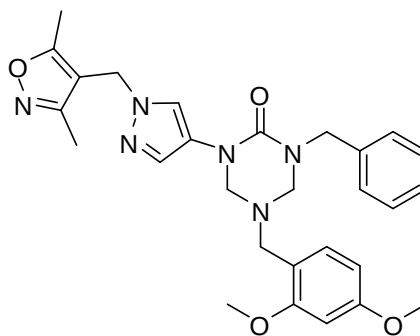
concentrada e o resíduo foi dissolvido em diclorometano (5 mL) e purificado por cromatografia em coluna de sílica (100% a 90% diclorometano em metanol: gradiente de 30 minutos). As frações puras foram combinadas e concentradas, então trituradas com acetato de etila/hexanos (1/9) para dar (1-(3-cloropropil)-3-(1-((3,5-dimetilisoxazol-4-il)metil)-1H-pirazol-4-il)urea (218 mg, 39%) como sólido branco. LC/MS; [M+H] calculado para $C_{12}H_{16}ClN_5O_2$; esperado 298.10; encontrado 298.10.

10 **Exemplo 9-6: 1-benzil-3-(1-((3,5-dimetilisoxazol-4-il)metil)-1H-pirazol-4-il)-1,3,5-triazinan-2-ona**



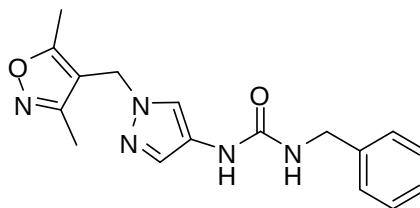
1-benzil-5-(2,4-dimetoxibenzil)-3-(1-((3,5-dimetilisoxazol-4-il)metil)-1H-pirazol-4-il)-1,3,5-triazinan-2-ona (Exemplo 9-6a) (44mg, 0.09 mmol), anisola (9 mg, 0.09 mmol), e 50% ácido trifluoroacético/solução de diclorometano (1 mL) em diclorometano (1 mL) foram agitados em temperatura ambiente por 2 horas. A reação foi concentrada, interrompida com bicarbonato de sódio saturado (50 mL), extraída com acetato de etila (2x, 50 mL) e lavada com salmoura (50 mL). Os extratos orgânicos combinados foram secos sobre sulfato de magnésio, filtrados e ,concentrados. A purificação por cromatografia em coluna de sílica (100% a 90% diclorometano em metanol: gradiente de 30 minutos) permitiu 1-benzil-3-(1-((3,5-dimetilisoxazol-4-il)metil)-1H-pirazol-4-il)-1,3,5-triazinan-2-ona (19 mg, 62%) como um sólido branco. LC/MS; [M+H] calculado para $C_{19}H_{22}N_6O_2$; esperado 367.18; encontrado 367.20. O composto título foi mostrado como inibindo o receptor amargo hT2R08 e teve um IC_{50} of 5.84 μ M.

30 **Exemplo 9-6a: 1-benzil-5-(2,4-dimetoxibenzil)-3-(1-((3,5-dimetilisoxazol-4-il)metil)-1H-pirazol-4-il)-1,3,5-triazinan-2-ona**



1-benzil-3-(1-((3,5-dimetilisoxazol-4-il)metil)-1H-pirazol-4-il)urea (Exemplo 9-6b) (50 mg, 0.15 mmol), 2,4-metoxi benzil amina (26 mg, 0.15 mmol), e formaldeído (37% wt. em água) (25 mg, 0.31 mmol) foram aquecidos a 100°C por 16 horas. A reação foi resfriada a temperatura ambiente, diluída com salmoura (50 mL) e extraída com diclorometano (2x, 50 mL). Os extratos orgânicos combinados foram secos sobre sulfato de magnésio, filtrados e concentrados. O resíduo foi purificado por cromatografia em coluna de sílica (100% a 90% diclorometano em metanol: gradiente de 30 minutos) para dar 1-benzil-5-(2,4-dimetoxibenzil)-3-(1-((3,5-dimetilisoxazol-4-il)metil)-1H-pirazol-4-il)-1,3,5-triazinan-2-ona (44 mg, 56%) como um óleo. LC/MS; [M+H] calculado para C₂₈H₃₂N₆O₄; esperado 517.25; encontrado 517.20.

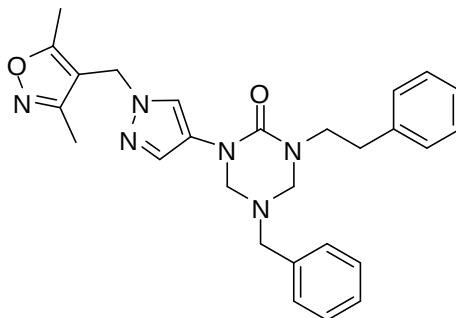
Exemplo 9-6b: 1-benzil-3-(1-((3,5-dimetilisoxazol-4-il)metil)-1H-pirazol-4-il)urea



1-((3,5-dimetilisoxazol-4-il)metil)-1H-pirazol-4-amina (287 mg, 1.49 mmol) e benzil isocianato (199 mg, 1.49 mmol) em acetonitrila (5 mL) foram aquecidos a 65°C por 16 horas. A reação foi resfriada a temperatura ambiente e concentrada. O resíduo foi purificado por cromatografia em coluna de sílica (100% a 90% diclorometano em metanol: gradiente de 30 minutos) e triturado com acetato de etila/hexanos (1/9) para dar 1-benzil-3-(1-((3,5-dimetilisoxazol-4-il)metil)-1H-pirazol-4-il)ureia (246 mg, 51%) como um sólido branco.

LC/MS; [M+H] calculado para C₁₇H₁₉N₅O₂; esperado 326.15; encontrado 326.10.

Exemplo 9-7: 5-benzil-1-(1-((3,5-dimetilisoxazol-4-il)metil)-1H-pirazol-4-il)-3-fenetil-1,3,5-triazinan-2-ona



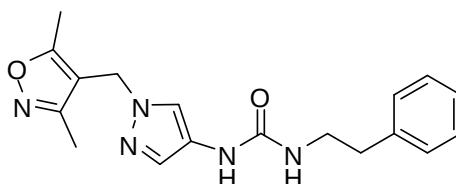
5

Preparado como no Exemplo 9-6a de 1-(1-((3,5-dimetilisoxazol-4-il)metil)-1H-pirazol-4-il)-3-fenetilurea (Exemplo 9-7a), formaldeído, e benzil amina. Rendimento: 15%. ¹H NMR (DMSO-*d*₆, 400 MHz): δ 2.11 (s, 3H), 2.37 (s, 3H), 2.69 (t, *J* = 7.6 Hz, 2H), 3.39 (t, *J* = 7.8 Hz, 2H), 3.81 (s, 2H), 4.16 (s, 2H), 4.42 (s, 2H), 5.05 (s, 2H), 7.17-7.32 (m, 10H), 7.42 (s, 1H), 7.78 (s, 1H). LC/MS; [M+H] calculado para C₂₇H₃₀N₆O₂; esperado 471.24; encontrado 471.15. O composto título foi mostrado como inibindo o receptor amargo hT2R08 e teve um IC₅₀ de 2.64 μM.

10

15

Exemplo 9-7a: 1-(1-((3,5-dimetilisoxazol-4-il)metil)-1H-pirazol-4-il)-3-fenetilurea

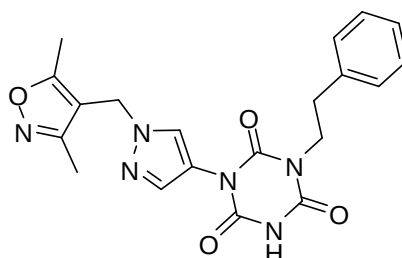


Preparado como no Exemplo 9-6b de 1-((3,5-dimetilisoxazol-4-il)metil)-1H-pirazol-4-amina e fenetil isocianato. Rendimento: 29%. ¹H NMR (DMSO-*d*₆, 400 MHz): δ 2.10 (s, 3H), 2.36 (s, 3H), 2.69 (t, *J* = 7.2 Hz, 2H), 3.25 (q, *J* = 7.4 Hz, 2H), 5.02 (s, 2H), 6.00 (t, *J* = 5.8 Hz, 1H), 7.16-7.30 (m, 6H), 7.68 (s, 1H), 8.13 (s, 1H). LC/MS; [M+H] calculado para C₁₈H₂₁N₅O₂; esperado 340.17; encontrado 340.20.

20

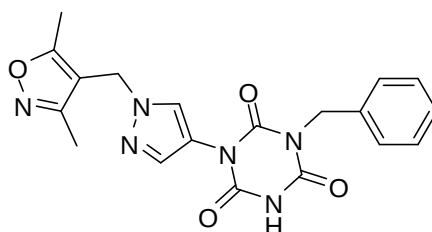
25

Exemplo 9-8: 1-(1-((3,5-dimetilisoxazol-4-il)metil)-1H-pirazol-4-il)-3-fenetil-1,3,5-triazinan-2,4,6-trione



1-(1-((3,5-dimetilisoxazol-4-il)metil)-1*H*-pirazol-4-il)-3-fenetilureia (Exemplo 9-7a) (100 mg, 0.29 mmol) em THF (2 mL) foi resfriada a 0°C e isocianato de *n*-clorocarbonoil (93 mg, 0.88 mmol) foi lentamente adicionado. Após a adição, a reação foi amornada a temperatura ambiente e agitada por 1 hora. A reação foi concentrada e o resíduo foi purificado por cromatografia em coluna de sílica (100% a 90% diclorometano em metanol: gradiente de 30 minutos) para dar 1-(1-((3,5-dimetilisoxazol-4-il)metil)-1*H*-pirazol-4-il)-3-fenetil-1,3,5-triazinana-2,4,6-triona (100 mg, 83%) como um sólido branco. ¹H NMR (DMSO-*d*₆, 400 MHz): δ 2.13 (s, 3H), 2.39 (s, 3H), 2.82 (t, *J* = 5.8 Hz, 2H), 3.88 (t, *J* = 8.0 Hz, 2H), 5.17 (s, 2H), 7.19–7.31 (m, 5H), 7.44 (s, 1H), 7.89 (s, 1H), 11.84 (s, 1H). LC/MS; [M+H] calculado para C₂₀H₂₀N₆O₄; esperado 409.15; encontrado 409.20. O composto título foi mostrado como inibindo o receptor amargo hT2R08 e teve um IC₅₀ de 3.03 μM.

Exemplo 9-9: 1-benzil-3-(1-((3,5-dimetilisoxazol-4-il)metil)-1*H*-pirazol-4-il)-1,3,5-triazinane-2,4,6-trione

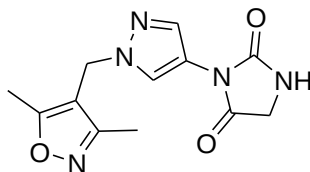


1-benzil-3-(1-((3,5-dimetilisoxazol-4-il)metil)-1*H*-pirazol-4-il)urea (Exemplo 95b) (100 mg, 0.31 mmol) em THF (2 mL) foi resfriado a 0°C e isocianato de *n*-clorocarbonoil (97 mg, 0.92 mmol) foi lentamente adicionado. Após a adição, a reação foi amornada a temperatura ambiente e agitada por 1 hora. A reação foi concentrada e o resíduo foi purificado por cromatografia em coluna de sílica (100% a 90% diclorometano

em metanol: gradiente de 30 minutos) para dar 1-benzil-3-(1-
 ((3,5-dimetilisoxazol-4-il)metil)-1H-pirazol-4-il)-1,3,5-
 triazinana-2,4,6-triona (112 mg, 93%) como um sólido branco.
¹H NMR (DMSO-*d*₆, 400 MHz): δ 2.12 (s, 3H), 2.38 (s, 3H), 4.87
 5 (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] calculado para
 C₁₉H₁₈N₆O₄; esperado 395.14; encontrado 395.15. O composto
 título foi mostrado como inibindo o receptor amargo hT2R08 e
 teve um IC₅₀ de 1.14 μ M.

10 **Exemplo 10. Antagonistas hT2R8: Preparar os compostos da**
invenção

Exemplo 10-1: 3-(1-((3,5-dimetilisoxazol-4-il)metil)-1H-
pirazol-4-il)imidazolidina-2,4-diona

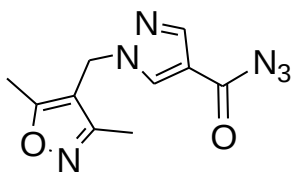


15

1-((3,5-dimetilisoxazol-4-il)metil)-1H-pirazol-4-
 carbonil azida (Exemplo 10-1a) (6 g, 25.5 mmol) em tolueno
 (100 mL) foi refluxada durante 1 hora e resfriada à
 20 temperatura ambiente sob uma atmosfera de nitrogênio. Metil
 éster-cloridrato de glicina (3.1 g, 26 mmol) e trietilamina
 (3.2 g, 32 mmol) foram adicionados, a mistura foi refluxada
 durante 16 horas. A reação foi resfriada e o solvente
 removido em evaporador rotatório. O sólido foi redissolvido
 25 em acetato de etila (100 mL) e a fase orgânica foi lavada com
 solução 1N HCl (2x, 150 mL). A fase aquosa foi extraída de
 volta com acetato de etila (2x, 75 mL) e os extratos
 orgânicos combinados foram secos sob sulfato de sódio e
 concentrados. O sólido resultante foi triturado com acetato
 30 de etila/hexanos (1/9) e seco sob alto vácuo para fornecer 3-
 (1-((3,5-dimetilisoxazol-4-il)metil)-1H-pirazol-4-

il)imidazolidina-2,4-diona (5.2 g, 74%) como um sólido branco. ¹H NMR (DMSO-d₆, 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). O composto do título foi mostrado para inibir
5 receptor amargo hT2R08 e ter um IC₅₀ de 1.7 μM.

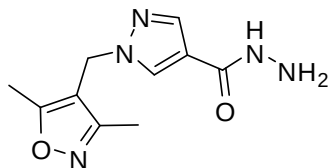
Exemplo 10-1a: 1-((3,5-dimetilisoxazol-4-il)metil)-1H-pirazol-4-carbonil azida



10

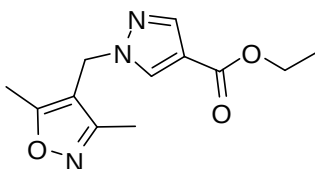
Nitrito de sódio (450 mg, 6.5 mmol, in H₂O) (10 mL) foi adicionado gota a gota, durante 10 minutos, a uma suspensão de 1-((3,5-dimetilisoxazol-4-il)metil)-1H-pirazol-4-carbohidrazida (Exemplo 10-1b) (1g, 4.3 mmol) em 10% de ácido
15 acético aquoso (50 mL) e resfriado a 0 °C através de um banho de água gelada. A reação foi agitada durante 15 minutos adicionais, então extraída com acetato de etila (3x, 75 mL). Os extratos orgânicos combinados foram lavados com carbonato de sódio saturado aquoso (100 mL) seguido por H₂O (100 mL).
20 Os extratos orgânicos combinados foram secos sob sulfato de sódio, filtrados e concentrados. O produto sólido foi triturado com acetato de etila/hexanos (1/9) e seco *en vacuo* para fornecer 1-((3,5-dimetilisoxazol-4-il)metil)-1H-pirazol-4-carbonil azida (1g, 93%) como um sólido branco. ¹H NMR
25 (CDCl₃, 400 MHz): δ 2.20 (s, 3H), 2.44 (s, 3H), 5.07 (s, 2H), 7.81 (s, 1H), 7.93 (s, 1H).

Exemplo 10-1b: 1-((3,5-dimetilisoxazol-4-il)metil)-1H-pirazol-4-carbohidrazida



5 Etil 1-((3,5-dimetilisoxazol-4-il)metil)-1H-pirazol-4-carboxilato (Exemplo 10-1c) (6 g, 24 mmol) e hidrazina (7.5g, 240 mmol) foram agitados em EtOH (100 mL) a refluxo durante 12 horas. A solução foi concentrada no evaporador rotatório e o produto sólido foi triturado com acetato de etila/hexanos
10 (1/9) e seco sob alto vácuo para fornecer 1-((3,5-dimetilisoxazol-4-il)metil)-1H-pirazol-4-carbohidrazida (5.5 g, 97%) como um sólido branco puro. ¹H NMR (DMSO-d₆, 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).

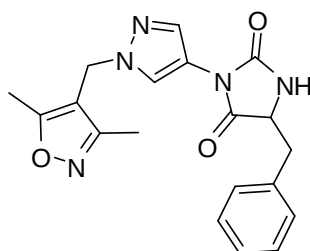
15 **Exemplo 10-1c: 1-((3,5-dimetilisoxazol-4-il)metil)-1H-pirazol-4-carboxilato**



Etil 1H-pirazol-4-carboxilato (4.2g, 30 mmol), 4-
20 (clorometil)-3,5-dimetilisoxazol (5.1 g, 35 mmol), e carbonato de cério (9.8 g, 30 mmol), em DMF (50 mL), foram agitados a 80 °C durante 12 horas. A reação foi resfriada à temperatura ambiente, diluída com 0.1 N HCl (150 mL) e extraída com acetato de etila (3x, 75 mL). Os extratos
25 orgânicos combinados foram secos sob sulfato de sódio e concentrados em evaporador rotatório. O produto sólido foi triturado com acetato de etila/hexanos (1/9) e coletado por filtração para fornecer etil 1-((3,5-dimetilisoxazol-4-

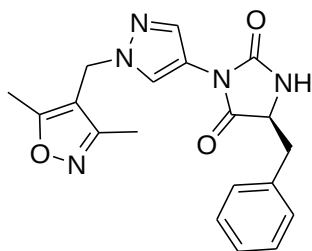
il)metil)-1H-pirazol-4-carboxilato (6g, 80%) como um sólido branco. ^1H NMR (CDCl_3 , 400 MHz): δ 1.34 (t, J = 7.2 Hz, 3H), 2.19 (s, 3H), 2.43 (s, 3H), 4.29 (q, J = 7.2 Hz, 2H), 5.06 (s, 2H), 7.77 (s, 1H), 7.91 (s, 1H).

5 **Exemplo 10-2: 3-(1-((3,5-dimetilisoxazol-4-il)metil)-1H-pirazol-4-il)imidazolidina-2,4-diona**



Preparado como no Exemplo 10-1 de (+/-)-fenilalanina metil éster cloridrato e 1-((3,5-dimetilisoxazol-4-il)metil)-1H-pirazol-4-carbonil azida. Rendimento: 58%. ^1H NMR (Acetona- 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 calculado 366.15; encontrado 366.1. Ponto de fusão: 169-171 °C. O composto do título foi mostrado para inibir receptor amargo hT2R08 e ter um IC_{50} de 0.18 μM .

Exemplo 10-3: (S)-5-benzil-3-(1-((3,5-dimetilisoxazol-4-il)metil)-1H-pirazol-4-il)imidazolidina-2,4-diona

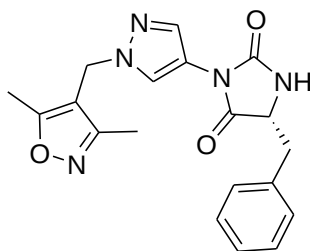


20

Preparado como no Exemplo 10-1 de (S)-fenilalanina metil éster cloridrato e 1-((3,5-dimetilisoxazol-4-il)metil)-1H-pirazol-4-carbonil azida (Exemplo 6a). Rendimento: 13% isolado de cromatografia quiral ^1H NMR (CDCl_3 , 400 MHz):

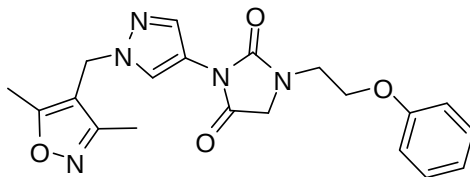
5 δ 2.19 (s, 3H), 2.42 (s, 3H), 2.88 (dd, $J = 13.6, 9.2$ Hz, 1H), 3.35 (dd, $J = 13.6, 3.6$ Hz, 1H), 4.31-4.35 (m, 1H) 5.06 (s, 2H), 5.53 (bs, 1H), 7.21-7.36 (m, 5H), 7.85 (s, 1H), 8.01 (s, 1H). LC/MS; $[\text{M}+\text{H}]$ calculado durante $\text{C}_{19}\text{H}_{19}\text{N}_5\text{O}_3$; esperado 366.15; encontrado 366.1. $[\alpha]_{\text{D}} = (-)-136$, $c=0.1$,
 10 etanol. O composto do título foi mostrado para inibir receptor amargo hT2R08 e ter um IC_{50} de 0.12 μM .

Exemplo 10-4: (R)-5-benzil-3-(1-((3,5-dimetilisoxazol-4-il)metil)-1H-pirazol-4-il)imidazolidina-2,4-diona



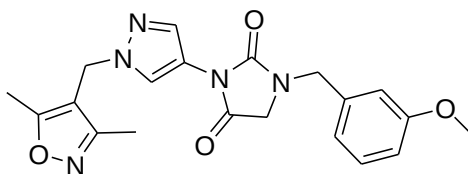
Preparado como no Exemplo 10-1 de (R)-fenilalanina metil éster cloridrato e 1-((3,5-dimetilisoxazol-4-il)metil)-1H-pirazol-4-carbonil azida. Rendimento: 9% isolado de cromatografia quiral ^1H NMR (CDCl_3 , 400 MHz): δ 2.19 (s, 3H), 2.42 (s, 3H), 2.88 (dd, $J = 13.6, 9.2$ Hz, 1H), 3.35 (dd, $J = 13.6, 3.6$ Hz, 1H), 4.31-4.35 (m, 1H) 5.06 (s, 2H), 5.53 (bs, 1H), 7.21-7.36 (m, 5H), 7.85 (s, 1H), 8.01 (s, 1H). MS $[\text{M}+\text{H}]$ calculado 366.15; encontrado 366.1. $[\alpha]_{\text{D}} = (+)-124$, $c=0.2$,
 20 etanol. O composto do título foi mostrado para inibir receptor amargo hT2R08 e ter um IC_{50} de 0.11 μM .
 25

Exemplo 10-5: 3-(1-((3,5-dimetilisoxazol-4-il)metil)-1H-pirazol-4-il)-1-(2-fenoxietil)imidazolidina-2,4-diona



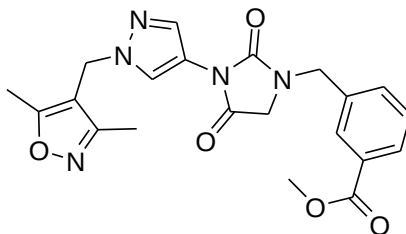
3-(1-((3,5-dimetilisoxazol-4-il)metil)-1H-pirazol-4-il)imidazolidina-2,4-diona (Exemplo 10-1) (200 mg, 0.7 mmol), (2-bromoetóxi)benzeno (200 mg, 1 mmol), e carbonato de céσιο (325 mg, 1 mmol) foram irradiados no reator de micro-ondas a 85 °C durante 20 minutos. A reação foi resfriada à temperatura ambiente, diluída com 1N HCl aquoso (100 mL) e extraída com acetato de etila (3x, 75 mL). Os extratos orgânicos combinados foram secos sob sulfato de sódio, filtrados e concecntrados. O resíduo foi absorvido em metanol (10 mL) e purificado por fase reversa HPLC (5 a 95% acetonitrila em H₂O: gradiente de 25 minutos). As frações puras foram vertidas, concentradas, depois redissolvidas em etanol absoluto e concentradas em evaporador rotatório (4x) para fornecer 3-(1-((3,5-dimetilisoxazol-4-il)metil)-1H-pirazol-4-il)-1-(2-fenoxietil)imidazolidina-2,4-diona (150 mg, 54%) como um sólido branco.¹H NMR (CDCl₃2.18□, 400 MHz): δ (s, 3H), 2.41 (s, 3H), 3.86 (t, J = 5.2 Hz, 2H), 4.19 (t, J = 4.4 Hz, 2H), 4.25 (s, 2H), 5.05 (s, 2H), 6.88 (dd, J = 9.2, 1.2 Hz, 2H), 7.00 (dt, J = 7.6, 1.2 Hz, 1H), 7.27-7.32 (m, 2H), 7.89 (s, 1H), 8.05 (s, 1H). MS M+H calculado 396.17; encontrado 396.1. Ponto de fusão: 117-118 °C. O composto do título foi mostrado para inibir receptor amargo hT2R08 e ter um IC₅₀ de 0.06 μM.

Exemplo 10-6: 3-(1-((3,5-dimetilisoxazol-4-il)metil)-1H-pirazol-4-il)-1-(3-metoxibenzil)imidazolidina-2,4-diona



Preparado como no Exemplo 10-5 de 3-(1-((3,5-dimetilisoxazol-4-il)metil)-1H-pirazol-4-il)imidazolidina-
 5 2,4-diona (Exemplo 6) e brometo de 3-metóxi-benzila. Rendimento: 55%. ^1H NMR (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). O composto do título foi mostrado para inibir
 10 receptor amargo hT2R08 e ter um IC_{50} de 0.07 μM .

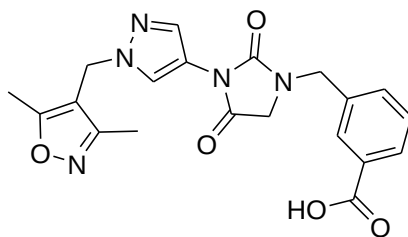
Exemplo 10-7: Metil 3-((3-(1-((3,5-dimetilisoxazol-4-il)metil)-1H-pirazol-4-il)-2,4-dioxoimidazolidin-1-il)metil)benzoato



15

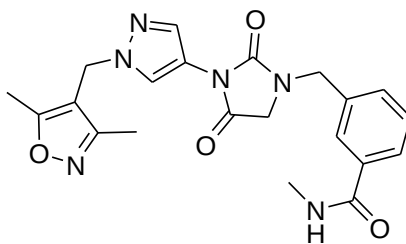
Preparado como no Exemplo 10-5 de 3-(1-((3,5-dimetilisoxazol-4-il)metil)-1H-pirazol-4-il)imidazolidina-
 2,4-diona e brometo de 3-metóxi-benzila. Rendimento: 83%.
 20 ^1H NMR (CDCl_3 , 400 MHz): δ 2.20 (s, 3H), 2.43 (s, 3H), 3.86 (s, 2H), 3.93 (s, 3H), 4.67 (s, 2H), 5.07 (s, 2H), 7.45-7.52 (m, 2H), 7.93 (s, 1H), 7.95 (s, 1H), 8.03 (dd, J = 7.2, 1.6 Hz, 1H), 8.08 (s, 1H). O composto do título foi mostrado para inibir receptor amargo hT2R08 e ter um IC_{50} de 0.09 μM .

25 **Exemplo 10-8: 3-((3-(1-((3,5-dimetilisoxazol-4-il)metil)-1H-pirazol-4-il)-2,4-dioxoimidazolidin-1-il)metil)ácido benzoico**



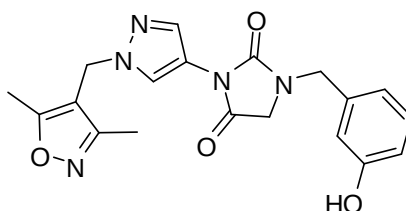
3-((3-(1-((3,5-dimetilisoxazol-4-il)metil)-1H-pirazol-4-il)imidazolidina-2,4-diona (500 mg, 1.8 mmol) (Exemplo 10-5), metil 3-(bromometil)benzoato (456 mg, 2 mmol), e carbonato de césio (650 mg, 2 mmol) foram agitados em DMF (4 mL) no reator de micro-ondas a 85 °C durante 20 minutos. A reação foi resfriada, diluída com 1N de HCl aquoso (100 mL) e extraída com acetato de etila (3x, 75 mL). Os extratos orgânicos combinados foram secos sob sulfato de sódio, filtrados e concentrados. O éster bruto foi dissolvido em metanol (5 mL) e NaOH aquoso (50 mL, 10% em peso) foi adicionado e a mistura foi agitada à temperatura ambiente durante 2 horas. A reação foi acidificada com 1N HCl (150 mL) e extraída com acetato de etila (3x, 75 mL). Os extratos orgânicos combinados foram secos sob sulfato de sódio, filtrados, e concentrados em evaporador rotatório. O ácido livre foi triturado com acetato de etila/hexanos (1/9) e seco sob vácuo para fornecer 3-((3-(1-((3,5-dimetilisoxazol-4-il)metil)-1H-pirazol-4-il)-2,4-dioxoimidazolidin-1-il)metil) ácido benzoico (610.mg, 83%) como um sólido branco.¹H NMR (DMSO-d₆, 400 2.13 (s, 3H), 2.29 (s, 3H), 4.00 (s, 2H), 4.59 (s, 2H), 5.18 (s, 2H), □MHz): δ 7.46-7.59 (m, 2H), 7.78 (s, 1H), 7.85-7.88 (m, 2H), 8.18 (s, 1H). O composto do título foi mostrado para inibir receptor amargo hT2R08 e ter um IC₅₀ de 1.8 μM.

Exemplo 10-9: 3-((3-(1-((3,5-dimetilisoxazol-4-il)metil)-1H-pirazol-4-il)-2,4-dioxoimidazolidin-1-il)metil)-N-metilbenzamida



3-((3-(1-((3,5-dimetilisoxazol-4-il)metil)-1H-pirazol-4-il)-2,4-dioxoimidazolidin-1-il)metil) ácido benzoico (100 mg, 0.24 mmol) (Exemplo 10-8), cloridrato de metilamina (67 mg, 1 mmol), trietilamina (155 mg, 1.5 mmol), e EDC (57 mg, 0.3 mmol) em acetonitrila (3 mL) foram irradiados no reator de micro-ondas a 80 °C durante 10 minutos. A reação foi resfriada, diluída com 1N HCl aquoso (100 mL) e extraída com acetato de etila (3x, 75 mL). Os extratos orgânicos combinados foram secos sob sulfato de sódio, filtrados e concentrados. O produto bruto foi dissolvido em MeOH (3 mL) e purificado por HPLC de fase reversa (5 a 95% acetonitrila em H₂O: gradiente de 25 minutos) para fornecer 3-((3-(1-((3,5-dimetilisoxazol-4-il)metil)-1H-pirazol-4-il)-2,4-dioxoimidazolidin-1-il)metil)-N-metilbenzamida (25 mg, 25%) como sólido branco. MS M+H calculado 423.17; encontrado 423.2. O composto do título foi mostrado para inibir receptor amargo hT2R08 e ter um IC₅₀ de 0.14 µM.

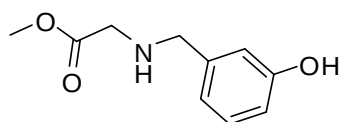
Exemplo 10-10: 3-(1-((3,5-dimetilisoxazol-4-il)metil)-1H-pirazol-4-il)-1-(3-hidroxibenzil)imidazolidina-2,4-diona:



Preparado como no Exemplo 10-1 de 1-((3,5-dimetilisoxazol-4-il)metil)-1H-pirazol-4-carbonil azida (Exemplo 10-1a) e metil 2-(3-hidroxibenzilamino)acetato

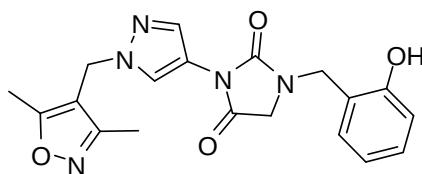
(Exemplo 10-10a). Rendimento: 24%. ^1H NMR (DMSO, 400 MHz): δ 2.15 (s, 3H), 2.41 (s, 3H), 3.99 (s, 2H), 4.45 (s, 2H), 5.21 (s, 2H), 6.70 (m, 3H), 7.15 (m, H), 7.80 (s, 1H), 8.19 (s, H), 9.44 (s, H). LC/MS; [M+H] esperado 382.1; encontrado 382.1. Ponto de fusão: 35-136 °C. O composto do título foi mostrado para inibir receptor amargo hT2R08 e ter um IC_{50} de 0.035 μM .

Exemplo 10-10a: metil 2-(3-hidroxibenzilamino)acetato:



Metil éster de glicina (500mg, 4mmol) e 3-hidroxibenzaldeído (480mg, 4mmol) foram dissolvidos em 5mL THF/Metanol (1:1). Ácido acético (240mg, 4mmol), e 1M de cianoborohidreto de sódio em THF (4.8mL, 4.8 mmol) foram adicionados lentamente na reação. A reação foi irradiada no reator de micro-ondas a 85 °C durante 15 minutos, resfriada à temperatura ambiente e os sais foram removidos por filtração. A solução clara foi concentrada e o resíduo foi purificado por HPLC de fase reversa (10 a 95% Acetonitrila em H_2O : gradiente de 25 minutos) para fornecer o composto do título como um gel claro. Rendimento 45%. MS M+H calculado 196.1; encontrado 196.1.

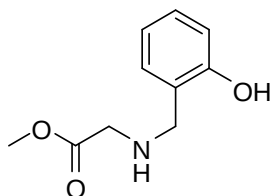
Exemplo 10-11: 3-(1-((3,5-dimetilisoxazol-4-il)metil)-1H-pirazol-4-il)-1-(2-hidroxibenzil)imidazolidina-2,4-diona:



Preparado como no Exemplo 10-1 de 1-((3,5-dimetilisoxazol-4-il)metil)-1H-pirazol-4-carbonil azida

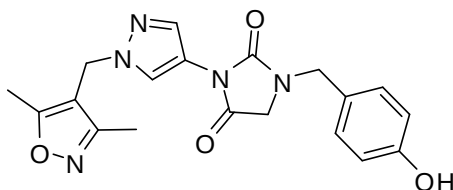
(Exemplo 10-1a) e metil 2-(2-hidroxibenzilamino)acetato (Exemplo 10-11a). Rendimento: 28%. ^1H NMR (DMSO, 400 MHz): δ 2.12 (s, 3H), 2.38 (s, 3H), 4.00 (s, 2H), 4.45 (s, 2H), 5.17 (s, 2H), 6.83 (m, 2H), 7.10 (m, 2H), 7.78 (s, 1H), 8.16 (s, H), 9.66 (s, H). LC/MS; [M+H] esperado 382.1; encontrado 382.2. O composto do título foi mostrado para inibir receptor amargo hT2R08 e ter um IC_{50} de 0.07 μM .

Exemplo 10-11a: metil 2-(2-hidroxibenzilamino)acetato:



Preparado como no Exemplo 10-10a de glicina metil éster e 2-hidroxibenzaldeído. Rendimento 40%. MS M+H calculado 196.1; encontrado 196.1

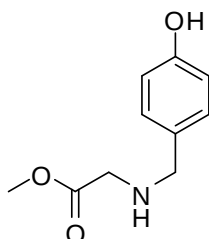
Exemplo 10-12: 3-(1-((3,5-dimetilisoxazol-4-il)metil)-1H-pirazol-4-il)-1-(4-hidroxibenzil)imidazolidina-2,4-diona:



Preparado como no Exemplo 10-1 de 1-((3,5-dimetilisoxazol-4-il)metil)-1H-pirazol-4-carbonil azida e metil 2-(4-hidroxibenzilamino)acetato (Exemplo 10-12a). Rendimento: 9%. ^1H NMR (DMSO, 400 MHz): δ 2.117 (s, 3H), 2.383 (s, 3H), 3.918 (s, 2H), 4.387 (s, 2H), 5.174 (s, 2H), 6.719 (J=8.8, d, 2H), 7.108 (J=8.8, m, 2H), 7.761 (s, 1H), 8.154 (s, H), 9.399 (s, H). LC/MS; [M+H] esperado 382.1;

encontrado 382.2. O composto do título foi mostrado para inibir receptor amargo hT2R08 e ter um IC₅₀ de 0.06uM.

Exemplo 10-12a: metil 2-(4-hidroxibenzilamino)acetato:

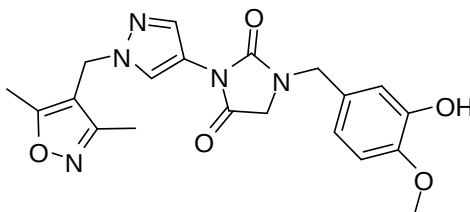


5

Preparado como no Exemplo 10-10a de glicina metil éster e 4-hidroxibenzaldeído. Rendimento 40%. MS M+H calculado 196.1; encontrado 196.1

Exemplo 10-13: 3-(1-((3,5-dimetilisoxazol-4-il)metil)-1H-

10 **pirazol-4-il)-1-(3-hidróxi-4-metoxibenzil)imidazolidina-2,4-diona:**



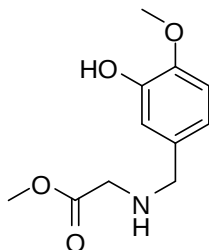
15

Preparado como no Exemplo 10-1 de 1-((3,5-dimetilisoxazol-4-il)metil)-1H-pirazol-4-carbonil azida (Exemplo 10-1a) e metil 2-(3-hidróxi-4-metoxibenzilamino)acetato (Exemplo 10-13a). Rendimento 22%.

20 ¹H NMR (DMSO, 400 MHz): δ 2.119 (s, 3H), 2.383 (s, 3H), 3.716 (s, 3H), 3.923 (s, 2H), 4.361 (s, 2H), 5.117 (s, 2H), 6.667 (m, 2H), 6.863 (J=8.4, d, 1H), 7.766 (s, H), 8.159 (s, H). MS M+H calculado 412.1; encontrado 412.1. O composto do título foi mostrado para inibir receptor amargo hT2R08 e ter um IC₅₀

25 de 0.1uM.

Exemplo 10-13a: metil 2-(3-hidróxi-4-metoxibenzilamino)acetato:

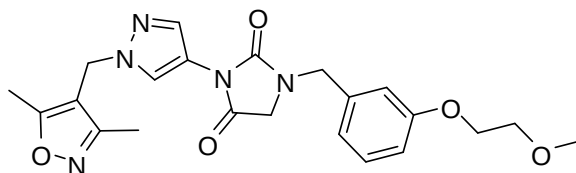


5

Preparado como no Exemplo 10-10a de glicina metil éster e 3-hidróxi-4-metoxibenzaldeído. Rendimento 47%. MS M+H calculado 226.1; encontrado 226.1

Exemplo 10-14: 3-(1-((3,5-dimetilisoxazol-4-il)metil)-1H-

pirazol-4-il)-1-(3-(2-metoxietóxi)benzil)imidazolidina-2,4-diona:



15

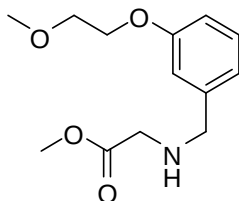
Preparado como no Exemplo 10-1 de 1-((3,5-dimetilisoxazol-4-il)metil)-1H-pirazol-4-carbonil azida (Exemplo 10-1a) e metil 2-(3-(2-metoxietóxi)benzilamino)acetato (Exemplo 10-14a). Rendimento 27%. ¹H NMR (DMSO, 400 MHz): δ 2.12 (s, 3H), 2.38 (s, 3H), 3.26 (s, 3H), 3.62 (t, J=4.4, 2H), 3.98 (s, 2H), 4.06 (t, J=4.4, 2H), 4.48 (s, 2H), 5.18 (s, 2H), 6.86 (m, 3H), 7.24 (t, J=8, 1H), 7.78 (s, 1H), 8.17 (s, 1H). MS M+H calculado 440.2; encontrado 440.2. O composto do

20

título foi mostrado para inibir receptor amargo hT2R08 e ter um IC₅₀ de 0.07uM.

Exemplo 10-14a: metil 2-(3-(2-metoxietóxi)benzilamino)

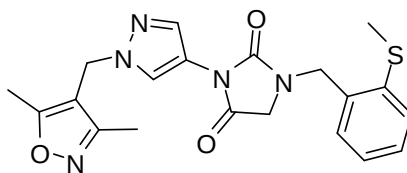
acetato:



5

Preparado como no Exemplo 10-10a de glicina metil éster e 3-(2-metoxietóxi)benzaldeído. Rendimento 55%. MS M+H calculado 254.1; encontrado 254.1

10 **Exemplo 10-15: 3-(1-((3,5-dimetilisoxazol-4-il)metil)-1H-pirazol-4-il)-1-(2-(metiltio)benzil)imidazolidina-2,4-diona:**

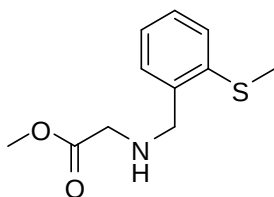


15

Preparado como no Exemplo 10-1 de 1-((3,5-dimetilisoxazol-4-il)metil)-1H-pirazol-4-carbonil azida (Exemplo 10-1a) e metil 2-(2-(metiltio)benzilamino)acetato (Exemplo 10-15a). Rendimento 67%. ¹H NMR (DMSO, 400 MHz):

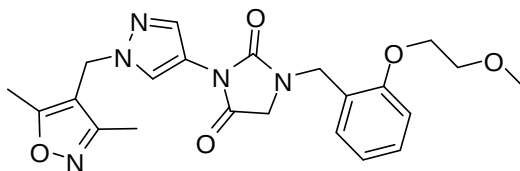
20 δ 2.12 (s, 3H), 2.39 (s, 3H), 2.48 (s, 3H), 3.98 (s, 2H), 4.54 (s, 2H), 5.19 (s, 2H), 7.18 (m, 1H), 7.30 (m, 3H), 7.79 (s, 1H), 8.18 (s, 1H). LC/MS; [M+H] esperado 412.1; encontrado 412.1. O composto do título foi mostrado para inibir receptor amargo hT2R08 e ter um IC₅₀ de 0.03uM.

25 **Exemplo 10-15a: metil 2-(2-(metiltio)benzilamino)acetato:**



Preparado como no Exemplo 10-10a de glicina metil éster
 5 e 2-(metiltio)benzaldeído. Rendimento 50%. MS M+H calculado 226.1; encontrado 226.1

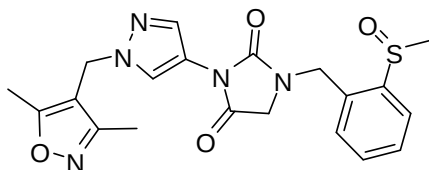
Exemplo 10-16: 3-(1-((3,5-dimetilisoxazol-4-il)metil)-1H-pirazol-4-il)-1-(2-(2-metoxietóxi)benzil)imidazolidina-2,4-diona:



10

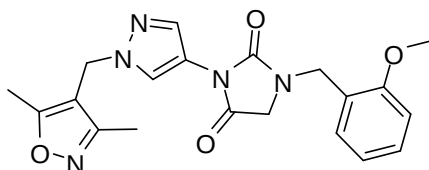
Preparado como no Exemplo 10-5 de 3-(1-((3,5-dimetilisoxazol-4-il)metil)-1H-pirazol-4-il)-1-(2-hidroxibenzil)imidazolidina-2,4-diona (Exemplo 10-11) e 2-bromoetil metil éter. Rendimento 19%. ¹H NMR (DMSO, 400 MHz):
 15 δ 2.11 (s, 3H), 2.08 (s, 3H), 3.25 (s, 3H), 3.64 (t, J=3.6, 2H), 4.00 (s, 2H), 4.11 (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). O composto do título foi mostrado para
 20 inibir receptor amargo hT2R08 e ter um IC₅₀ de 0.1 μ M.

Exemplo 10-17: 33-(1-((3,5-dimetilisoxazol-4-il)metil)-1H-pirazol-4-il)-1-(2-(metilsulfinil)benzil)imidazolidina-2,4-diona:



Em um frasco de micro-ondas de 20mL, 3-(1-((3,5-
 5 dimetilisoxazol-4-il)metil)-1H-pirazol-4-il)-1-(2-
 (metiltio)benzil)imidazolidina-2,4-diona (Exemplo 10-15) (70
 mg, 0.17 mmol) e m-CPBA (58 mg, 0.34 mmol) foram dissolvidos
 em diclorometano a 0 °C. A reação foi agitada a 0 °C e
 deixada aquecer à temperatura ambiente durante 4 horas.
 10 Solvente da reação foi removido sob vácuo, e o produto bruto
 foi dissolvido em 1 mL de etanol e foi purificado por HPLC
 varian (10 a 95% Acetonitrila/água; 25 minutos). A fração
 purificada foi evaporada sob vácuo para fornecer o composto
 do título. MS M+H calculado 428.1; encontrado 428.1. O
 15 composto do título foi mostrado para inibir receptor amargo
 hT2R08 e ter um IC₅₀ de 0.4uM. Rendimento: 12mg, 17%.

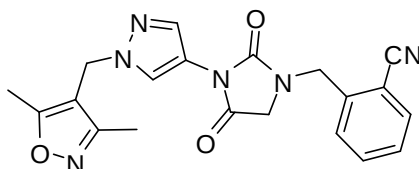
**Exemplo 10-18: 3-(1-((3,5-dimetilisoxazol-4-il)metil)-1H-
 pirazol-4-il)-1-(2-metoxibenzil)imidazolidina-2,4-diona:**



20

Preparado como no Exemplo 10-5 de 3-(1-((3,5-
 dimetilisoxazol-4-il)metil)-1H-pirazol-4-il)imidazolidina-
 2,4-diona (Exemplo 10-1) e 1-(bromometil)-2-metoxibenzeno
 25 (199 mg, 1 mmol). Rendimento: 33%. MS M+H calculado 396.1;
 encontrado 396.1. O composto do título foi mostrado para
 inibir receptor amargo hT2R08 e ter um IC₅₀ de 0.06uM.

Exemplo 10-19: 2-((3-(1-((3,5-dimetilisoxazol-4-il)metil)-1H-pirazol-4-il)-2,4-dioxoimidazolidin-1-il)metil)benzonitrila:

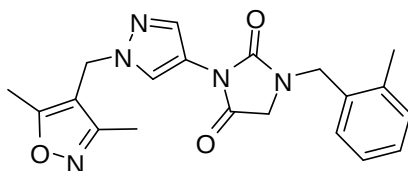


5

Preparado como no Exemplo 10-5 de 3-(1-((3,5-dimetilisoxazol-4-il)metil)-1H-pirazol-4-il)imidazolidina-2,4-diona (Exemplo 10-1) e 2-(bromometil)benzonitrila.
 10 Rendimento: 27%. MS M+H calculado 391.1; encontrado 391.1. O composto do título foi mostrado para inibir receptor amargo hT2R08 e ter um IC₅₀ de 0.5 µM.

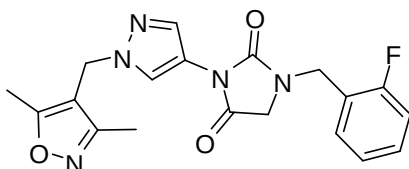
Exemplo 10-20: 3-(1-((3,5-dimetilisoxazol-4-il)metil)-1H-pirazol-4-il)-1-(2-metilbenzil)imidazolidina-2,4-diona:

15



Preparado como no Exemplo 10-5 de 3-(1-((3,5-dimetilisoxazol-4-il)metil)-1H-pirazol-4-il)imidazolidina-2,4-diona (Exemplo 10-1) e 1-(bromometil)-2-metilbenzeno.
 20 Rendimento: 21%. MS M+H calculado 380.1; encontrado 380.1. O composto do título foi mostrado para inibir receptor amargo hT2R08 e ter um IC₅₀ de 0.1µM.

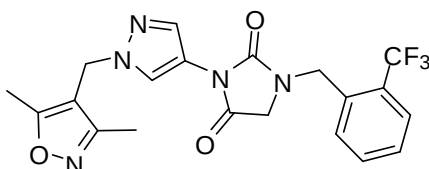
Exemplo 10-21: 3-(1-((3,5-dimetilisoxazol-4-il)metil)-1H-pirazol-4-il)-1-(2-fluorobenzil)imidazolidina-2,4-diona:



5 Preparado como no Exemplo 10-5 de 3-(1-((3,5-dimetilisoxazol-4-il)metil)-1H-pirazol-4-il)imidazolidina-2,4-diona (Exemplo 10-1) e 1-(bromometil)-2-fluorobenzeno. Rendimento 42%. MS M+H calculado 384.1; encontrado 384.1. O
10 composto do título foi mostrado para inibir receptor amargo hT2R08 e ter um IC₅₀ de 0.08uM.

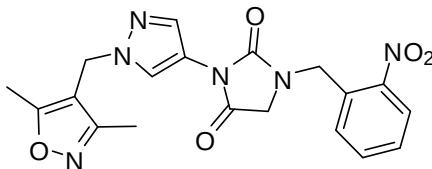
Exemplo 10-22: 3-(1-((3,5-dimetilisoxazol-4-il)metil)-1H-pirazol-4-il)-1-(2-(trifluorometil)benzil)imidazolidina-2,4-diona:

15



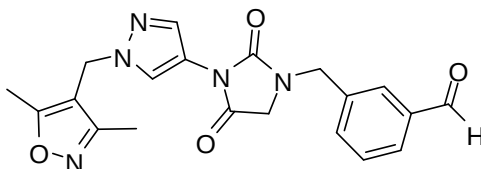
Preparado como no Exemplo 10-5 de 3-(1-((3,5-dimetilisoxazol-4-il)metil)-1H-pirazol-4-il)imidazolidina-2,4-diona (Exemplo 10-1) e 1-(bromometil)-2-(trifluorometil)benzeno. Rendimento: 37%. MS M+H calculado 434.1; encontrado 434.1. O composto do título foi mostrado
20 para inibir receptor amargo hT2R08 e ter um IC₅₀ de 0.2uM.

Exemplo 10-23: 3-(1-((3,5-dimetilisoxazol-4-il)metil)-1H-pirazol-4-il)-1-(2-nitrobenzil)imidazolidina-2,4-diona:



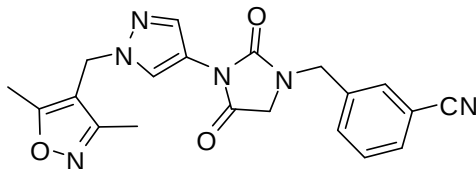
5 Preparado como no Exemplo 10-5 de 3-(1-((3,5-dimetilisoxazol-4-il)metil)-1H-pirazol-4-il)imidazolidina-2,4-diona (Exemplo 10-1) e 1-(bromometil)-2-nitrobenzeno. Rendimento 22%. MS M+H calculado 411.1; encontrado 411.1. O
10 composto do título foi mostrado para inibir receptor amargo hT2R08 e ter um IC₅₀ de 0.07uM.

Exemplo 10-24: 3-((3-(1-((3,5-dimetilisoxazol-4-il)metil)-1H-pirazol-4-il)-2,4-dioxoimidazolidin-1-il)metil)benzaldeído:



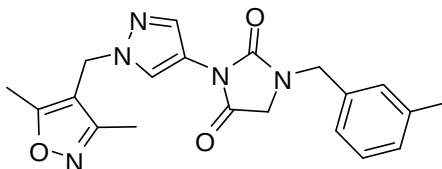
15 Preparado como no Exemplo 10-5 de 3-(1-((3,5-dimetilisoxazol-4-il)metil)-1H-pirazol-4-il)imidazolidina-2,4-diona (Exemplo 10-1) e 3-(bromometil)benzaldeído.
20 Rendimento: 35%. ¹H NMR (DMSO, 400 MHz): δ2.123 (s, 3H), 2.388 (s, 3H), 4.035 (s, 2H), 4.631 (s, 2H), 5.186 (s, 2H), 7.581 (m, 1H), 7.643 (m, 1H), 7.787 (m, 3H), 8.178 (s, H), 9.997 (s, H). O composto do título foi mostrado para inibir receptor amargo hT2R08 e ter um IC₅₀ de 0.2uM.

Exemplo 10-25: 3-((3-(1-((3,5-dimetilisoxazol-4-il)metil)-1H-pirazol-4-il)-2,4-dioxoimidazolidin-1-il)metil)benzonitrila:



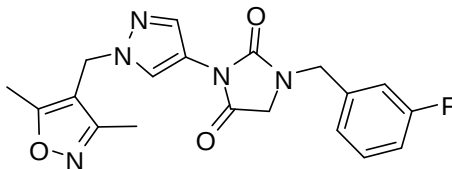
5 Preparado como no Exemplo 10-5 de 3-(1-((3,5-dimetilisoxazol-4-il)metil)-1H-pirazol-4-il)imidazolidina-2,4-diona (Exemplo 10-1) e 3-(bromometil)benzonitrila. Rendimento 21%. MS M+H calculado 411.1; encontrado 411.1. O
10 composto do título foi mostrado para inibir receptor amargo hT2R08 e ter um IC₅₀ de 1uM.

Exemplo 10-26: 3-(1-((3,5-dimetilisoxazol-4-il)metil)-1H-pirazol-4-il)-1-(3-metilbenzil)imidazolidina-2,4-diona:



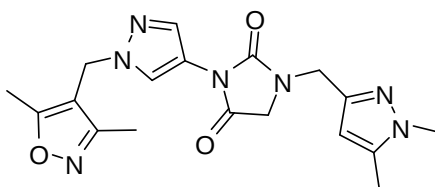
15 Preparado como no Exemplo 10-5 de 3-(1-((3,5-dimetilisoxazol-4-il)metil)-1H-pirazol-4-il)imidazolidina-2,4-diona (Exemplo 10-1) e 1-(bromometil)-3-metilbenzeno. Rendimento 25%. MS M+H calculado 380.1; encontrado 380.1. O
20 composto do título foi mostrado para inibir receptor amargo hT2R08 e ter um IC₅₀ de 0.02uM.

Exemplo 10-27: 3-(1-((3,5-dimetilisoxazol-4-il)metil)-1H-pirazol-4-il)-1-(3-fluorobenzil)imidazolidina-2,4-diona:



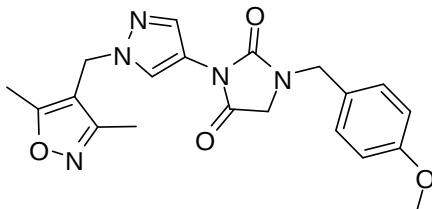
5 Preparado como no Exemplo 10-5 de 3-(1-((3,5-dimetilisoxazol-4-il)metil)-1H-pirazol-4-il)imidazolidina-2,4-diona (Exemplo 10-1) e 1-(bromometil)-3-fluorobenzeno. Rendimento 27%. MS M+H calculado 384.1; encontrado 384.1. O
10 composto do título foi mostrado para inibir receptor amargo hT2R08 e ter um IC₅₀ de 0.06uM.

Exemplo 10-28: 1-((1,5-dimetil-1H-pirazol-3-il)metil)-3-(1-((3,5-dimetilisoxazol-4-il)metil)-1H-pirazol-4-il)imidazolidina-2,4-diona:



15 Preparado como no Exemplo 10-5 de 3-(1-((3,5-dimetilisoxazol-4-il)metil)-1H-pirazol-4-il)imidazolidina-2,4-diona (Exemplo 10-1) e 3-(bromometil)-1,5-dimetil-1H-pirazol. Rendimento: 22%. MS M+H calculado 384.1; encontrado 384.1. O composto do título foi mostrado para inibir receptor amargo hT2R08 e ter um IC₅₀ de 0.3uM
20

Exemplo 10-29: 3-(1-((3,5-dimetilisoxazol-4-il)metil)-1H-pirazol-4-il)-1-(4-metoxibenzil)imidazolidina-2,4-diona:

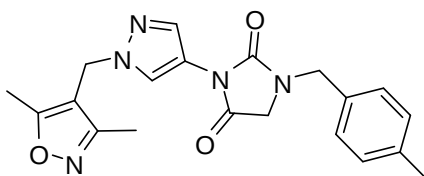


5

Preparado como no Exemplo 10-5 de 3-(1-((3,5-dimetilisoxazol-4-il)metil)-1H-pirazol-4-il)imidazolidina-2,4-diona (Exemplo 10-1) e 1-(bromometil)-4-metoxibenzeno. Rendimento 19%. MS M+H calculado 396.1; encontrado 396.1. O composto do título foi mostrado para inibir receptor amargo hT2R08 e ter um IC₅₀ de 0.07uM.

10

Exemplo 10-30: 3-(1-((3,5-dimetilisoxazol-4-il)metil)-1H-pirazol-4-il)-1-(4-metilbenzil)imidazolidina-2,4-diona:

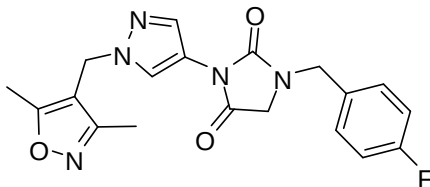


15

Preparado como no Exemplo 10-5 de 3-(1-((3,5-dimetilisoxazol-4-il)metil)-1H-pirazol-4-il)imidazolidina-2,4-diona (Exemplo 10-1) e 1-(bromometil)-4-metilbenzeno. Rendimentos 25%. MS M+H calculado 380.1; encontrado 380.1. O composto do título foi mostrado para inibir receptor amargo hT2R08 e ter um IC₅₀ de 0.06uM.

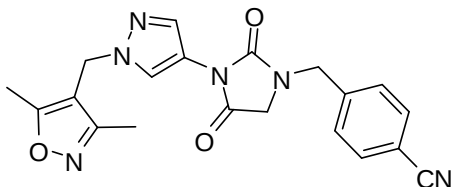
20

Exemplo 10-31: 3-(1-((3,5-dimetilisoxazol-4-il)metil)-1H-pirazol-4-il)-1-(4-fluorobenzil)imidazolidina-2,4-diona:



5 Preparado como no Exemplo 10-5 de 3-(1-((3,5-dimetilisoxazol-4-il)metil)-1H-pirazol-4-il)imidazolidina-2,4-diona (Exemplo 10-1) e 1-(bromometil)-4-fluorobenzeno. Rendimento 33%. MS M+H calculado 384.1; encontrado 384.1. O composto do título foi mostrado para inibir receptor amargo
10 hT2R08 e ter um IC_{50} de 0.05uM.

Exemplo 10-32: 4-((3-(1-((3,5-dimetilisoxazol-4-il)metil)-1H-pirazol-4-il)-2,4-dioxoimidazolidin-1-il)metil)benzonitrila:

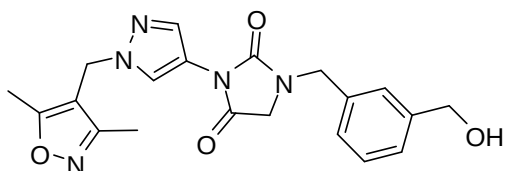


15

Preparado como no Exemplo 10-5 de 3-(1-((3,5-dimetilisoxazol-4-il)metil)-1H-pirazol-4-il)imidazolidina-2,4-diona (Exemplo 10-1) e 4-(bromometil)benzonitrila.
20 Rendimento 21%. MS M+H calculado 391.1; encontrado 391.2. O composto do título foi mostrado para inibir receptor amargo hT2R08 e ter um IC_{50} de 0.05uM.

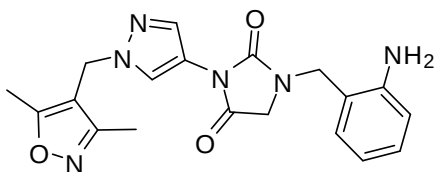
Exemplo 10-33: 3-(1-((3,5-dimetilisoxazol-4-il)metil)-1H-pirazol-4-il)-1-(3-(hidroximetil)benzil)imidazolidina-2,4-diona:

5



3-((3-(1-((3,5-dimetilisoxazol-4-il)metil)-1H-pirazol-4-il)-2,4-dioxoimidazolidin-1-il)metil)benzaldeído (Exemplo 10-24) (131mg, 0.3 mmol) foi dissolvido em 2 mL de etanol. A solução foi passada através do instrumento H-Cubo à temperatura ambiente usando 10% de catalisador Pd/C a uma taxa de fluxo de 1ml/minuto. A fração coletada foi concentrada, redissolvida em 2 mL de etanol e purificada por HPLC (10-95% Acetonitrila/água, 25 minutos). As frações purificadas foram combinadas e concentradas para fornecer o composto do título. ¹H NMR (DMSO, 400 MHz): δ 2.123 (s, 3H), 2.388 (s, 3H), 3.978 (s, 2H), 4.516 (s, 2H), 5.182 (s, 2H), 7.242 (m, 4H), 7.779 (s, 1H), 8.172 (s, 1H), 8.505 (s, 1H). MS M+H calculado 396.1; encontrado 396.1. O composto do título foi mostrado para inibir receptor amargo hT2R08 e ter um IC₅₀ de 0.3uM. Rendimento: 24mg, 18%.

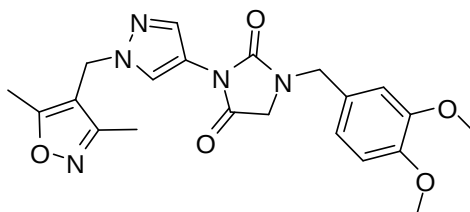
Exemplo 10-34: 1-(2-aminobenzil)-3-(1-((3,5-dimetilisoxazol-4-il)metil)-1H-pirazol-4-il)imidazolidina-2,4-diona:



25

3-(1-((3,5-dimetilisoaxazol-4-il)metil)-1H-pirazol-4-il)-
 1-(2-nitrobenzil)imidazolidina-2,4-diona (Exemplo 10-23)
 (126mg, 0.3 mmol) foi dissolvida em 2 mL de etanol. A
 solução foi passada através do instrumento H-Cubo à
 5 temperatura ambiente usando 10% de catalisador Pd/C a uma
 taxa de fluxo de 1ml/minuto. A fração coletada foi
 concentrada, redissolvida em 2mL de etanol e purificada por
 HPLC (10-95% Acetonitrila/água, 25 minutos). The frações
 purificadas foram combinadas e concentradas para fornecer o
 10 composto do título. Rendimento 26%. MS M+H calculado 381.1;
 encontrado 381.1. O composto do título foi mostrado para
 inibir receptor amargo hT2R08 e ter um IC₅₀ de 0.02uM.

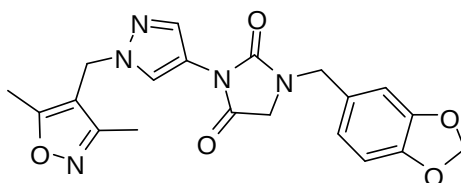
Exemplo 10-35: 1-(3,4-dimetoxibenzil)-3-(1-((3,5-
dimetilisoaxazol-4-il)metil)-1H-pirazol-4-il)imidazolidina-
 15 **2,4-diona:**



3-(1-((3,5-dimetilisoaxazol-4-il)metil)-1H-pirazol-4-
 il)imidazolidina-2,4-diona (Exemplo 10-1) (275 mg, 1 mmol),
 20 (3,4-dimetoxifenil)metanol (201 mg, 1.2 mmol), N,N,N,N-
 tetrametilazodicarboxamida (344 mg, 2 mmol) foram dissolvidos
 em 2 mL de THF anidro. Tributílfosfina (404 mg, 2 mmol) foi
 adicionada e a mistura de reação foi colocada em um reator de
 micro-ondas durante 5 minutos a 90 °C. A solução foi
 25 filtrada, concentrada e purificada por HPLC (10-95%
 Acetonitrila/água, 25 minutos) para fornecer o composto do
 título. Rendimento: 25mg, 6%. ¹H NMR (DMSO, 400 MHz): δ2.119
 (s, 3H), 2.385 (s, 3H), 3.724 (J=6.4 d, 6H), 3.946 (s, 2H),
 4.435 (s, 2H), 5.178 (s, 2H), 6.885 (m, 3H), 7.776 (s, 1H),

8.166 (s, 1H). MS M+H calculado 426.1; encontrado 426.1. O composto do título foi mostrado para inibir receptor amargo hT2R08 e ter um IC₅₀ de 0.06uM.

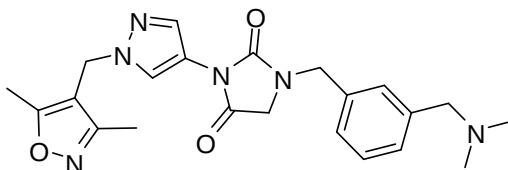
Exemplo 10-36: 1-(benzo[d][1,3]dioxol-5-ilmetil)-3-(1-((3,5-
5 dimetilisoxazol-4-il)metil)-1H-pirazol-4-il)imidazolidina-
2,4-diona:



Preparado como no Exemplo 10-35 de 3-(1-((3,5-

10 dimetilisoxazol-4-il)metil)-1H-pirazol-4-il)imidazolidina-
 2,4-diona (Exemplo 10-1) e benzo[d][1,3]dioxol-5-ilmetanol.
 Rendimento: 19%. ¹H NMR (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).
 15 MS M+H calculado 410.1; encontrado 410.1. O composto do
 título foi mostrado para inibir receptor amargo hT2R08 e ter
 um IC₅₀ de 0.07uM.

Exemplo 10-37: 1-(3-((dimetilamino)metil)benzil)-3-(1-((3,5-
dimetilisoxazol-4-il)metil)-1H-pirazol-4-il)imidazolidina-
20 2,4-diona:

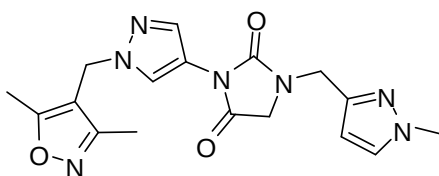


3-(1-((3,5-dimetilisoxazol-4-il)metil)-1H-pirazol-4-

25 il)imidazolidina-2,4-diona (Exemplo 10-1) (275 mg, 1 mmol)

1,3-bis(bromometil)benzeno (263 mg, 1 mmol), e carbonato de
 céσιο (325mg, 1 mmol) foram dissolvidos em 2 mL de DMF e
 irradiados no reator de micro-ondas a 165 °C durante 5
 minutos. A reação foi resfriada à temperatura ambiente, e
 5 precipitado de sal foi removido por filtração. A solução
 clara contendo produto bruto foi concentrada e redissolvida
 em acetato de etila. A solução orgânica foi lavada com água
 duas vezes seguida por salmoura. A camada orgânica foi seca
 sob sulfato de sódio e evaporada para fornecer o produto
 10 bruto que foi realizado seguido da próxima etapa sem
 purificação ou caracterização adicional. 1-(3-
 (bromometil)benzil)-3-(1-((3,5-dimetilisoxazol-4-il)metil)-
 1H-pirazol-4-il)imidazolidina-2,4-diona (Exemplo 42a) (152
 mg, 0.3 mmol), dimetilamina (2 M de solução em THF) (1.5 mL,
 15 3 mmol), e hidreto de sódio (9 mg, 0.36 mmol) foram
 dissolvidos em 1 mL de THF anidro. A reação foi colocada em
 um reator de micro-ondas durante 5 minutos a 120 °C. The
 produto bruto foi redissolvido em 2 mL de etanol e foi
 purificado por HPLC (10-95% Acetonitrila/água, 25 minutos)
 20 para fornecer 1-(3-((dimetilamino)metil)benzil)-3-(1-((3,5-
 dimetilisoxazol-4-il)metil)-1H-pirazol-4-il)imidazolidina-
 2,4-diona(16 mg, 13%). MS M+H calculado 423.1; encontrado
 423.1. O composto do título foi mostrado para inibir receptor
 amargo hT2R08 e ter um IC₅₀ de 1.2uM.

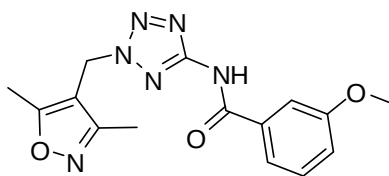
25 **Exemplo 10-38: 3-(1-((3,5-dimetilisoxazol-4-il)metil)-1H-
 pirazol-4-il)-1-((1-metil-1H-pirazol-3-il)metil)
 imidazolidina-2,4-diona:**



30

Preparado como no Exemplo 10-5 de 3-(1-((3,5-dimetilisoxazol-4-il)metil)-1H-pirazol-4-il)imidazolidina-2,4-diona (Exemplo 10-1) e 3-(bromometil)-1-metil-1H-pirazol. Rendimento 19%. MS M+H calculado 370.1; encontrado 370. O composto do título foi mostrado para inibir receptor amargo hT2R08 e ter um IC₅₀ de 0.4uM.

Exemplo 10-39: N-(2-((3,5-dimetilisoxazol-4-il)metil)-2H-tetrazol-5-il)-3-metoxibenzamida

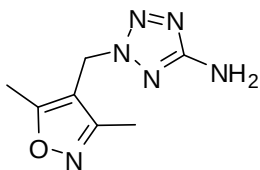


10

2-((3,5-dimetilisoxazol-4-il)metil)-2H-tetrazol-5-amina (Exemplo 10-39a) (102 mg, 0.528 mmol), cloreto de 3-metoxibenzoíla (0.065 mL, 0.528 mmol) e piridina (0.043 mL, 0.528 mmol) em acetonitrila (3 mL) foram agitados a 100 °C durante uma hora. A reação foi diluída com diclorometano (30 mL) e lavada com salmoura (30 mL). Os orgânicos foram secos sob sulfato de sódio, concentrados e purificados por HPLC de fase reversa (Sistema solvente: Acetonitrila/água 10% a 100% de gradiente), 25 minutos se passaram) fornecendo N-(2-((3,5-dimetilisoxazol-4-il)metil)-2H-tetrazol-5-il)-3-metoxibenzamida como um sólido cristalino branco (60 mg, 35 % Rendimento) MS M+H calculado 329.1, encontrado 329. ¹H NMR (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). O composto tinha um IC₅₀ em receptor amargo hT2R8 de 1.87 μM.

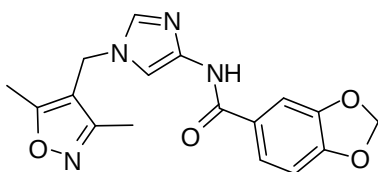
25

Exemplo 10-39a: 2-((3,5-dimetilisoxazol-4-il)metil)-2H-tetrazol-5-amina



2H-tetrazol-5-amina (1.29 g, 12.5 mmol), 4-(clorometil)-3,5-dimetilisoxazol (1.56 mL, 12.5 mmol) e carbonato de potássio (1.73 g, 15.5 mmol) em DMF (20 mL) foram aquecidos a 80°C com agitação durante 16 horas. A reação foi resfriada à temperatura ambiente, diluída com diclorometano (100 mL) e lavada consecutivamente com salmoura e água. Os orgânicos foram secos sob sulfato de sódio e concentrados com evaporação rotatória. O produto bruto foi purificado por cromatografia de sílica gel (0 - 10 % de gradiente de acetato de etila/diclorometano) fornecendo 2-((3,5-dimetilisoxazol-4-il)metil)-2H-tetrazol-5-amina como um sólido cristalino branco (970 mg, 40 % Rendimento) MS M+H calculado 195.1, encontrado 195.

Exemplo 10-40: N-(1-((3,5-dimetilisoxazol-4-il)metil)-1H-imidazol-4-il)benzo[d][1,3]dioxol-5-carboxamida



1-((3,5-dimetilisoxazol-4-il)metil)-1H-imidazol-4-amina (Exemplo 10-40a) (110 mg, 0.57 mmol), benzo[d][1,3]dioxol-5-cloreto de carbonila (105 mg, 0.57 mmol), e trietilamina (90 µL, 0.69 mmol) em diclorometano foram agitados durante 16 horas. A reação foi diluída com diclorometano (30 mL) e lavada consecutivamente com salmoura e água. Os orgânicos foram secos sob sulfato de sódio e concentrados por evaporação rotatória. O produto bruto foi purificado por

HPLC de fase reversa (Sistema solvente: Acetonitrila/água, 10% a 100% gradiente, 25 minutos se passaram) para fornecer N-(1-((3,5-dimetilisoxazol-4-il)metil)-1H-imidazol-4-il)benzo[d][1,3]dioxol-5-carboxamida como um sólido cristalino branco (32 mg, 15% de Rendimento). MS M+H calculado 341.3, encontrado 341.3. ¹H NMR (400MHz, DMSO-d₆): δ 2.08 (s, 3H), 2.41 (s, 3H), 5.02 (s, 2H), 6.07 (s, 2H), 6.95 (d, J = 8.4 Hz, 1H), 7.27 (d, J = 1.6 Hz, 1H), 7.54 (m, 3H), 10.6 (s, 1H). O composto tinha um IC₅₀ em receptor amargo hT2R8 de 12.1 µM.

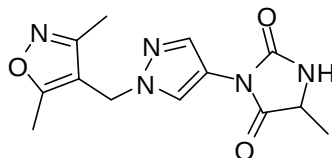
Exemplo 10-40a: 1-((3,5-dimetilisoxazol-4-il)metil)-1H-imidazol-4-amina

3,5-dimetil-4-((4-nitro-1H-imidazol-1-il)metil)isoxazol (Exemplo 10-40b) (1.0 g, 4.5 mmol) e 10% de paládio em carvão mineral (200 mg) em metanol (40 mL) foram agitados em um agitador Parr sob uma pressão de 2.5 bar de hidrogênio durante 2 horas. Filtração através de um tampão de celite seguida por evaporação rotatória forneceu 1-((3,5-dimetilisoxazol-4-il)metil)-1H-imidazol-4-amina como um sólido vermelho-amarelado (800 mg, 93 % de Rendimento). MS M+H calculado 193, encontrado 193.

Exemplo 10-40b: 3,5-dimetil-4-((4-nitro-1H-imidazol-1-il)metil)isoxazol

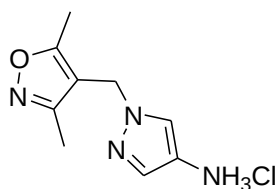
3,5-dimetil-4-((4-nitro-1H-imidazol-1-il)metil)isoxazol foi preparado em uma maneira similar aos Exemplos 10-41c por alquilação de 4-nitro-1H-imidazol fornecendo 3,5-dimetil-4-((4-nitro-1H-imidazol-1-il)metil)isoxazol como um sólido cristalino branco (5.0 g, 80% de Rendimento). MS M+H calculado 223, encontrado 223. ¹H NMR (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).

Exemplo 10-41: 3-(1-((3,5-dimetilisoxazol-4-il)metil)-1H-pirazol-4-il)-5-metilimidazolidina-2,4-diona



5 Cloridrato de 1-((3,5-dimetilisoxazol-4-il)metil)-1H-pirazol-4-amina (Exemplos 10-41a) (1.0 g, 5.20 mmol), etil-2-isocinatepropionato (0.745 g, 5.20 mmol) e trietilamina (1.5 mL, 10.4 mmol) foram misturados em EtOH (20 mL). A reação foi refluxada durante 12 horas e então deixada resfriar à
10 temperatura ambiente. Solvente foi removido sob vácuo e cristais formados sob descanso. Os cristais foram coletados e lavados com hexanos para fornecer 3-(1-((3,5-dimetilisoxazol-4-il)metil)-1H-pirazol-4-il)-5-metilimidazolidina-2,4-diona em 80% de rendimento como um sólido branco. ¹H NMR (DMSO-d₆,
15 400 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). O composto do título foi mostrado para inibir receptor amargo hT2R08 e ter um IC₅₀ de 1.3 μM.

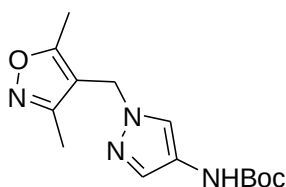
Exemplo 10-41a: Cloridrato de 1-((3,5-dimetilisoxazol-4-il)metil)-1H-pirazol-4-amina



Tert-butil 1-((3,5-dimetilisoxazol-4-il)metil)-1H-pirazol-4-ilcarbamato (Exemplo 10-41b) (592 mg, 2 mmol) foi agitado em uma solução de 4N HCl em dioxano (20 mL) à
25 temperatura ambiente durante 2 horas. O solvente foi removido e o resíduo foi dissolvido em uma mistura 1/1 de acetato de

etila/hexanos (30 mL) e concentrado duas vezes. O sólido foi triturado com hexanos e coletado por filtração fornecendo cloridrato de 1-((3,5-dimetilisoxazol-4-il)metil)-1H-pirazol-4-amina (500 mg, 99%) como um sólido branco. ¹H NMR (DMSO-d₆, 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).

Exemplo 10-41b: tert-butil 1-((3,5-dimetilisoxazol-4-il)metil)-1H-pirazol-4-ilcarbamato



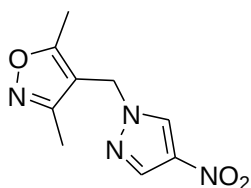
10

3,5-dimetil-4-((4-nitro-1H-pirazol-1-il)metil)isoxazol (Exemplo 10-41c) (12 g, 53.8 mmol) e anidreto BOC (12.8 g, 64 mmol) foram dissolvidos em uma mistura 3/1/1 de MeOH/EtOH/THF (300 mL) em um frasco de reação Parr, seguido pela adição de 10% Pd/C (1.5 g). A mistura foi agitada em um hidrogenador Parr sob 2 atmosferas de hidrogênio durante 3 horas. A mistura foi filtrada através de um tampão de celite de 7,62 cm e concentrada no evaporador rotatório. O óleo rosado foi purificado por cromatografia de sílica gel (25% acetato de etila em hexanos) para fornecer tert-butil 1-((3,5-dimetilisoxazol-4-il)metil)-1H-pirazol-4-ilcarbamato (12.6 g, 80%) como um óleo vermelho/rosado, o qual foi solidificado em descanso para um sólido rosado claro. ¹H NMR (CDCl₃, 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).

20

25

Exemplo 10-41c: 3,5-dimetil-4-((4-nitro-1H-pirazol-1-il)metil)isoxazol

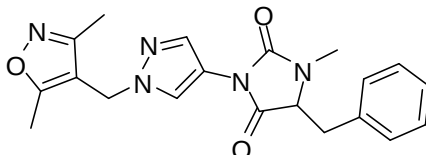


1H-pirazol (10 g, 147 mmol) foi adicionado em porções
pequenas ao H₂SO₄ concentrado (100 mL), resfriado a 0 °C via um
5 banho água/gelo, mantendo a temperatura de reação interna
abaixo de 40 °C. HNO₃ concentrado (10 mL) foi adicionado
cuidadosamente, gota a gota, à mistura de reação mantendo a
temperatura de reação interna abaixo de 55 °C. A reação foi
então aquecida a 55 °C e agitada durante 5 horas. A mistura
10 foi resfriada a 0 °C e cuidadosamente tornou-se básica (pH~8)
com solução aquosa de NaOH (110 g NaOH em 150 mL H₂O) até um
precipitado branco formado, cuidadosamente garantindo a
temperatura interna da solução restante abaixo de 40 °C. O
sólido branco foi coletado por filtração e lavado com acetato
15 de etila/hexanos (1/3) então seco *en vacuo* para fornecer 4-
nitro-1H-pirazol (7g, 42% de Rendimento isolado). ¹³C NMR
(DMSO-d₆, 137.0, 126.4. 4-nitro-1H-pirazol (9 g, 80 mmol) em
DMF (100 mL) □ 100 MHz) δ foi adicionado carbonato de cério
(26 g, 80 mmol) seguido pela adição de 4-(clorometil)-3,5-
20 dimetilisoxazol (12.3 g, 85 mmol). A mistura de reação foi
agitada em DMF (100 mL) a 80 °C durante 30 minutos, então
resfriada, diluída com H₂O (150 mL) e extraída com acetato de
etila (3x, 75 mL). As camadas orgânicas combinadas foram
secas sob sulfato de sódio, filtradas e concentradas. O
25 resíduo foi tomado em acetato de etila (200 mL) e lavado com
H₂O (2x, 100 mL). A camada orgânica foi seca sob sulfato de
sódio, filtrada e concentrada. O produto sólido foi triturado
com acetato de etila/hexanos(1/9) e coletado por filtração. O
produto foi seco sob alto vácuo para fornecer 3,5-dimetil-4-
30 ((4-nitro-1H-pirazol-1-il)metil)isoxazol (12g, 67%) como um

sólido amarelo claro. ^1H NMR (CDCl_3 , 400 MHz): δ 2.23 (s, 3H), 2.46 (s, 3H), 5.08 (s, 2H), 8.02 (s, 1H), 8.08 (s, 1H).

Exemplo 10-42: 5-benzil-3-(1-((3,5-dimetilisoxazol-4-il)metil)-1H-pirazol-4-il)-1-metilimidazolidina-2,4-diona

5

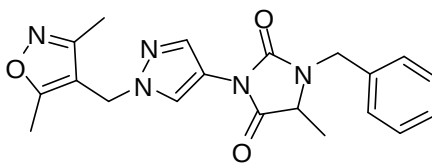


Preparado como no Exemplo 10-5 de 5-benzil-3-(1-((3,5-dimetilisoxazol-4-il)metil)-1H-pirazol-4-il)imidazolidina-2,4-diona (Exemplos 10-2) e iodometano. Rendimento: 95%. ^1H NMR (CDCl_3 , 400 MHz): δ 2.04 (s, 3H), 2.15 (s, 3H), 2.96 (s, 3H), 3.24-3.23 (m, 2 H, $J = 4.0$ Hz), 4.23-4.21 (m, 1H), 5.00 (s, 2H), 7.24-7.23 (m, 5H, $J = 4.0$ Hz), 7.70 (s, 1H), 7.87 (s, 1H).

O composto do título foi mostrado para inibir receptor amargo hT2R08 e ter um IC_{50} de 0.15 μM .

Exemplo 10-43: 1-benzil-3-(1-((3,5-dimetilisoxazol-4-il)metil)-1H-pirazol-4-il)-5-metilimidazolidina-2,4-diona

20

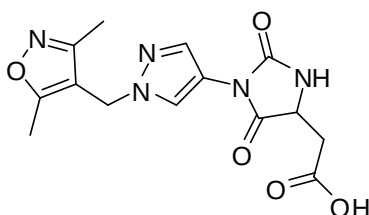


Preparado como no Exemplo 10-5 de 3-(1-((3,5-dimetilisoxazol-4-il)metil)-1H-pirazol-4-il)-5-metilimidazolidina-2,4-diona (Exemplo 10-41) e brometo de benzila. Rendimento: 50%. ^1H NMR (CDCl_3 , 400 MHz): δ 1.44 (s, 3H), 2.19 (s, 3H), 3.88 (s, 3H), 4.18 (d, $J = 8$ Hz, 2H), 4.22 (t, 1H, $J = 4$ Hz), 5.06 (s, 2H), 7.39 - 7.29 (m, 5H), 7.94 (s, 1H), 8.10 (s, 1H). O composto do título foi

mostrado para inibir receptor amargo hT2R08 e ter um IC₅₀ de 0.02 μ M.

Exemplo 10-44: Ácido 2-(1-(1-((3,5-dimetilisoxazol-4-il)metil)-1H-pirazol-4-il)-2,5-dioxoimidazolidin-4-il)acético

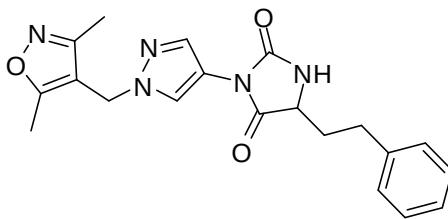
5



Preparado como no Exemplo 10-1 de 1-((3,5-dimetilisoxazol-4-il)metil)-1H-pirazol-4-carbonil azida (Exemplo 10-1a) e H-Asp-OMe. Rendimento: 85%. MS M+H calculado 334.1; encontrado 334.1

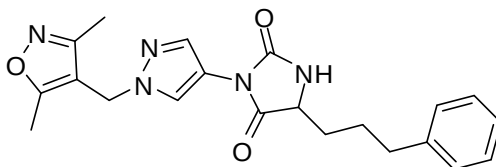
Exemplo 10-45: 3-(1-((3,5-dimetilisoxazol-4-il)metil)-1H-pirazol-4-il)-5-fenetilimidazolidina-2,4-diona

15



Preparado como no Exemplo 10-1 de 1-((3,5-dimetilisoxazol-4-il)metil)-1H-pirazol-4-carbonil azida (Exemplo 10-1a) e metil 2-amino-4-fenilbutanoato. Rendimento: 15%. ¹H NMR (CDCl₃, 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). O composto do título foi mostrado para inibir receptor amargo hT2R08 e ter um IC₅₀ de 0.22 μ M.

Exemplo 10-46: 3-(1-((3,5-dimetilisoxazol-4-il)metil)-1H-pirazol-4-il)-5-(3-fenilpropil)imidazolidina-2,4-diona

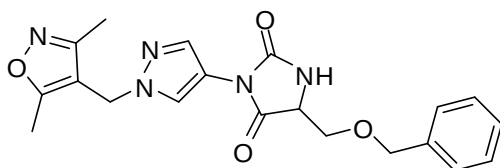


5

Preparado como no Exemplo 10-1 de 1-((3,5-dimetilisoxazol-4-il)metil)-1H-pirazol-4-carbonil azida (Exemplo 10-1a) e metil 2-amino-5-fenilpentanoato. Rendimento: 20%. ^1H NMR (CDCl_3 , 400 MHz): δ 1.72-1.68 (m, 1H), 1.85-1.78 (m, 2H), 1.99-1.91 (m, 1H), 2.19 (s, 3H), 2.41 (s, 3H), 2.69-2.63 (t, $J = 8$ Hz, 2H), 4.13 (bs, 1H), 5.05 (s, 2H), 5.95 (bs, 1H), 7.30-7.19 (m, 5H), 7.95 (s, 1H), 8.03 (s, 1H). O composto do título foi mostrado para inibir receptor amargo hT2R08 e ter um IC_{50} de 0.17 μM .

10

Exemplo 10-47: 5-(benziloximetil)-3-(1-((3,5-dimetilisoxazol-4-il)metil)-1H-pirazol-4-il)imidazolidina-2,4-diona



20

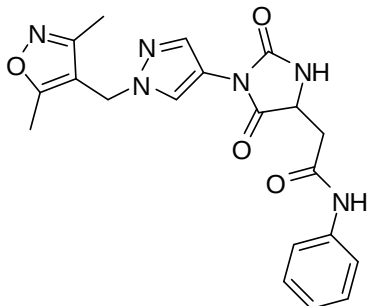
Preparado como no Exemplo 10-1 de 1-((3,5-dimetilisoxazol-4-il)metil)-1H-pirazol-4-carbonil azida (Exemplo 10-1a) e metil 2-amino-3-(benzilóxi)propanoato. Rendimento: 32%. ^1H NMR (CDCl_3 , 400 MHz): δ 2.19 (s, 3H), 2.43 (s, 3H), 3.70-3.67 (m, 1H), 3.89-3.86 (m, 1H), 4.31-4.30 (m, 1H), 4.56-4.32 (d, $J = 1.6$ Hz, 2H), 5.05 (s, 2H), 5.62 (bs, 1H), 7.35-7.29 (m, 5H), 7.88 (s, 1H), 8.04 (s, 1H). O

25

composto do título foi mostrado para inibir receptor amargo hT2R08 e ter um IC₅₀ de 0.76 µM.

Exemplo 10-48: 2-(1-(1-((3,5-dimetilisoxazol-4-il)metil)-1H-pirazol-4-il)-2,5-dioxoimidazolidin-4-il)-N-fenilacetamida

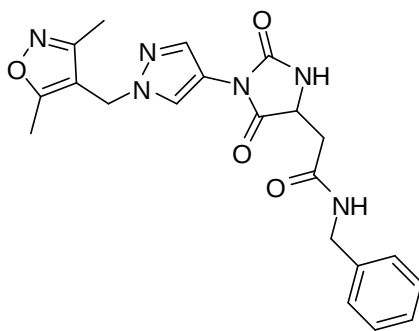
5



Ácido 3-(1-(1-((3,5-dimetilisoxazol-4-il)metil)-1H-pirazol-4-il)-2,5-dioxoimidazolidin-4-il)acético (Exemplo 10-44) (100 mg, 0.3 mmol), anilina (33 mg, 0.36 mmol), Pybop (187 mg, 0.36 mmol) e trietil amina (0.05 mL, 0.36 mmol) foram misturados em DMF (1 mL). A reação agitada a 65°C durante 4 horas. A reação foi deixada resfriar à temperatura ambiente e então diluída com acetato de etila (2 mL). A fase orgânica foi lavada com solução saturada de bicarbonato de sódio (2x, 2 mL) e com solução saturada de NaCl (1 mL). A fase orgânica foi extraída, seca sob Na₂SO₄ anidro e filtrada. O produto bruto foi ressuspendido em MeOH (1 mL) e purificado por HPLC de fase reversa (5-95% acetonitrila em H₂O; gradiente de 16 minutos). As frações puras foram combinadas e solvente foi removido em evaporador rotatório para fornecer 2-(1-(1-((3,5-dimetilisoxazol-4-il)metil)-1H-pirazol-4-il)-2,5-dioxoimidazolidin-4-il)-N-fenilacetamida como um sólido branco (50%). ¹H NMR (CDCl₃, 400 MHz): δ 2.18 (s, 3H), 2.40 (s, 3H), 2.72 (m, 1 H), 3.14-3.13 (d, 1H, J = 4 Hz), 4.54-4.51 (d, J = 8 Hz 1H), 5.04 (s, 2H), 6.53 (bs, 1H), 7.15-7.13 (m, 1H), 7.33-7.22 (m, 2H), 7.47-7.45 (d,

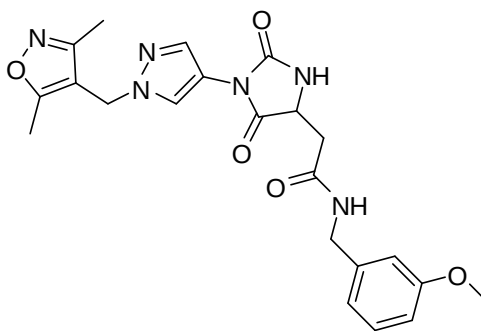
$J = 8 \text{ Hz}$, 2H), 7.78 (bs, 1H), 7.09 (s, 1H), 8.05 (s, 1H). O composto do título foi mostrado para inibir receptor amargo hT2R08 e ter um IC_{50} de $0.75 \text{ } \mu\text{M}$.

Exemplo 10-49: N-benzil-2-(1-(1-((3,5-dimetilisoxazol-4-il)metil)-1H-pirazol-4-il)-2,5-dioxoimidazolidin-4-il)acetamida



Preparado como no Exemplo 10-48 de ácido 3-(1-(1-((3,5-dimetilisoxazol-4-il)metil)-1H-pirazol-4-il)-2,5-dioxoimidazolidin-4-il)acético (Exemplo 10-44) e benzil amina. Rendimento: 30%. ^1H NMR (CDCl_3 , 400 MHz): δ 2.18 (s, 3 H), 2.41 (s, 3 H), 2.56-2.52 (m, 1H, $J = 16 \text{ Hz}$), 2.56 -2.52 (m, 1H), 3.00-2.96 (m, 1H), 4.45-4.44 (d, $J = 5.6 \text{ Hz}$, 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). O composto do título foi mostrado para inibir receptor amargo hT2R08 e ter um IC_{50} de $1.3 \text{ } \mu\text{M}$.

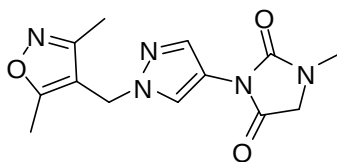
Exemplo 10-50: 2-(1-(1-((3,5-dimetilisoxazol-4-il)metil)-1H-pirazol-4-il)-2,5-dioxoimidazolidin-4-il)-N-(3-metoxibenzil)acetamida



Preparado como no Exemplo 10-48 de ácido 3-(1-(1-((3,5-dimetilisoxazol-4-il)metil)-1H-pirazol-4-il)-2,5-dioxoimidazolidin-4-il)acético (Exemplo 10-44) e (3-metoxifenil)metanamina. Rendimento: 50%. LC/MS; esperado 453; encontrado 453.1 O composto do título foi mostrado para inibir receptor amargo hT2R08 e ter um IC₅₀ de 1.7 µM.

Exemplo 10-51: 3-(1-((3,5-dimetilisoxazol-4-il)metil)-1H-pirazol-4-il)-1-metilimidazolidina-2,4-diona

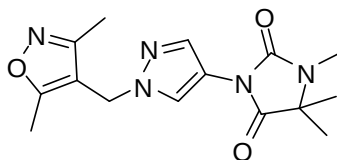
10



3-(1-((3,5-dimetilisoxazol-4-il)metil)-1H-pirazol-4-il)imidazolidina-2,4-diona (Exemplo 10-1) (50 mg, 0.182 mmol) e carbonato de cézio (60 mg, 0.185 mmol) foram misturados em DMF (1 mL) durante 15 minutos sob uma atmosfera de nitrogênio à temperatura ambiente. Depois, iodometano (14 mg, 0.185 mmol) foi adicionado e a reação continuou a agitar durante uma adição de 2 horas. H₂O (2 mL) foi adicionada e o produto foi extraído com acetato de etila (1mL, 2x). A fase orgânica foi coletada e lavada com solução saturada de bicarbonato de sódio (2ml, 2x), seca, e filtrada. Solvente foi removido sob uma corrente de nitrogênio e ainda seco sob alto vácuo para fornecer 3-(1-((3,5-dimetilisoxazol-4-il)metil)-1H-pirazol-4-il)-1-metilimidazolidina-2,4-diona

como um sólido branco (42 mg, 80%). Rendimento: 80%. ^1H NMR (CDCl₃, 400 MHz): δ 2.18 (s, 3H), 2.41 (s, 3H), 3.06 (s, 3H), 3.95 (s, 2H), 5.05 (s, 2H), 7.89 (s, 1H), 8.05 (s, 1H). O composto do título foi mostrado para inibir receptor amargo hT2R08 e ter um IC₅₀ de 0.58 μM .

Exemplo 10-52: 3-(1-((3,5-dimetilisoxazol-4-il)metil)-1H-pirazol-4-il)-1,5,5-trimetilimidazolidina-2,4-diona

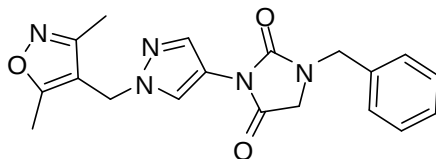


10

3-(1-((3,5-dimetilisoxazol-4-il)metil)-1H-pirazol-4-il)-5-metilimidazolidina-2,4-diona (Exemplo 10-41) (50 mg, 0.173 mmol) e 60% NaH (8 mg, 0.190 mmol) foram misturados em DMF (1 mL) durante 30 minutos. MeI (0.04mL, 0.190 mmol) foi adicionado e a reação foi agitada uma adição de 4 horas. A reação foi acidificada com 1N HCl e diluída com acetato de etila (2 mL). A fase orgânica foi seca, filtrada e solvente foi removido sob uma corrente de nitrogênio. O produto bruto foi ressuspendido em MeOH (1 mL) e purificado por HPLC de fase reversa (5 a 95% acetonitrila em H₂O: gradiente de 16 minutos). As frações puras foram combinadas e solvente removido sob vácuo para fornecer 3-(1-((3,5-dimetilisoxazol-4-il)metil)-1H-pirazol-4-il)-1,5,5-trimetilimidazolidina-2,4-diona como um sólido branco (25 mg, 50%). ^1H NMR (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). O composto do título foi mostrado para inibir receptor amargo hT2R08 e ter um IC₅₀ de 0.80 μM .

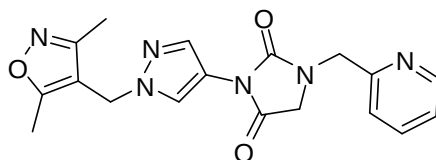
30

Exemplo 10-53: 1-benzil-3-(1-((3,5-dimetilisoxazol-4-il)metil)-1H-pirazol-4-il)imidazolidina-2,4-diona



Preparado como no Exemplo 10-5 de 3-(1-((3,5-
 5 dimetilisoxazol-4-il)metil)-1H-pirazol-4-il)imidazolidina-
 2,4-diona (Exemplo 10-1) e brometo de benzila. Rendimento:
 40%. ^1H NMR (CDCl_3 , 400 MHz): δ 2.18 (s, 3H), 2.42 (s, 3H),
 3.84 (s, 2H), 4.61 (s, 2 H), 5.06 (s, 2H), 7.40 - 7.27 (m,
 5H), 7.92 (s, 1 H), 8.08 (s, 1H). O composto do título foi
 10 mostrado para inibir receptor amargo hT2R08 e ter um IC_{50} de
 0.09 μM .

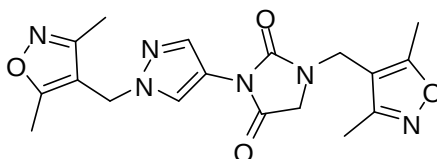
**Exemplo 10-54: 3-(1-((3,5-dimetilisoxazol-4-il)metil)-1H-
 pirazol-4-il)-1-(piridin-2-ilmetil)imidazolidina-2,4-diona**



15

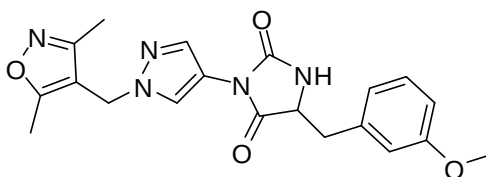
Preparado como no Exemplo 10-5 de 3-(1-((3,5-
 dimetilisoxazol-4-il)metil)-1H-pirazol-4-il)imidazolidina-
 2,4-diona e 2-(bromometil)piridina. Rendimento: 50%. ^1H NMR
 20 (CDCl_3 , 400 MHz): δ 2.19 (s, 3H), 2.41 (s, 3H), 4.12 (s,
 2H), 4.71 (s, 2H), 5.05 (s, 2H), 7.72-7.23 (m, 4H), 7.92 (s,
 1H) 8.08 (s, 1H). O composto do título foi mostrado para
 inibir receptor amargo hT2R08 e ter um IC_{50} de 0.68 μM .

**Exemplo 10-55: 1-((3,5-dimetilisoxazol-4-il)metil)-3-(1-
 25 ((3,5-dimetilisoxazol-4-il)metil)-1H-pirazol-4-
 il)imidazolidina-2,4-diona**



Preparado como no Exemplo 10-5 de 3-(1-((3,5-dimetilisoxazol-4-il)metil)-1H-pirazol-4-il)imidazolidina-2,4-diona e 4-(clorometil)-3,5-dimetilisoxazol. Rendimento: 50%. ^1H NMR (CDCl_3 , 400 MHz): 2.19 (s, 3H), 2.27 (s, 3H), 2.43-2.42 (d, $J = 5.2$ Hz, 6H), 3.82 (s, 2H), 4.40 (s, 2H), 5.05 (s, 2H), 7.92 (s, 1H), 8.05 (s, 1H). O composto do título foi mostrado para inibir receptor amargo hT2R08 e ter um IC_{50} de 0.04 μM .

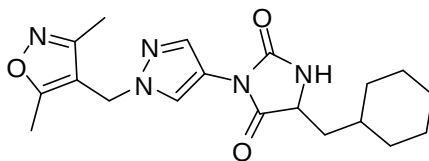
Exemplo 10-56: 3-(1-((3,5-dimetilisoxazol-4-il)metil)-1H-pirazol-4-il)-5-(3-metoxibenzil)imidazolidina-2,4-diona



Cloridrato de 1-((3,5-dimetilisoxazol-4-il)metil)-1H-pirazol-4-amina (400 mg, 2.08 mmol), carbonato de dipiridin-2-ila (450 mg, 2.08 mmol) e trietilamina (0.290 mL, 2.08 mmol) foram agitados em diclorometano (7 mL) durante 12 horas à temperatura ambiente. A reação foi concentrada sob vácuo para fornecer 4-((4-isocianato-1H-pirazol-1-il)metil)-3,5-dimetilisoxazol como um sólido esbranquiçado em rendimento quantitativo. Etanol (1 mL) foi adicionado junto com metil 2-amino-3-(3-metoxifenil)propanoato (68 mg, 0.327 mmol) e trietilamina (0.064 mL, 0.461 mmol). A reação foi agitada a refluxo durante 12 horas, então deixada resfriar à temperatura ambiente. O solvente foi removido sob uma corrente de nitrogênio. O produto bruto foi ressuspensionado em MeOH (1 mL) e purificado por HPLC de fase reversa (5 a 95% acetonitrila em H_2O : gradiente de 16 minutos). As frações

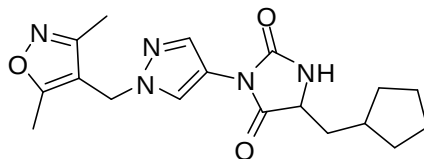
puras foram combinadas e solvente removido sob vácuo para
 fornecer 3-(1-((3,5-dimetilisoxazol-4-il)metil)-1H-pirazol-4-
 il)-5-(3-metoxibenzil)imidazolidina-2,4-diona como um sólido
 branco Rendimento: 50% ^1H NMR (CDCl_3 , 400 MHz): δ 2.19 (s,
 3 H), 2.41 (s, 3H), 3.34-3.33 (d, J = 3.2 Hz, 1H), 3.31-3.29
 (d, J = 8 Hz, 1H), 3.76 (s, 3H), 4.33-4.30 (m, 1H), 5.05 (s,
 2H), 5.95 (bs, 1H), 7.25-7.21 (t, 1H), 6.82-6.78 (m, 3H),
 7.85 (s, 1H), 7.99 (s, 1H). O composto do título foi
 mostrado para inibir receptor amargo hT2R08 e ter um IC_{50} de
 0.13 μM .

Exemplo 10-57: 5-(ciclohexilmetil)-3-(1-((3,5-
dimetilisoxazol-4-il)metil)-1H-pirazol-4-il)imidazolidina-
2,4-diona



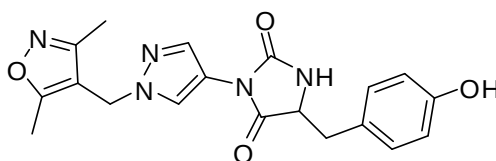
Preparado como no Exemplo 10-56 de cloridrato de 1-
 ((3,5-dimetilisoxazol-4-il)metil)-1H-pirazol-4-amina (Exemplo
 10-41a) e metil 2-amino-3-ciclohexilpropanoato. Rendimento:
 30%. ^1H NMR (CDCl_3 , 400 MHz): δ 1.06-0.95 (m, 2H), 1.29-
 1.15 (m, 3H), 1.60-1.50 (1H), 1.77-1.67 (7 H), 1.91-1.85 (m,
 1H), 2.19 (s, 3H), 2.41 (s, 3H), 4.19-4.15 (m, 1H), 5.05 (s,
 2H), 6.01 (bs, 1H), 7.91 (s, 1H), 8.05 (s, 1H). O composto
 do título foi mostrado para inibir receptor amargo hT2R08 e
 ter um IC_{50} de 0.96 μM .

Exemplo 10-58: 5-(ciclopentilmetil)-3-(1-((3,5-
dimetilisoxazol-4-il)metil)-1H-pirazol-4-il)imidazolidina-
2,4-diona



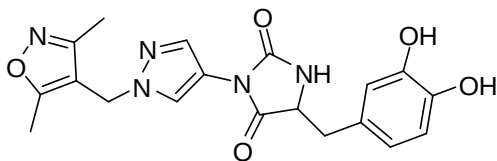
Preparado como no Exemplo 10-56 de cloridrato de 1-((3,5-dimetilisoxazol-4-il)metil)-1H-pirazol-4-amina (Exemplo 10-41a) e metil 2-amino-3-ciclopentilpropanoato. Rendimento: 50%. ^1H NMR (CDCl_3 , 400 MHz): δ 1.20-1.14 (m, 3H), 1.68-1.55 (m, 6H), 2.04-1.92 (m, 2H), 2.19 (s, 3H), 2.42 (s, 3H), 4.14-4.11 (m, 1H), 5.05 (s, 2H), 5.52 (bs, 1H), 7.90 (s, 1H), 8.06 (s, 1H). O composto do título foi mostrado para inibir receptor amargo hT2R08 e ter um IC_{50} de 0.31 μM .

Exemplo 10-59: 3-(1-((3,5-dimetilisoxazol-4-il)metil)-1H-pirazol-4-il)-5-(4-hidroxibenzil)imidazolidina-2,4-diona



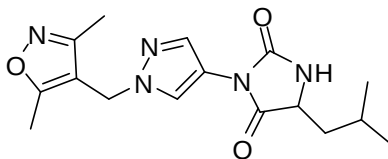
Preparado como no Exemplo 10-56 de cloridrato de 1-((3,5-dimetilisoxazol-4-il)metil)-1H-pirazol-4-amina (Exemplo 10-41a) e metil 2-amino-3-(4-hidroxifenil)propanoato. Rendimento: 50%. ^1H NMR (CDCl_3 , 400 MHz): δ 2.41 (s, 3H), 2.85 (s, 3H), 3.26-3.25 (d, 1H, $J = 4$ Hz), 3.23-3.22 (d, $J = 4$ Hz, 1H), 4.31-4.28 (m, 1H), 5.04 (s, 2H), 5.77-5.74 (bs, 1H), 7.07-7.04 (d, $J = 12$ Hz, 2H), 6.75-6.73 (d, $J = 8$ Hz, 2H), 7.06 (s, 1H), 7.97 (s, 1H), 9.43 (bs, 1H). O composto do título foi mostrado para inibir receptor amargo hT2R08 e ter um IC_{50} de 0.33 μM .

Exemplo 10-60: 5-(3,4-dihidroxibenzil)-3-(1-((3,5-dimetilisoxazol-4-il)metil)-1H-pirazol-4-il)imidazolidina-2,4-diona



Preparado como no Exemplo 10-56 de cloridrato de 1-
 5 ((3,5-dimetilisoxazol-4-il)metil)-1H-pirazol-4-amina (Exemplo 10-41a) e metil 2-amino-3-(3,4-dihidroxifenil)propanoato. Rendimento: 50%. MS M+H calculado 398.1; encontrado 398.1. O composto do título foi mostrado para inibir receptor amargo hT2R08 e ter um IC₅₀ de 0.51 µM.

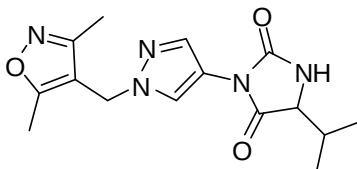
10 **Exemplo 10-61: 3-(1-((3,5-dimetilisoxazol-4-il)metil)-1H-pirazol-4-il)-5-isobutilimidazolidina-2,4-diona**



15 Preparado como no Exemplo 10-41 de cloridrato de 1-((3,5-dimetilisoxazol-4-il)metil)-1H-pirazol-4-amina (Exemplo 10-41a) e etil 2-isocianato-4-metilpentanoato. Rendimento: 50%. ¹H NMR (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),
 20 (5.05 (s, 2H), 5.70 (bs, 1H), 7.90 (s, 1H), 8.05 (s, 1H). O composto do título foi mostrado para inibir receptor amargo hT2R08 e ter um IC₅₀ de 1.0 µM.

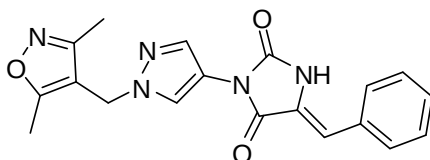
Exemplo 10-62: 3-(1-((3,5-dimetilisoxazol-4-il)metil)-1H-pirazol-4-il)-5-isopropilimidazolidina-2,4-diona

25



Preparado como no Exemplo 10-41 de cloridrato de 1-((3,5-dimetilisoxazol-4-il)metil)-1H-pirazol-4-amina (Exemplo 10-41a) e etil 2-isocianato-3-metilbutanoato. Rendimento: 30%. ¹H NMR (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). O composto do título foi mostrado para inibir receptor amargo hT2R08 e ter um IC₅₀ de 1.1 μM.

Exemplo 10-63: (Z)-5-benzilideno-3-(1-((3,5-dimetilisoxazol-4-il)metil)-1H-pirazol-4-il)imidazolidina-2,4-diona

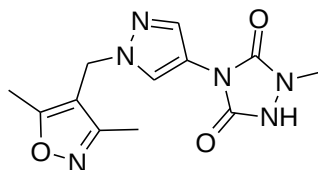


3-(1-((3,5-dimetilisoxazol-4-il)metil)-1H-pirazol-4-il)imidazolidina-2,4-diona (Exemplo 10-1) (275 mg, 1 mmol), benzaldeído (140 mg, 1.3 mmol), e acetato de sódio (205 mg, 2.5 mmol), em ácido acético glacial (3 mL) foram irradiados no reator de micro-ondas durante 7 horas a 185 °C. Sob resfriamento a mistura foi diluída com H₂O (100 mL) e extraída com acetato de etila (3x, 50 mL). Os extratos orgânicos combinados foram lavados com solução saturada de carbonato de sódio aquoso, secos sob sulfato de sódio, filtrados e concentrados. O produto sólido foi triturado com acetato de etila/hexanos (1/1) e seco sob alto vácuo para fornecer (Z)-5-benzilideno-3-(1-((3,5-dimetilisoxazol-4-il)metil)-1H-pirazol-4-il)imidazolidina-2,4-diona (173 mg, 48%) como um sólido amarelo claro. ¹H NMR (DMSO-d₆, 400 MHz): δ 2.14 (s, 3H), 2.40 (s, 3H), 6.59 (s, 1H), 5.20 (s, 2H), 7.33-7.40 (m, 3H), 7.66 (s, 2H), 7.81 (s, 1H), 8.21 (s, 1H),

11.01 (bs, 1H). O composto do título foi mostrado para inibir receptor amargo hT2R08 e ter um IC₅₀ de 0.34 µM.

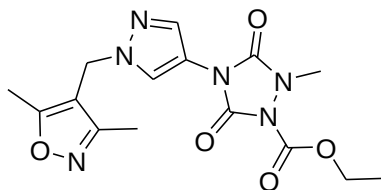
Exemplo 10-64: 4-(1-((3,5-dimetilisoxazol-4-il)metil)-1H-pirazol-4-il)-1-metil-1,2,4-triazolidina-3,5-diona

5



Etil 4-(1-((3,5-dimetilisoxazol-4-il)metil)-1H-pirazol-4-il)-2-metil-3,5-dioxo-1,2,4-triazolidina-1-carboxilato (3.2 g, 8.8 mmol) foi agitado em uma mistura de MeOH/1N (1/1) de NaOH aquoso (100 mL) à temperatura ambiente durante 30 minutos. A mistura foi acidificada com 1N HCl aquoso (150 mL), extraída com acetato de etila (3x, 100 mL), seca sob sulfato de sódio, filtrada e concentrada para fornecer 4-(1-((3,5-dimetilisoxazol-4-il)metil)-1H-pirazol-4-il)-1-metil-1,2,4-triazolidina-3,5-diona (2.3 g, 89%) como um sólido amarelo. ¹H NMR (DMSO-d₆, 400 MHz): δ 2.18 (s, 3H), 2.44 (s, 3H), 3.05 (s, 3H), 5.17 (s, 2H), 7.94 (s, 1H), 8.13 (s, 1H).

Exemplo 10-64a: Etil 4-(1-((3,5-dimetilisoxazol-4-il)metil)-1H-pirazol-4-il)-2-metil-3,5-dioxo-1,2,4-triazolidina-1-carboxilato

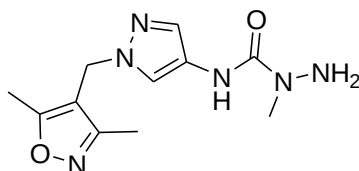


25

Cloroformiato de etila (1.3 g, 12 mmol) foi adicionado a uma mistura N-(1-((3,5-dimetilisoxazol-4-il)metil)-1H-

pirazol-4-il)-1-metilhidrazinacarboxamida (Exemplo 10-64b) (2.5 g, 9 mmol) e trietilamina (1.2 g, 12 mmol) em acetonitrila (100 mL). A mistura foi refluxada durante 1 hora, resfriada então diluída com 1N HCl aquoso (150 mL) e
 5 extraída com acetato de etila (3x, 75 mL). Os extratos orgânicos combinados foram secos sob sulfato de sódio, filtrados e concentrados em evaporador rotatório. O sólido foi triturado com acetato de etila/hexanos (1/3) e seco sob alto vácuo para fornecer etil 4-(1-((3,5-dimetilisoxazol-4-il)metil)-1H-pirazol-4-il)-2-metil-3,5-dioxo-1,2,4-
 10 triazolidina-1-carboxilato (3.2 g, 94%) como um sólido branco. ¹H NMR (DMSO-d₆, 400 MHz): δ 1.28 (t, J=7.2 Hz, 3H), 2.13 (s, 3H), 2.40 (s, 3H), 3.24 (s, 3H), 4.30 (t, J=7.2 Hz, 2H), 5.21 (s, 2H), 7.73 (m, 1H), 8.16 (s, 1H).

15 **Exemplo 10-64b: N-(1-((3,5-dimetilisoxazol-4-il)metil)-1H-pirazol-4-il)-1-metilhidrazinacarboxamida**

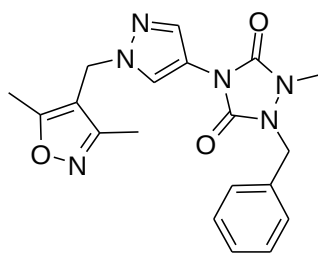


20 1-((3,5-dimetilisoxazol-4-il)metil)-1H-pirazol-4-carbonil azida (Exemplo 10-1a) (1.25 g, 5.3 mmol) foi agitada em tolueno (30 mL) à temperatura de refluxo durante 40 minutos. A mistura foi resfriada à temperatura ambiente e metil hidrazina (0.3 mL, 260 mg, 5.6 mmol) foi adicionada e a
 25 mistura foi refluxada durante 30 minutos. Após resfriar a reação à temperatura ambiente o solvente foi removido em evaporador rotatório e o produto sólido foi triturado com acetato de etila/hexanos (2/5) e seco sob alto vácuo para fornecer N-(1-((3,5-dimetilisoxazol-4-il)metil)-1H-pirazol-4-il)-1-metilhidrazinacarboxamida (1.1 g, 79%) como um sólido
 30

branco. ^1H NMR (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).

Exemplo 10-65: 1-Benzil-4-(1-((3,5-dimetilisoxazol-4-

il)metil)-1H-pirazol-4-il)-2-metil-1,2,4-triazolidina-3,5-
diona



10

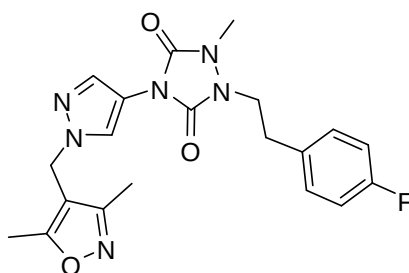
4-(1-((3,5-dimetilisoxazol-4-il)metil)-1H-pirazol-4-il)-1-metil-1,2,4-triazolidina-3,5-diona (Exemplo 10-64) (785 mg, 2.7 mmol) foi dissolvida em acetonitrila (50 mL). Trietilamina (1 g, 10 mmol) e brometo de benzila (510 mg, 3 mmol) foram adicionados e a reação foi agitada à temperatura ambiente durante 12 horas. A mistura foi então concentrada em evaporador rotatório, dissolvida em metanol (5 mL) e purificada por HPLC de fase reversa (5-95% acetonitrila em H₂O: gradiente de 25 minutos). As frações puras foram

15

20 vertidas e concentradas e o produto foi recristalizado de etanol para fornecer 1-benzil-4-(1-((3,5-dimetilisoxazol-4-il)metil)-1H-pirazol-4-il)-2-metil-1,2,4-triazolidina-3,5-diona (210 mg, 20%) como um sólido branco. ^1H NMR (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 calculado 381.1; encontrado 381.1. Ponto de fusão: 124-126 °C. O composto do título foi mostrado para inibir receptor amargo hT2R08 e ter um IC₅₀ de 0.02 μM .

25

Exemplo 10-66: 1-Benzi-4-(1-((3,5-dimetilisoxazol-4-il)metil)-1H-pirazol-4-il)-2-metil-1,2,4-triazolidina-3,5-diona



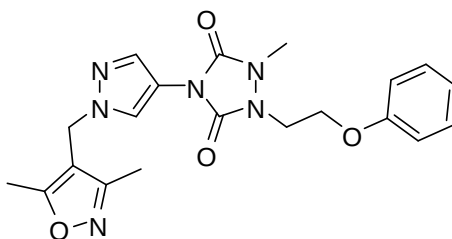
5

Preparado como no Exemplo 10-65 de 4-(1-((3,5-dimetilisoxazol-4-il)metil)-1H-pirazol-4-il)-1-metil-1,2,4-triazolidina-3,5-diona (Exemplo 10-64) e 1-(2-bromoetil)-4-fluorobenzeno. Rendimento: 14%. ^1H NMR (CDCl_3 , 400 MHz): δ 2.18 (s, 3H), 2.40 (s, 3H), 2.87 (t, $J=6.8$ Hz, 2H), 3.14 (s, 3H), 3.83 (t, $J=7.2$ Hz, 2H), 5.03 (s, 2H), 6.95 (t, $J=8.4$ Hz, 2H), 7.14 (t, $J=8$ Hz, 2H), 7.77 (s, 1H), 7.95 (s, 1H). O composto do título foi mostrado para inibir receptor amargo hT2R08 e ter um IC_{50} de 0.01 μM .

15

Exemplo 10-67: 4-(1-((3,5-dimetilisoxazol-4-il)metil)-1H-pirazol-4-il)-1-metil-2-(2-fenoxietil)-1,2,4-triazolidina-3,5-diona

20



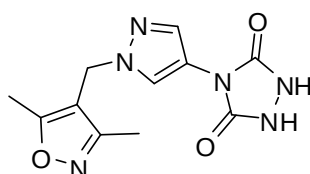
25

Preparado como no Exemplo 10-65 de 4-(1-((3,5-dimetilisoxazol-4-il)metil)-1H-pirazol-4-il)-1-metil-1,2,4-triazolidina-3,5-diona (Exemplo 10-64) e (2-

bromoetóxi)benzeno. Rendimento: 20%. ^1H NMR (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). O composto do título foi mostrado para inibir receptor amargo hT2R08 e ter um IC_{50} de 0.031 μM .

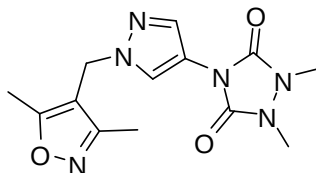
Exemplo 10-68: 4-(1-((3,5-dimetilisoxazol-4-il)metil)-1H-pirazol-4-il)-1,2,4-triazolidina-3,5-diona

10



1-((3,5-dimetilisoxazol-4-il)metil)-1H-pirazol-4-carbonil azida (Exemplo 10-1a) (1g, 4.1 mmol) foi refluxado em tolueno (100 mL) durante uma hora. A reação foi resfriada à temperatura ambiente e hidrazinacarboxilato de etila (0.45g, 43 mmol) foi adicionado. A reação foi aquecida a refluxo e agitada durante 1 hora, então resfriada e concentrada em evaporador rotatório. O resíduo foi tomado em etanol (100 mL) e carbonato de potássio (100 mg) foi adicionado. A mistura foi refluxada durante 12 horas, então filtrada, resfriada à temperatura ambiente, e neutralizada com ácido acético (cerca de 7 gotas). O solvente foi removido em evaporador rotatório e o sólido resultante foi triturado com acetato de etila/hexanos (1/9) para fornecer 4-(1-((3,5-dimetilisoxazol-4-il)metil)-1H-pirazol-4-il)-1,2,4-triazolidina-3,5-diona (0.98 g, 85%) como um sólido esbranquiçado. ^1H NMR (CDCl_3 , 400 MHz): δ 2.18 (s, 3H), 2.41 (s, 3H), 4.98 (s, 2H) 7.16 (s, 1H), 7.38 (s, 1H).

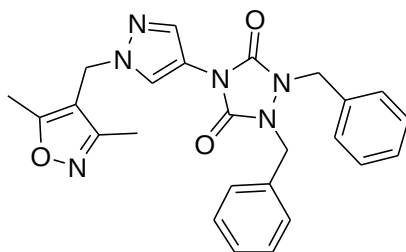
Exemplo 10-69: 4-(1-((3,5-dimetilisoxazol-4-il)metil)-1H-pirazol-4-il)-1,2,4-triazolidina-3,5-diona



5 4-(1-((3,5-dimetilisoxazol-4-il)metil)-1H-pirazol-4-il)-1,2,4-triazolidina-3,5-diona (Exemplo 10-68) (100 mg, 0.36 mmol), iodeto de metila (141 mg, 1 mmol), e carbonato de césio (325 mg, 1 mmol) foram agitados em uma mistura 2/1 de
 10 acetonitrila/DMF (5 mL) à temperatura ambiente durante 2 horas. A mistura foi diluída com 1N HCl aquoso (100 mL) e extraída com acetato de etila (3x, 50 mL). Os extratos orgânicos combinados foram secos sob sulfato de sódio, concentrados e o resíduo bruto tomado em MeOH e purificado
 15 por HPLC de fase reversa (5 a 95% acetonitrila em H₂O: gradiente de 25 minutos). As frações puras foram vertidas e concentradas para fornecer 4-(1-((3,5-dimetilisoxazol-4-il)metil)-1H-pirazol-4-il)-1,2,4-triazolidina-3,5-diona (89 mg, 80%) como um sólido semi-claro. ¹H NMR
 20 (CDCl₃, 400 MHz): δ 2.18 (s, 3H), 2.41 (s, 3H), 3.22 (s, 6H), 5.04 (s, 2H), 7.88 (s, 1H), 8.03 (s, 1H). O composto do título foi mostrado para inibir receptor amargo hT2R08 e ter um IC₅₀ de 0.6 μ M.

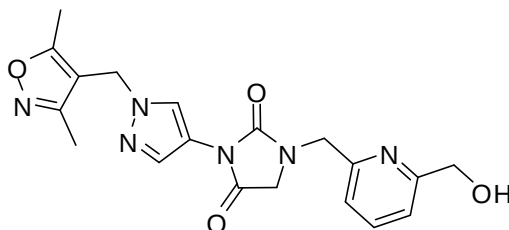
Exemplo 10-70: 1,2-dibenzil-4-(1-((3,5-dimetilisoxazol-4-il)metil)-1H-pirazol-4-il)-1,2,4-triazolidina-3,5-diona

25



Preparado como no Exemplo 10-65 de 4-(1-((3,5-dimetilisoxazol-4-il)metil)-1H-pirazol-4-il)-1,2-dimetil-
 5 1,2,4-triazolidina-3,5-diona (Exemplo 10-69) e brometo de benzila. Rendimento: 69%. ^1H NMR (CDCl_3 , 400 MHz): δ 2.14 (s, 3H), 2.36 (s, 3H), 4.65 (s, 4H), 4.99 (s, 2H), 7.06-7.08 (m, 4H), 7.19-7.25 (m, 6H), 7.86 (s, 1H), 8.02 (s, 1H). O composto do título foi mostrado para inibir receptor amargo
 10 hT2R08 e ter um IC_{50} de 0.8 μM .

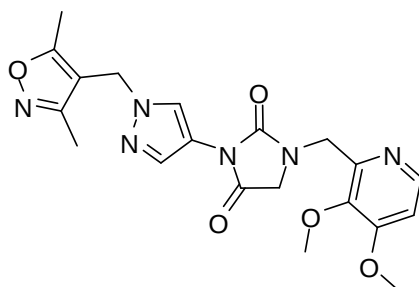
Exemplo 10--71: 3-(1-((3,5-dimetilisoxazol-4-il)metil)-1H-pirazol-4-il)-1-((6-(hidroximetil)piridin-2-il)metil)imidazolidina-2,4-diona



15

Preparado como no Exemplo 10-5 de 3-(1-((3,5-dimetilisoxazol-4-il)metil)-1H-pirazol-4-il)imidazolidina-
 2,4-diona e 6-bromometil-2-piridinametanol. Rendimento: 35%.
 20 MS $\text{M}+\text{H}$ calculado 397.2; encontrado 397.2. O composto do título foi mostrado para inibir receptor amargo hT2R08 e ter um IC_{50} de 0.72 μM .

Exemplo 10-72: 1-((3,4-dimetoxipiridin-2-il)metil)-3-(1-((3,5-dimetilisoaxazol-4-il)metil)-1H-pirazol-4-il)imidazolidina-2,4-diona



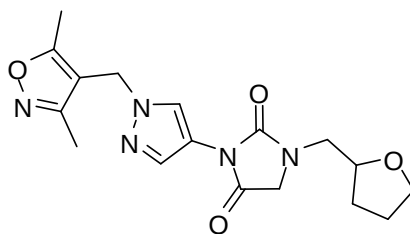
5

Preparado como no Exemplo 10-5 de 3-(1-((3,5-dimetilisoaxazol-4-il)metil)-1H-pirazol-4-il)imidazolidina-2,4-diona e cloridrato de 3,4-dimetóxi-2-clorometil piridina. Rendimento: 26%. MS M+H calculado 360.2; encontrado 360.2. O composto do título foi mostrado para inibir receptor amargo hT2R08 e ter um IC₅₀ de 1.0 µM.

10

Exemplo 10-73: 3-(1-((3,5-dimetilisoaxazol-4-il)metil)-1H-pirazol-4-il)-1-((6-(tetrahydrofuran-2-il)metil)imidazolidina-2,4-diona

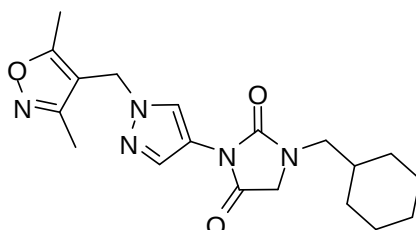
15



20

Preparado como no Exemplo 10-52 de 3-(1-((3,5-dimetilisoaxazol-4-il)metil)-1H-pirazol-4-il)imidazolidina-2,4-diona e brometo de tetrahydrofurfurila. Rendimento: 28%. MS M+H calculado 427.2; encontrado 427.2. O composto do título foi mostrado para inibir receptor amargo hT2R08 e ter um IC₅₀ de 1.4 µM.

Exemplo 10-74: 1-(ciclohexilmetil)-3-(1-((3,5-dimetilisoxazol-4-il)metil)-1H-pirazol-4-il)imidazolidina-2,4-diona



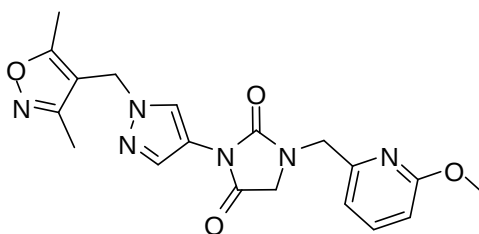
5

Preparado como no Exemplo 10-52 de 3-(1-((3,5-dimetilisoxazol-4-il)metil)-1H-pirazol-4-il)imidazolidina-2,4-diona (Exemplo 10-1) e bromometilciclohexano.

10 Rendimento: 20%. ^1H NMR (DMSO- d_6 , 400 MHz): δ 0.88 (q, J = 10.4 Hz, 2H), 1.09-1.19 (m, 3H), 1.58-1.65 (m, 6H), 2.12 (s, 3H), 2.38 (s, 3H), 3.13 (d, J = 7.2 Hz, 2H), 4.06 (s, 2H), 5.17 (s, 2H), 7.75 (s, 1H), 8.14 (s, 1H). MS M+H calculado 372.2; encontrado 372.1. O composto do título foi mostrado

15 para inibir receptor amargo hT2R08 e ter um IC_{50} de 0.28 μM .

Exemplo 10-75: 3-(1-((3,5-dimetilisoxazol-4-il)metil)-1H-pirazol-4-il)-1-((6-metoxipiridin-2-il)metil)imidazolidina-2,4-diona



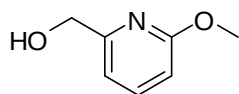
20

3-(1-((3,5-dimetilisoxazol-4-il)metil)-1H-pirazol-4-il)imidazolidina-2,4-diona (100 mg, 0.4 mmol), (6-metóxi-piridin-2-il)-metanol (Exemplo 10-75a) (101 mg, 0.7 mmol),

25 tributilfosfina (147 mg, 0.7 mmol), e 1,1''''-azobis(N,N-dimetilformamida) (125 mg, 0.7 mmol) foram dissolvidos em THF

(5 mL) e agitados à temperatura ambiente durante 15 horas. A reação foi diluída com salmoura (100 mL) e extraída com acetato de etila (2x, 100 mL). Os extratos orgânicos combinados foram secos sob sulfato de magnésio, filtrados e concentrados em evaporador rotatório. O resíduo foi absorvido em metanol (5 mL) e purificado por HPLC de fase reversa (5 a 95% acetonitrila em H₂O: gradiente de 25 minutos). The frações puras foram combinadas, concentradas então redissolvidas em acetato de etila/hexano (1:9). A solução foi resfriada a 5°C durante 15 horas, onde formou-se um sólido branco. O precipitado foi coletado para fornecer 3-(1-((3,5-dimetilisoxazol-4-il)metil)-1H-pirazol-4-il)-1-((6-metoxipiridin-2-il)metil)imidazolidina-2,4-diona (5 mg, 4%) como um sólido branco. ¹H NMR (DMSO-*d*₆, 400 MHz): δ 2.11 (s, 3H), 2.37 (s, 3H), 3.74 (s, 3H), 4.17 (s, 2H), 4.54 (s, 2H), 5.17 (s, 2H), 6.69 (d, *J* = 7.6 Hz, 1H), 6.96 (d, *J* = 6.8 Hz, 1H), 7.67 (d, *J* = 6.8 Hz, 1H), 7.76 (s, 1H), 8.17 (s, 1H). MS M+H calculado 397.2; encontrado 397.2. O composto do título foi mostrado para inibir receptor amargo hT2R08 e ter um IC₅₀ de 0.23 μ M.

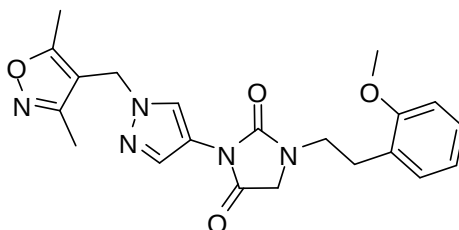
Exemplo 10-75a: (6-metoxipiridin-2-il)metanol



Metil-6-metoxipiridina-2-carboxilato (2g, 11.96 mmol) em metanol anidro (20 mL) foi resfriado a 0°C sob nitrogênio e borohidreto de sódio (1.36g, 35.89 mmol) foi adicionado lentamente à solução. A reação foi deixada agitar a 0 °C durante 30 minutos, então deixada aquecer à temperatura ambiente durante 1 hora. A reação foi resfriada bruscamente com água e concentrada em evaporador rotatório. A reação foi

diluída com salmoura (100 mL) e extraída com solução de diclorometano/2-propanol (2:1) (3x, 150 mL). Os extratos orgânicos combinados foram secos sob sulfato de magnésio, filtrados e concentrados em evaporador rotatório para
 5 fornecer (6-metoxipiridin-2-il)metanol (500 mg, 30%) como um óleo. MS M+H calculado 140.1; encontrado 140.1.

Exemplo 10-76: 3-(1-((3,5-dimetilisoxazol-4-il)metil)-1H-pirazol-4-il)-1-(2-metoxifenetil)imidazolidina-2,4-diona

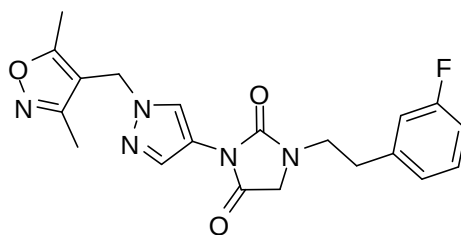


10

Preparado como no Exemplo 10-52 de 3-(1-((3,5-dimetilisoxazol-4-il)metil)-1H-pirazol-4-il)imidazolidina-2,4-diona (Exemplo 6) e brometo de 2-metoxifenetila.
 15 Rendimento: 52%. ¹H NMR (DMSO-*d*₆, 400 MHz): δ 2.11 (s, 3H), 2.38 (s, 3H), 2.80 (t, *J* = 7.2 Hz, 2H), 3.51 (t, *J* = 7.2 Hz, 2H), 3.75 (s, 3H), 4.03 (s, 2H), 5.17 (s, 2H), 6.85 (t, *J* = 7.2 Hz, 1H), 6.95 (d, *J* = 8.4 Hz, 1H), 7.16-7.21 (m, 2H), 7.73 (s, 1H), 8.13 (s, 1H). MS M+H calculado 410.2;
 20 encontrado 410.1. Ponto de fusão: 97-98 °C. O composto do título foi mostrado para inibir receptor amargo hT2R08 e ter um IC₅₀ de 0.14 μ M.

Exemplo 10-77: 3-(1-((3,5-dimetilisoxazol-4-il)metil)-1H-pirazol-4-il)-1-(3-fluorofenetil)imidazolidina-2,4-diona

25

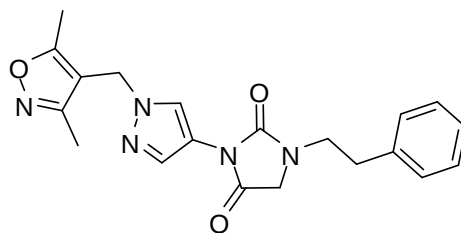


Preparado como no Exemplo 10-52 de 3-(1-((3,5-dimetilisoxazol-4-il)metil)-1*H*-pirazol-4-il)imidazolidina-

5 2,4-diona (Exemplo 10-1) e brometo de 3-fluorofenetila. Rendimento: 22%. ¹H NMR (DMSO-*d*₆, 400 MHz): δ 2.11 (s, 3H), 2.38 (s, 3H), 2.80 (t, *J* = 7.2 Hz, 2H), 3.57 (t, *J* = 7.2 Hz, 2H), 4.06 (s, 2H), 5.17 (s, 2H), 6.85 (dt, *J* = 8.4, 2.0 Hz, 1H), 7.11 (t, *J* = 8.4 Hz, 2H), 7.32 (q, *J* = 7.8 Hz, 1H), 7.73
10 (s, 1H), 8.12 (s, 1H). MS *M*+*H* calculado 398.2; encontrado 398.1. Ponto de fusão: 110-111 °C. O composto do título foi mostrado para inibir receptor amargo hT2R08 e ter um IC₅₀ de 0.06 μM.

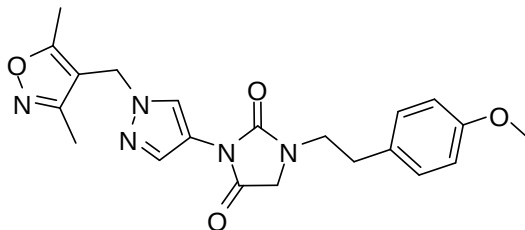
Exemplo 10-78: 3-(1-((3,5-dimetilisoxazol-4-il)metil)-1*H*-

15 **pirazol-4-il)-1-fenetilimidazolidina-2,4-diona**



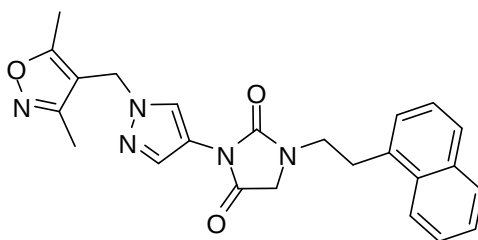
Preparado como no Exemplo 10-52 de 3-(1-((3,5-dimetilisoxazol-4-il)metil)-1*H*-pirazol-4-il)imidazolidina-
20 2,4-diona (Exemplo 10-1) e fenetilbrometo. Rendimento: 37%. ¹H NMR (DMSO-*d*₆, 400 MHz): δ 2.11 (s, 3H), 2.38 (s, 3H), 2.83 (t, *J* = 6.4 Hz, 2H), 3.55 (t, *J* = 7.4 Hz, 2H), 4.03 (s, 2H), 5.17 (s, 2H), 7.18-7.30 (m, 5H), 7.73 (s, 1H), 8.13 (s, 1H).
25 MS *M*+*H* calculado 380.2; encontrado 380.1. Ponto de fusão: 95-96 °C. O composto do título foi mostrado para inibir receptor amargo hT2R08 e ter um IC₅₀ de 0.14 μM.

Exemplo 10-79: 3-(1-((3,5-dimetilisoxazol-4-il)metil)-1H-pirazol-4-il)-1-(4-metoxifenetil)imidazolidina-2,4-diona



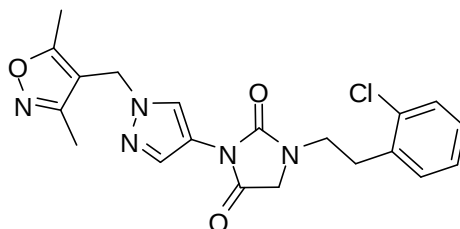
5 Preparado como no Exemplo 10-52 de 3-(1-((3,5-dimetilisoxazol-4-il)metil)-1H-pirazol-4-il)imidazolidina-2,4-diona (Exemplo 10-1) e brometo de 4-metoxifenetila. Rendimento: 32%. ¹H NMR (DMSO-*d*₆, 400 MHz): δ 2.11 (s, 3H), 2.38 (s, 3H), 2.78 (t, *J* = 7.4 Hz, 2H), 3.50 (t, *J* = 7.4 Hz, 2H), 3.69 (s, 3H), 4.02 (s, 2H), 5.16 (s, 2H), 6.84 (d, *J* = 8.4 Hz, 2H), 7.15 (d, *J* = 8.4 Hz, 2H), 7.73 (s, 1H), 8.12 (s, 1H). MS M+H calculado 410.18; encontrado 410.2. O composto do título foi mostrado para inibir receptor amargo hT2R08 e ter um IC₅₀ de 0.04 μ M.

15 **Exemplo 10-80: 3-(1-((3,5-dimetilisoxazol-4-il)metil)-1H-pirazol-4-il)-1-(2-naftalen-1-il)etil)imidazolidina-2,4-diona**



20 Preparado como no Exemplo 10-52 de 3-(1-((3,5-dimetilisoxazol-4-il)metil)-1H-pirazol-4-il)imidazolidina-2,4-diona (Exemplo 10-1) e 1-(2-bromoetil)naftaleno. Rendimento: 20%. MS M+H calculado 430.18; encontrado 430.2. O composto do título foi mostrado para inibir
25 receptor amargo hT2R08 e ter um IC₅₀ de 1.27 μ M.

Exemplo 10-81: 1-(2-clorofenetil)-3-(1-((3,5-dimetilisoxazol-4-il)metil)-1H-pirazol-4-il)imidazolidina-2,4-diona

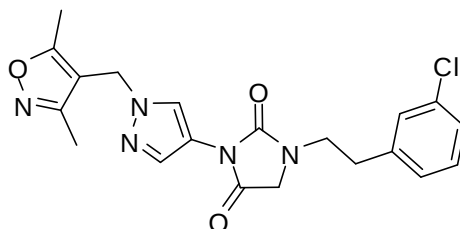


5

Preparado como no Exemplo 10-52 de 3-(1-((3,5-dimetilisoxazol-4-il)metil)-1H-pirazol-4-il)imidazolidina-2,4-diona (Exemplo 10-1) e brometo de 2-clorofenetila. Rendimento: 25%. MS M+H calculado 414.13; encontrado 414.2. O composto do título foi mostrado para inibir receptor amargo hT2R08 e ter um IC₅₀ de 0.25 µM.

10

Exemplo 10-82: 1-(3-clorofenetil)-3-(1-((3,5-dimetilisoxazol-4-il)metil)-1H-pirazol-4-il)imidazolidina-2,4-diona



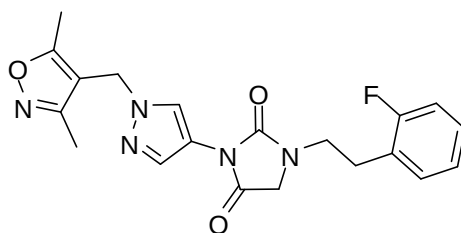
15

Preparado como no Exemplo 10-52 de 3-(1-((3,5-dimetilisoxazol-4-il)metil)-1H-pirazol-4-il)imidazolidina-2,4-diona (Exemplo 10-1) e brometo de 3-clorofenetil. Rendimento: 27%. MS M+H calculado 414.13; encontrado 414.2. O composto do título foi mostrado para inibir receptor amargo hT2R08 e ter um IC₅₀ de 0.20 µM.

20

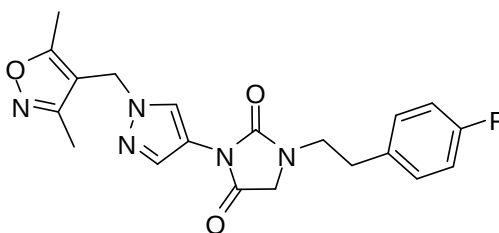
Exemplo 10-83: 3-(1-((3,5-dimetilisoxazol-4-il)metil)-1H-pirazol-4-il)-1-(2-fluorofenetil)imidazolidina-2,4-diona

25



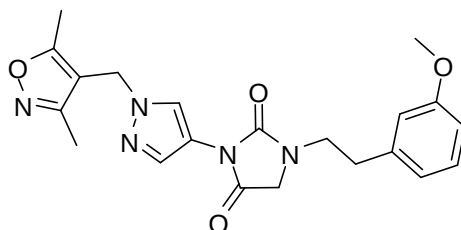
Preparado como no Exemplo 10-52 de 3-(1-((3,5-dimetilisoxazol-4-il)metil)-1*H*-pirazol-4-il)imidazolidina-
 5 2,4-diona (Exemplo 10-1) e brometo de 2-fluorofenetil.
 Rendimento: 24%. MS M+H calculado 398.16; encontrado 398.1.
 O composto do título foi mostrado para inibir receptor amargo hT2R08 e ter um IC₅₀ de 0.13 µM.

**Exemplo 10-84: 3-(1-((3,5-dimetilisoxazol-4-il)metil)-1*H*-
 10 pirazol-4-il)-1-(4-fluorofenetil)imidazolidina-2,4-diona**



Preparado como no Exemplo 10-52 de 3-(1-((3,5-dimetilisoxazol-4-il)metil)-1*H*-pirazol-4-il)imidazolidina-
 2,4-diona (Exemplo 10-1) e brometo de 4-fluorofenetil.
 15 Rendimento: 34%. MS M+H calculado 398.16; encontrado 398.1.
 O composto do título foi mostrado para inibir receptor amargo hT2R08 e ter um IC₅₀ de 0.01 µM.

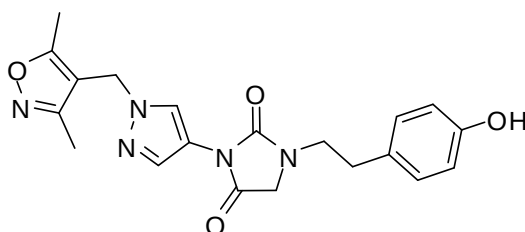
**Exemplo 10-85: 3-(1-((3,5-dimetilisoxazol-4-il)metil)-1*H*-
 20 pirazol-4-il)-1-(3-metoxifenetil)imidazolidina-2,4-diona**



Preparado como no Exemplo 10-52 de 3-(1-((3,5-dimetilisoxazol-4-il)metil)-1*H*-pirazol-4-il)imidazolidina-2,4-diona (Exemplo 10-1) e brometo de 3-metoxifenetil. Rendimento: 34%. MS M+H calculado 410.18; encontrado 410.1.

5 O composto do título foi mostrado para inibir receptor amargo hT2R08 e ter um IC₅₀ de 0.16 µM.

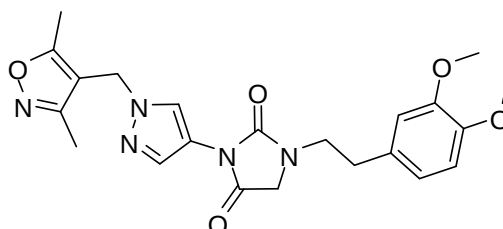
Exemplo 10-86: 3-(1-((3,5-dimetilisoxazol-4-il)metil)-1*H*-pirazol-4-il)-1-(4-hidroxifenetil)imidazolidina-2,4-diona



Preparado como no Exemplo 10-52 de 3-(1-((3,5-dimetilisoxazol-4-il)metil)-1*H*-pirazol-4-il)imidazolidina-2,4-diona (Exemplo 10-1) e brometo de 4-hidroxifenetil. Rendimento: 31%. MS M+H calculado 396.16; encontrado 396.1.

15 O composto do título foi mostrado para inibir receptor amargo hT2R08 e ter um IC₅₀ de 0.41 µM.

Exemplo 10-87: 1-(3,4-dimetoxifenetil)-3-(1-((3,5-dimetilisoxazol-4-il)metil)-1*H*-pirazol-4-il)imidazolidina-2,4-diona

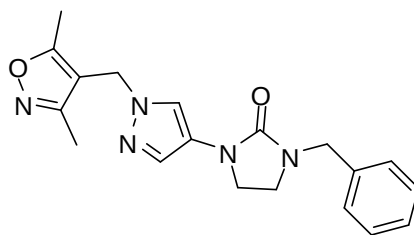


Preparado como no Exemplo 10-52 de 3-(1-((3,5-dimetilisoxazol-4-il)metil)-1*H*-pirazol-4-il)imidazolidina-2,4-diona (Exemplo 10-1) e brometo de 3,4-dimetoxifenetil. Rendimento: 36%. MS M+H calculado 440.19; encontrado 440.2.

25

O composto do título foi mostrado para inibir receptor amargo hT2R08 e ter um IC₅₀ de 0.26 µM.

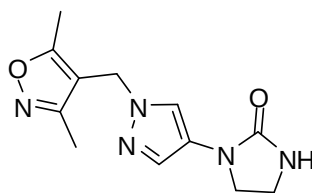
Exemplo 10-88: 1-benzil-3-(1-((3,5-dimetilisoxazol-4-il)metil)-1H-pirazol-4-il)imidazolidin-2-ona



5

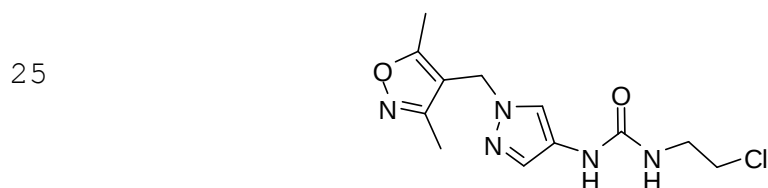
1-(1-((3,5-dimetilisoxazol-4-il)metil)-1H-pirazol-4-il)imidazolidin-2-ona (Exemplo 10-88a) (50 mg, 0.19 mmol) e 60% de hidreto de sódio (8 mg, 0.21 mmol) em DMF (3 mL) foram agitados à temperatura ambiente durante 15 minutos então resfriados a 0 °C. Brometo de benzila (33 mg, 0.19 mmol) foi adicionado à mistura e deixado aquecer à temperatura ambiente durante 2 horas. A reação foi resfriada bruscamente com metanol e concentrada em evaporador rotatório. A reação foi diluída com salmoura (50 mL) e extraída com diclorometano (2x, 50 mL). Os extratos orgânicos combinados foram secos sob sulfato de magnésio, filtrados e concentrados em evaporador rotatório. O resíduo foi purificado por cromatografia de coluna de sílica (100% a 90% diclorometano em metanol: gradiente de 30 minutos) para fornecer 1-benzil-3-(1-((3,5-dimetilisoxazol-4-il)metil)-1H-pirazol-4-il)imidazolidin-2-ona (21 mg, 31%) como um sólido branco. MS M+H calculado 352.17; encontrado 352.2. O composto do título foi mostrado para inibir receptor amargo hT2R08 e ter um IC₅₀ de 0.71 µM.

Exemplo 10-88a: 1-(1-((3,5-dimetilisoxazol-4-il)metil)-1H-pirazol-4-il)imidazolidin-2-ona



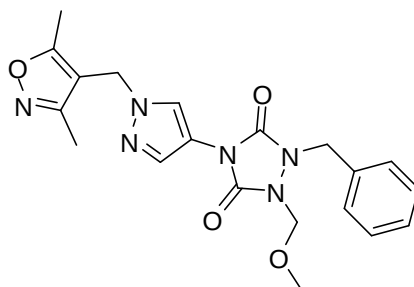
1-(2-cloroetil)-3-(1-((3,5-dimetilisoxazol-4-
il)metil)-1H-pirazol-4-il)ureia (Exemplo 10-88b) (115 mg, 0.39
5 mmol) e 60% de hidreto de sódio (17mg, 0.42 mmol) em DMF (2
mL) foram agitados a 0 °C durante 15 minutos então deixados
aquecer à temperatura ambiente com agitação durante 2 horas.
A reação foi resfriada bruscamente com metanol e concentrada
em evaporador rotatório. A reação foi diluída com salmoura
10 (50 mL) e extraída com diclorometano (2x, 50 mL). Os
extratos orgânicos combinados foram secos sob sulfato de
magnésio, filtrados e concentrados em evaporador rotatório.
O resíduo foi purificado por cromatografia de coluna de
sílica (100% a 90% diclorometano em metanol: gradiente de 30
15 minutos) para fornecer 1-(1-((3,5-dimetilisoxazol-4-
il)metil)-1H-pirazol-4-il)imidazolidin-2-ona (98 mg, 97%)
como um sólido branco. ¹H NMR (DMSO-*d*₆, 400 MHz): δ 2.10 (s,
3H), 2.37 (s, 3H), 3.35-3.39 (m, 2H), 3.61 (d, *J* = 8.8 Hz,
1H), 3.63 (d, *J* = 10.4 Hz, 1H), 5.07 (s, 2H), 6.71 (s, 1H),
20 7.42 (s, 1H), 7.74 (s, 1H). MS M+H calculado 262.12;
encontrado 262.1.

**Exemplo 10-88b: 1-(2-cloroetil)-3-(1-((3,5-dimetilisoxazol-4-
il)metil)-1H-pirazol-4-il)ureia**



1-((3,5-dimetilisoxazol-4-il)metil)-1*H*-pirazol-4-amina (419mg, 2.18 mmol) e isocianato de 2-cloroetila (230mg, 2.18 mmol) em acetonitrila (5 mL) foram aquecidos a 65 °C durante 16 horas. A reação foi resfriada à temperatura ambiente e concentrada em evaporador rotatório. O resíduo foi purificado por cromatografia de coluna de sílica (100% a 90% diclorometano em metanol: gradiente de 30 minutos), seco e triturado com acetato de etila/hexanos (1/9) para fornecer (1-(2-cloroetil)-3-(1-((3,5-dimetilisoxazol-4-il)metil)1*H*-pirazol-4-il)ureia (258 mg, 40%) como um sólido amarelo. MS M+H calculado 298.10; encontrado 298.1

Exemplo 10-89: 1-benzil-4-(1-((3,5-dimetilisoxazol-4-il)metil)-1*H*-pirazol-4-il)-2-(metoximetil)-1,2,4-triazolidina-3,5-diona

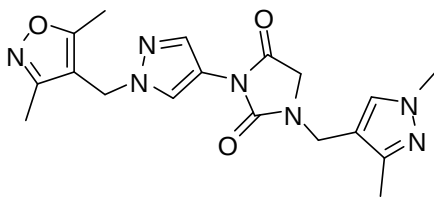


15

Preparado como no Exemplo 10-91 de 1-benzil-4-(1-((3,5-dimetilisoxazol-4-il)metil)-1*H*-pirazol-4-il)-1,2,4-triazolidina-3,5-diona (Exemplo 10-91a) e bromometil metil éter. Rendimento: 18%. MS M+H calculado 411.17; encontrado 411.2. O composto do título foi mostrado para inibir receptor amargo hT2R08 e ter um IC₅₀ de 0.02 µM.

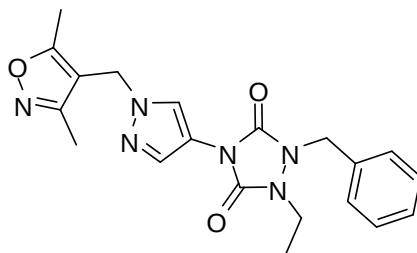
Exemplo 10-90: 1-((1,3-dimetil-1*H*-pirazol-4-il)metil)-3-(1-((3,5-dimetilisoxazol-4-il)metil)-1*H*-pirazol-4-il)imidazolidina-2,4-diona

25



3-((1-((3,5-dimetilisoxazol-4-il)metil)-1H-pirazol-4-il)imidazolidina-2,4-diona (10a) (200 mg, 0.7 mmol), 4-
 5 (clorometil)-1,3-dimetil-1H-pirazol (144 mg, 1 mmol), e carbonato de césio (325 mg, 1 mmol) foram dissolvidos em 2 mL de DMF e irradiados em reator de micro-ondas a 165 °C durante 5 minutos. A reação foi resfriada à temperatura ambiente, e precipitado de sal foi removido por filtração. A solução
 10 clara contendo produto bruto foi obtida e purificada por HPLC (10 a 95% Acetonitrila/água; 25 minutos) para fornecer 1-((1,3-dimetil-1H-pirazol-5-il)metil)-3-((1-((3,5-dimetilisoxazol-4-il)metil)-1H-pirazol-4-il)imidazolidina-2,4-diona (150 mg, 53%) como um sólido marrom claro.^{12.09} ^1H
 15 NMR (DMSO, 400 MHz): δ (s, 3H), 2.14 (s, 3H), 2.20 (s, 3H), 3.70 (s, 3H), 3.99 (s, 2H), 4.55 (s, 2H), 5.19 (s, 2H), 6.06 (s, H), 7.77 (s, H), 8.17 (s, H), . MS M+H calculado durante 384.2; encontrado 384.2. Ponto de fusão: 145-146 °C.

Exemplo 10-91: 1-benzil-4-((1-((3,5-dimetilisoxazol-4-il)metil)-1H-pirazol-4-il)-2-etil-1,2,4-triazolidina-3,5-diona

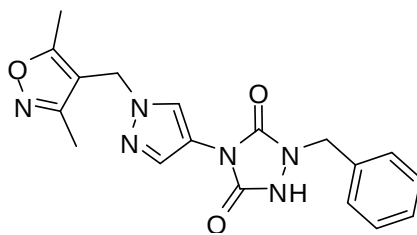


1-benzil-4-((1-((3,5-dimetilisoxazol-4-il)metil)-1H-pirazol-4-il)-1,2,4-triazolidina-3,5-diona (100 mg, 0.27

mmol), bromoetano (149 mg, 1.36 mmol), e carbonato de césio (355 mg, 1.1 mmol) em DMF (5 mL) foram aquecidos a 80 °C durante 15 horas. A reação foi resfriada à temperatura ambiente, diluída com salmoura (50 mL) e extraída com acetato de etila (2x, 50 mL). Os extratos orgânicos combinados foram secos sob sulfato de magnésio, filtrados e concentrados em evaporador rotatório. O resíduo foi purificado por HPLC (5 a 95% acetonitrila em H₂O: gradiente de 25 minutos) para fornecer 1-benzil-4-(1-((3,5-dimetilisoxazol-4-il)metil)-1H-pirazol-4-il)-2-etil-1,2,4-triazolidina-3,5-diona (40 mg, 37%) como um óleo. ¹H NMR (DMSO-*d*₆, 400 MHz): δ 0.97 (t, *J* = 7.2 Hz, 3H), 2.13 (s, 3H), 2.39 (s, 3H), 3.58 (q, *J* = 6.8 Hz, 2H), 4.80 (s, 2H), 5.18 (s, 2H), 7.28-7.36 (m, 5H), 7.77 (s, 1H), 8.19 (s, 1H). MS M+H calculado 395.18; encontrado 395.2.

O composto do título foi mostrado para inibir receptor amargo hT2R08 e ter um IC₅₀ de 0.04 μ M.

Exemplo 10-91a: 1-benzil-4-(1-((3,5-dimetilisoxazol-4-il)metil)-1H-pirazol-4-il)-1,2,4-triazolidina-3,5-diona

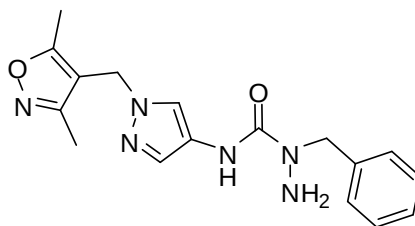


20

1-benzil-N-(1-((3,5-dimetilisoxazol-4-il)metil)-1H-pirazol-4-il)hidrazinacarboxamida (2.00g, 5.88 mmol), cloroformiato de etila (6.38g, 58.77 mmol), e trietilamina (1.78g, 17.63 mmol) em acetonitrila (50 mL) foram aquecidos a 100 °C durante 48 horas. A mistura foi resfriada a 80 °C, 1 M NaOH(aq) (5 mL) foi adicionado e a mistura de reação foi agitada durante 1 hora. The reação foi resfriada à temperatura ambiente e concentrada em evaporador rotatório. O resíduo foi dissolvido em diclorometano e filtrado para

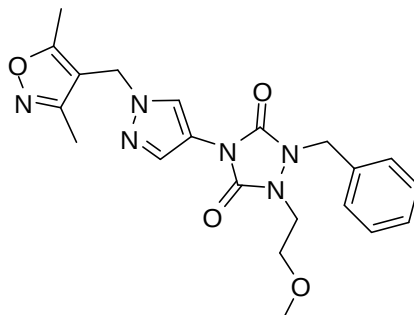
remover sais e a solução foi concentrada para fornecer 1-benzil-4-(1-((3,5-dimetilisoxazol-4-il)metil)-1H-pirazol-4-il)-1,2,4-triazolidina-3,5-diona (1.28 g, 60%) como um óleo amarelo. MS M+H calculado 367.14; encontrado 367.2.

5 **Exemplo 10-91b: 1-benzil-N-(1-((3,5-dimetilisoxazol-4-il)metil)-1H-pirazol-4-il)hidrazinacarboxamida**



1-((3,5-dimetilisoxazol-4-il)metil)-1H-pirazol-4-carbonil
 10 azida (2.79g, 11.33 mmol) em tolueno (70 mL) foi aquecida a refluxo durante 4 horas para fornecer 4-((4-isocianato-1H-pirazol-1-il)metil)-3,5-dimetilisoxazol *in situ*. Dicloridrato de Benzilhidrazina (2.44 g, 12.45 mmol) e trietilamina (2.29 g, 22.64 mmol) foram adicionados à
 15 mistura. A mistura foi aquecida a 100 °C durante 4 horas adicionais. A reação foi resfriada à temperatura ambiente, diluída com acetato de etila (150 mL) e filtrada através de celite. O licor-mãe foi então lavado com salmoura (150 mL) e a camada orgânica foi seca sob sulfato de magnésio, filtrada
 20 e concentrada. O resíduo foi purificado por cromatografia de coluna de sílica (100% a 90% diclorometano em metanol: gradiente de 30 minutos) para fornecer 1-benzil-N-(1-((3,5-dimetilisoxazol-4-il)metil)-1H-pirazol-4-il)hidrazinacarboxamida (2.00g, 52%) como um óleo. MS M+H
 25 calculado 341.16; encontrado 341.2.

Exemplo 10-92: 1-benzil-4-(1-((3,5-dimetilisoxazol-4-il)metil)-1H-pirazol-4-il)-2-(2-metoxietil)-1,2,4-triazolidina-3,5-diona

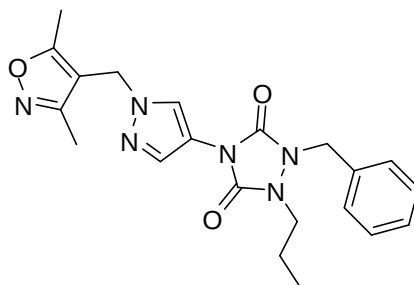


5

Preparado como no Exemplo 10-91 de 1-benzil-4-(1-((3,5-dimetilisoxazol-4-il)metil)-1H-pirazol-4-il)-1,2,4-triazolidina-3,5-diona (Exemplo 10-91a) e 2-bromoetil metil éter. Rendimento: 20%. MS M+H calculado 425.19; encontrado 425.2. O composto do título foi mostrado para inibir receptor amargo hT2R08 e ter um IC₅₀ de 0.06 µM.

10

Exemplo 10-93: 1-benzil-4-(1-((3,5-dimetilisoxazol-4-il)metil)-1H-pirazol-4-il)-2-propil-1,2,4-triazolidina-3,5-diona



15

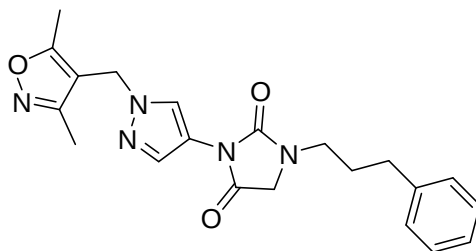
Preparado como no Exemplo 10-91 de 1-benzil-4-(1-((3,5-dimetilisoxazol-4-il)metil)-1H-pirazol-4-il)-1,2,4-triazolidina-3,5-diona (Exemplo 10-91a) e 1-bromopropano. Rendimento: 38%. MS M+H calculado 409.19; encontrado 409.2.

20

O composto do título foi mostrado para inibir receptor amargo hT2R08 e ter um IC₅₀ de 0.06 µM.

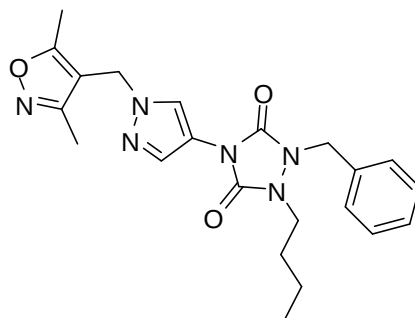
Exemplo 10-94: 3-(1-((3,5-dimetilisoxazol-4-il)metil)-1H-pirazol-4-il)-1-(3-fenilpropil)imidazolidina-2,4-diona.

5



Preparado como no Exemplo 10-52 de 3-(1-((3,5-dimetilisoxazol-4-il)metil)-1H-pirazol-4-il)imidazolidina-2,4-diona (Exemplo 10-1) e (3-bromopropil)benzeno. Rendimento: 36%. MS M+H calculado 394.2; encontrado 394.2. O composto do título foi mostrado para inibir receptor amargo hT2R08 e ter um IC₅₀ de 0.26 µM.

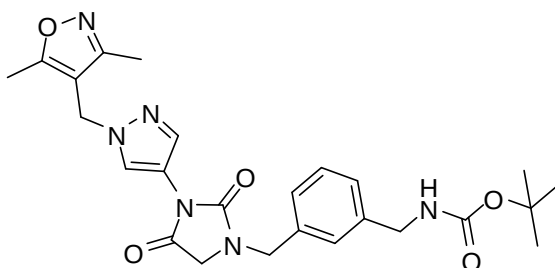
Exemplo 10-95: 1-benzil-2-butil-4-(1-((3,5-dimetilisoxazol-4-il)metil)-1H-pirazol-4-il)-1,2,4-triazolidina-3,5-diona



Preparado como no Exemplo 10-91 de 1-benzil-4-(1-((3,5-dimetilisoxazol-4-il)metil)-1H-pirazol-4-il)-1,2,4-triazolidina-3,5-diona (Exemplo 10-91a) e 1-bromobutano. Rendimento: 22%. MS M+H calculado 423.21; encontrado 423.15.

O composto do título foi mostrado para inibir receptor amargo hT2R08 e ter um IC₅₀ de 0.41 µM.

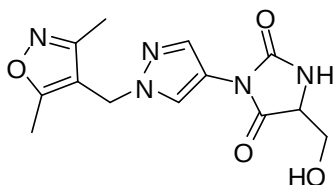
Exemplo 10-96: tert-butil 3-((3-(1-((3,5-dimetilisoxazol-4-il)metil)-1H-pirazol-4-il)-2,4-dioxoimidazolidin-1-il)metil)benzilcarbamato



3-(1-((3,5-dimetilisoxazol-4-il)metil)-1H-pirazol-4-il)imidazolidina-2,4-diona (Exemplo 10-1) (070 mg, 0.254 mmol), tert-butil 3-(hidroximetil)benzilcarbamato (0.254 mmol, 60 mg), dietil azodicarboxilato (0.50 mmol, 86 mg), e P-tBu₃ (125 mL, 0.50 mmol) foram agitados em THF (1 mL) durante 4 horas. A reação foi diluída com acetato de etila (1.5 mL) e lavada com solução saturada de bicarbonato de sódio (2x, 1.5 mL). A fase orgânica foi coletada e a mistura foi concentrada sob uma corrente de nitrogênio. O produto bruto foi purificado por cromatografia de coluna em sílica gel usando acetato de etila como o eluente. As frações puras foram combinadas e os solventes foram removidos em evaporador rotatório para fornecer tert-butil 3-((3-(1-((3,5-dimetilisoxazol-4-il)metil)-1H-pirazol-4-il)-2,4-dioxoimidazolidin-1-il)metil)benzilcarbamato como um sólido branco (112 mg, 90%). ¹H NMR (CDCl₃, 400 MHz): δ 1.44 (s, 9H), 2.19 (s, 3H), 2.42 (s, 3H), 3.48 (bs, 1H), 3.84 (s, 2H), 4.31-4.30 (d, J = 6 Hz, 1H), 4.60 (s, 2H), 4.87 (bs, 1H), 5.06 (s, 2H), 7.36 - 7.16 (m, 4H), 7.92 (s, 1 H), 8.08 (s,

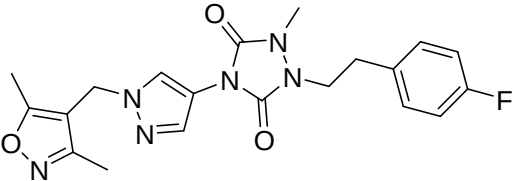
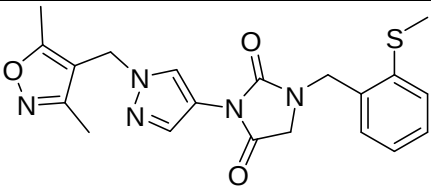
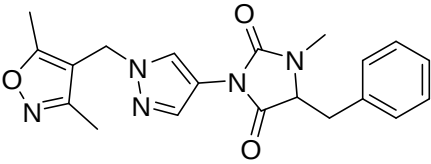
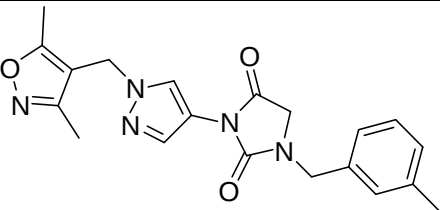
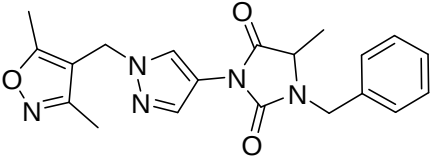
1H). O composto do título foi mostrado para inibir receptor amargo hT2R08 e ter um IC₅₀ de 0.90 µM.

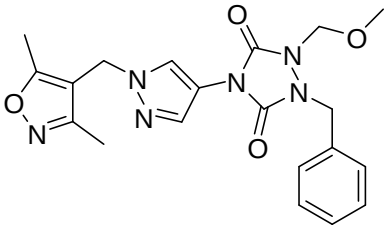
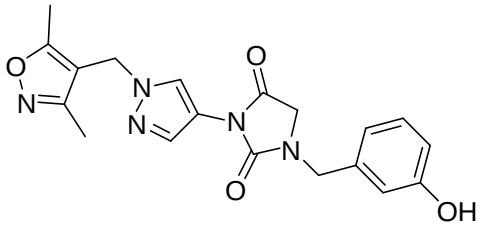
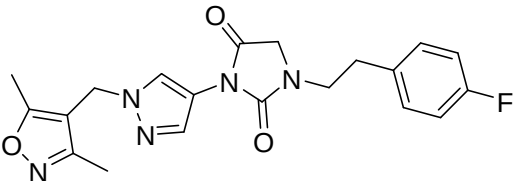
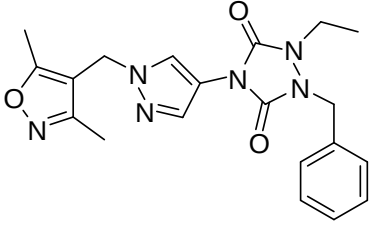
Exemplo 10-97: 3-(1-((3,5-dimetilisoxazol-4-il)metil)-1H-pirazol-4-il)-5-(hidroximetil)imidazolidina-2,4-diona

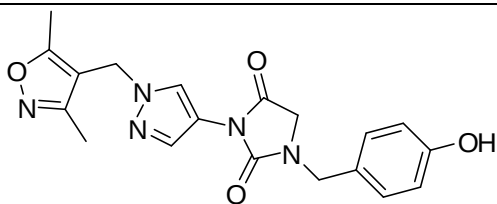
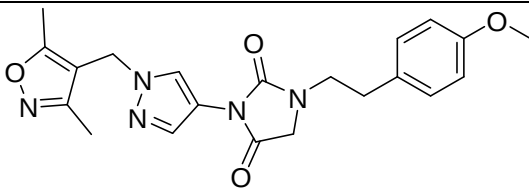
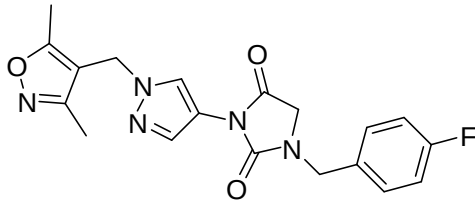
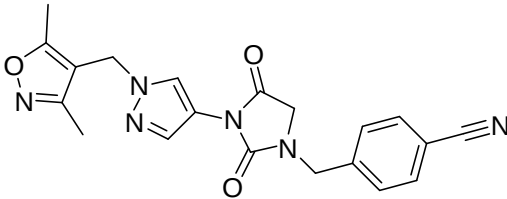
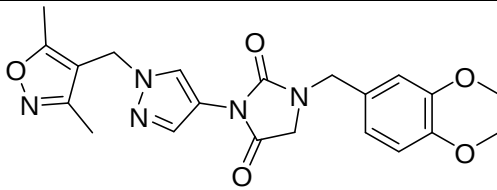


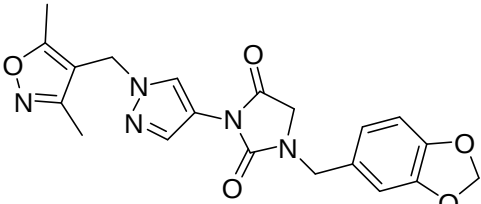
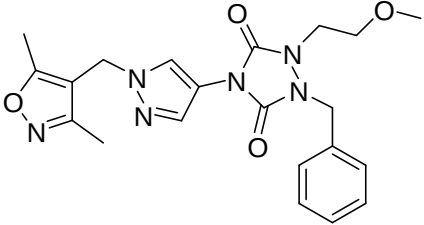
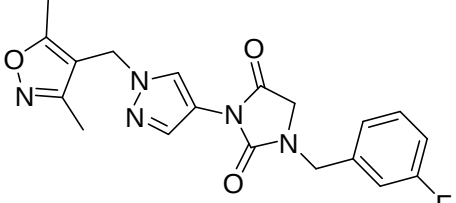
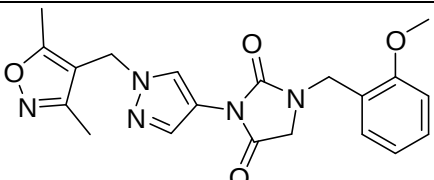
5

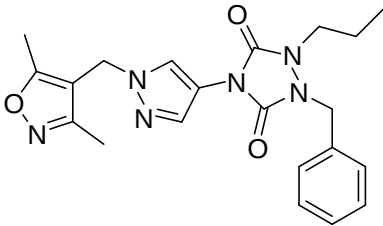
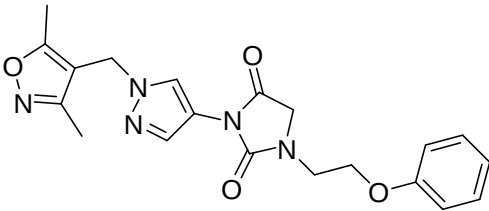
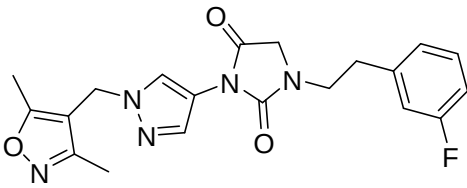
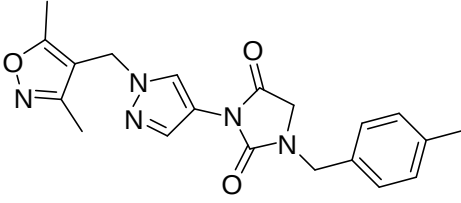
4-((4-isocianato-1H-pirazol-1-il)metil)-3,5-dimetilisoxazol (Exemplo 10-1) (784 mg, 3.6 mmol), metil éster cloridrato de serina (672 mg, 4.32 mmol) e trietilamina (1 mL, 7.2 mmol) foram refluxados em tolueno (16 mL) durante 8 horas. A reação foi deixada resfriar à temperatura ambiente e então a solução foi concentrada em evaporador rotatório. O produto foi purificado por HPLC de fase reversa (5 a 95% acetonitrila em H₂O: gradiente de 16 minutos) para fornecer 3-(1-((3,5-dimetilisoxazol-4-il)metil)-1H-pirazol-4-il)-5-(hidroximetil)imidazolidina-2,4-diona como um sólido branco (60 mg, 25%). ¹H NMR (CDCl₃, 400 MHz): δ (s, 3H), 2.40 (s, 3H), 3.13-3.07 (m, 1H), 3.94-3.93 (d, J = 4 Hz, 2H), 4.21-4.19 (t, J = 4 Hz, 1H), 5.03 (s, 2H), 6.68 (bs, 1H), 7.87 (s, 1H), 7.99 (s, 1H). O composto do título foi mostrado para inibir receptor amargo hT2R08 e ter um IC₅₀ de 3 µM.

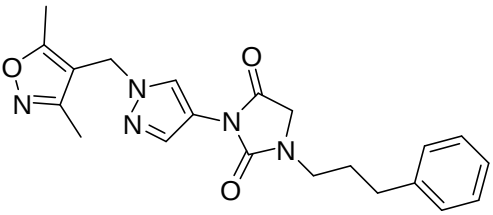
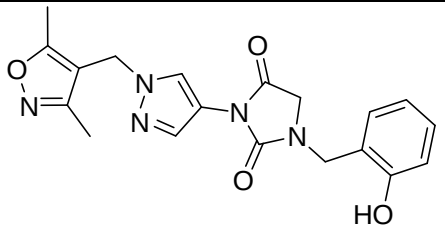
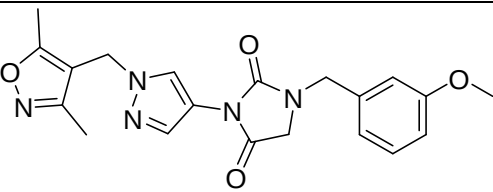
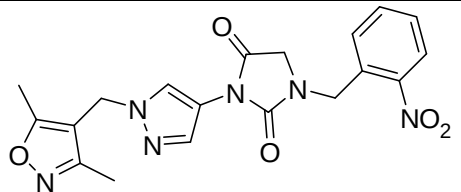
Composto No.	Composto	hT2R8 IC ₅₀ (µM)
10-66	 4-(1-((3,5-dimetilisoxazol-4-il)metil)-1H-pirazol-4-il)-1-(4-fluorofenetil)-2-metil-1,2,4-triazolidina-3,5-diona	0.012
10-15	 3-(1-((3,5-dimetilisoxazol-4-il)metil)-1H-pirazol-4-il)-1-(2-(metiltio)benzil)imidazolidina-2,4-diona	0.016
10-42	 5-benzil-3-(1-((3,5-dimetilisoxazol-4-il)metil)-1H-pirazol-4-il)-1-metilimidazolidina-2,4-diona	0.017
10-26	 3-(1-((3,5-dimetilisoxazol-4-il)metil)-1H-pirazol-4-il)-1-(3-metilbenzil)imidazolidina-2,4-diona	0.019
10-43	 1-benzil-3-(1-((3,5-dimetilisoxazol-4-il)metil)-1H-pirazol-4-il)-5-metilimidazolidina-2,4-diona	0.020

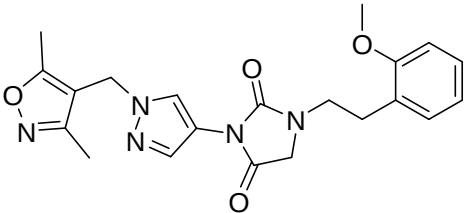
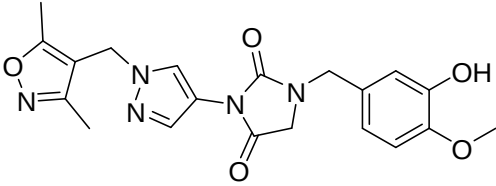
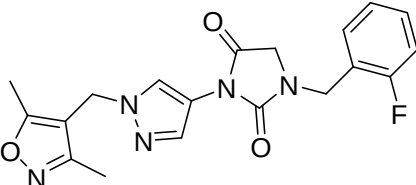
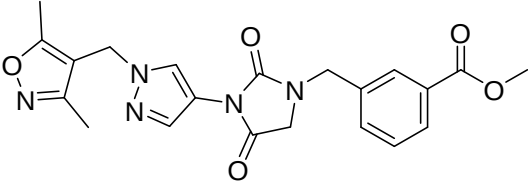
Composto No.	Composto	hT2R8 IC ₅₀ (μM)
10-89	 1-benzil-4-(1-((3,5-dimetilisoxazol-4-il)metil)-1H-pirazol-4-il)-2-(metoximetil)-1,2,4-triazolidina-3,5-diona	0.024
10-10	 3-(1-((3,5-dimetilisoxazol-4-il)metil)-1H-pirazol-4-il)-1-(3-hidroxibenzil)imidazolidina-2,4-diona	0.026
10-84	 3-(1-((3,5-dimetilisoxazol-4-il)metil)-1H-pirazol-4-il)-1-(4-fluorofenetil)imidazolidina-2,4-diona	0.027
10-91	 1-benzil-4-(1-((3,5-dimetilisoxazol-4-il)metil)-1H-pirazol-4-il)-2-etil-1,2,4-triazolidina-3,5-diona	0.041

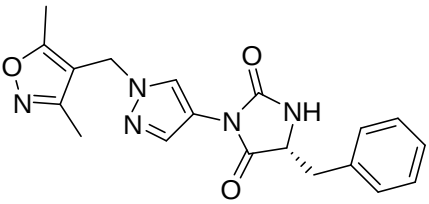
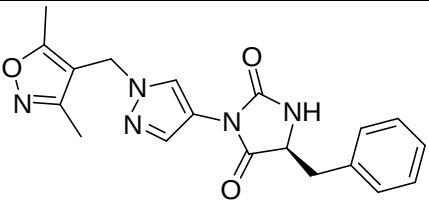
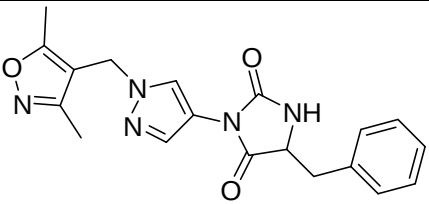
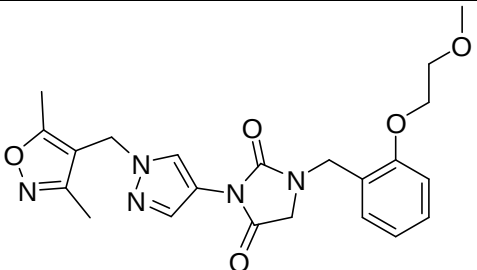
Composto No.	Composto	hT2R8 IC ₅₀ (µM)
10-12	 3-(1-((3,5-dimetilisoxazol-4-il)metil)-1H-pirazol-4-il)-1-(4-hidroxibenzil)imidazolidina-2,4-diona	0.043
10-79	 3-(1-((3,5-dimetilisoxazol-4-il)metil)-1H-pirazol-4-il)-1-(4-metoxifenetil)imidazolidina-2,4-diona	0.044
10-31	 3-(1-((3,5-dimetilisoxazol-4-il)metil)-1H-pirazol-4-il)-1-(4-fluorobenzil)imidazolidina-2,4-diona	0.045
10-32	 4-((3-(1-((3,5-dimetilisoxazol-4-il)metil)-1H-pirazol-4-il)-2,4-dioxoimidazolidin-1-il)metil)benzonitrila	0.048
10-35	 1-(3,4-dimetoxibenzil)-3-(1-((3,5-dimetilisoxazol-4-il)metil)-1H-pirazol-4-il)imidazolidina-2,4-diona	0.051

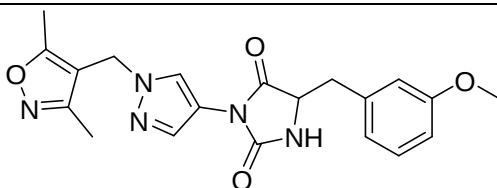
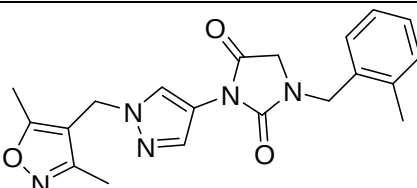
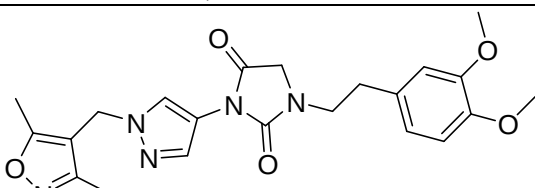
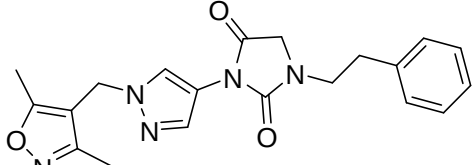
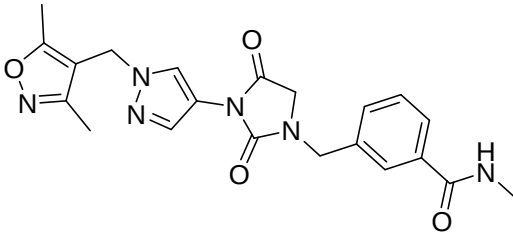
Composto No.	Composto	hT2R8 IC ₅₀ (μM)
10-36	 1-(benzo[d][1,3]dioxol-5-ylmethyl)-3-(1-((3,5-dimethylisoxazol-4-yl)methyl)-1H-pyrazol-4-yl)imidazolidina-2,4-diona	0.053
10-92	 1-benzil-4-(1-((3,5-dimethylisoxazol-4-yl)methyl)-1H-pyrazol-4-yl)-2-(2-metoxietil)-1,2,4-triazolidina-3,5-diona	0.057
10-27	 3-(1-((3,5-dimethylisoxazol-4-yl)methyl)-1H-pyrazol-4-yl)-1-(3-fluorobenzil)imidazolidina-2,4-diona	0.058
10-18	 3-(1-((3,5-dimethylisoxazol-4-yl)methyl)-1H-pyrazol-4-yl)-1-(2-metoxibenzil)imidazolidina-2,4-diona	0.060

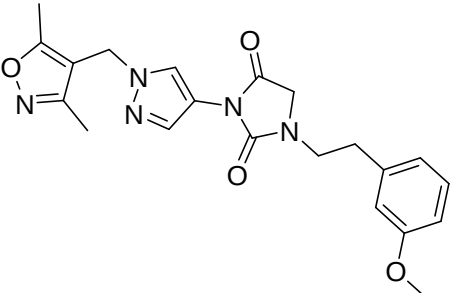
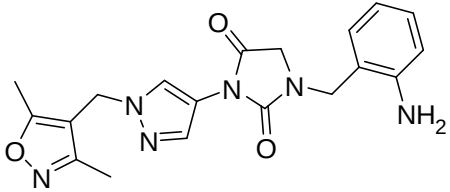
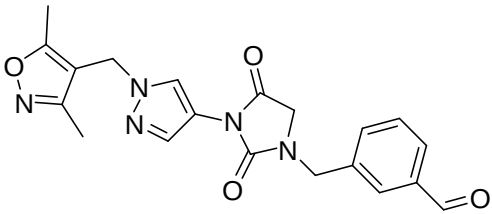
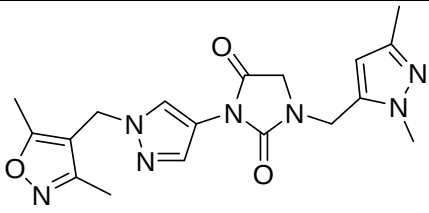
Composto No.	Composto	hT2R8 IC ₅₀ (μM)
10-93	 1-benzil-4-(1-((3,5-dimetilisoxazol-4-il)metil)-1H-pirazol-4-il)-2-propil-1,2,4-triazolidina-3,5-diona	0.062
10-5	 3-(1-((3,5-dimetilisoxazol-4-il)metil)-1H-pirazol-4-il)-1-(2-fenoxietil)imidazolidina-2,4-diona	0.063
10-77	 3-(1-((3,5-dimetilisoxazol-4-il)metil)-1H-pirazol-4-il)-1-(3-fluorofenetil)imidazolidina-2,4-diona	0.064
10-30	 3-(1-((3,5-dimetilisoxazol-4-il)metil)-1H-pirazol-4-il)-1-(4-metilbenzil)imidazolidina-2,4-diona	0.065

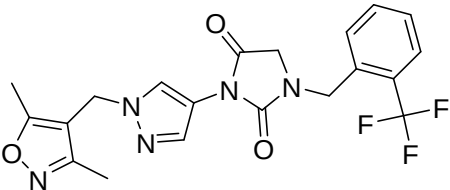
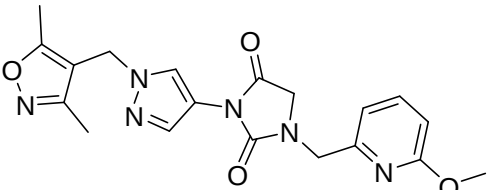
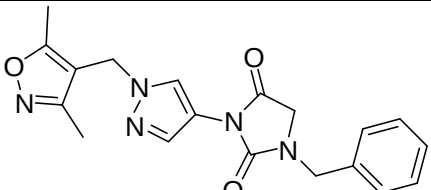
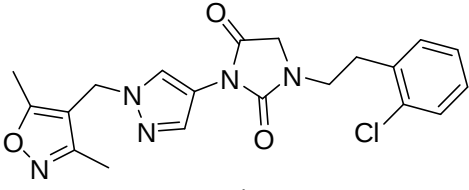
Composto No.	Composto	hT2R8 IC ₅₀ (µM)
10-94	 3-(1-((3,5-dimetilisoxazol-4-il)metil)-1H-pirazol-4-il)-1-(3-fenilpropil)imidazolidina-2,4-diona	0.068
10-11	 3-(1-((3,5-dimetilisoxazol-4-il)metil)-1H-pirazol-4-il)-1-(2-hidroxibenzil)imidazolidina-2,4-diona	0.069
10-6	 3-(1-((3,5-dimetilisoxazol-4-il)metil)-1H-pirazol-4-il)-1-(3-metoxibenzil)imidazolidina-2,4-diona	0.073
10-23	 3-(1-((3,5-dimetilisoxazol-4-il)metil)-1H-pirazol-4-il)-1-(2-nitrobenzil)imidazolidina-2,4-diona	0.081

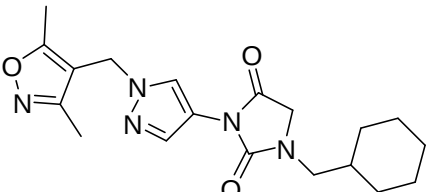
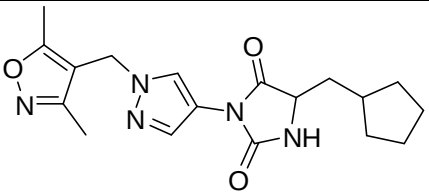
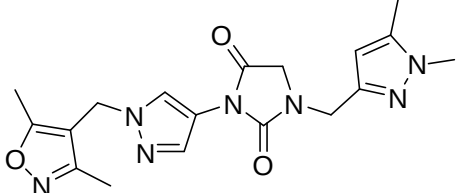
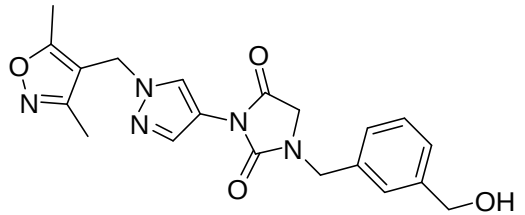
Composto No.	Composto	hT2R8 IC ₅₀ (μM)
10-76	 3-(1-((3,5-dimetilisoxazol-4-il)metil)-1H-pirazol-4-il)-1-(2-metoxifenetil)imidazolidina-2,4-diona	0.097
10-13	 3-(1-((3,5-dimetilisoxazol-4-il)metil)-1H-pirazol-4-il)-1-(3-hidróxi-4-metoxibenzil)imidazolidina-2,4-diona	0.087
10-21	 3-(1-((3,5-dimetilisoxazol-4-il)metil)-1H-pirazol-4-il)-1-(2-fluorobenzil)imidazolidina-2,4-diona	0.090
10-7	 metil 3-((3-(1-((3,5-dimetilisoxazol-4-il)metil)-1H-pirazol-4-il)-2,4-dioxoimidazolidin-1-il)metil)benzoato	0.102

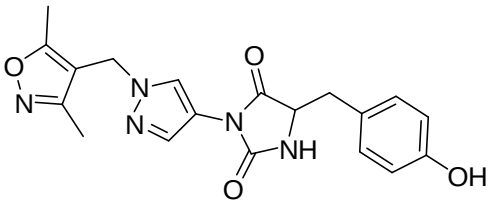
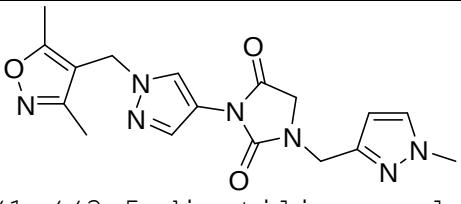
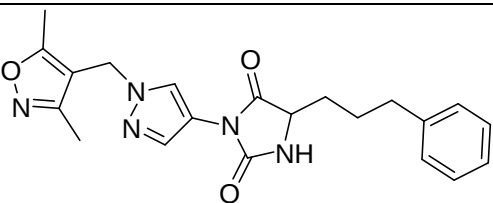
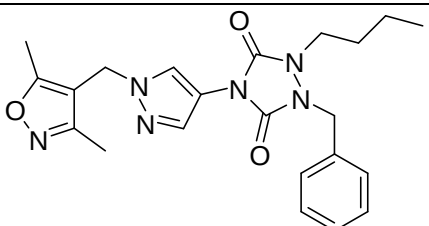
Composto No.	Composto	hT2R8 IC ₅₀ (µM)
10-4	 (R)-5-benzil-3-(1-((3,5-dimetilisoxazol-4-il)metil)-1H-pirazol-4-il)imidazolidina-2,4-diona	0.112
10-3	 (S)-5-benzil-3-(1-((3,5-dimetilisoxazol-4-il)metil)-1H-pirazol-4-il)imidazolidina-2,4-diona	0.113
10-2	 5-benzil-3-(1-((3,5-dimetilisoxazol-4-il)metil)-1H-pirazol-4-il)imidazolidina-2,4-diona	0.117
10-16	 3-(1-((3,5-dimetilisoxazol-4-il)metil)-1H-pirazol-4-il)-1-(2-(2-metoxietóxi)benzil)imidazolidina-2,4-diona	0.131

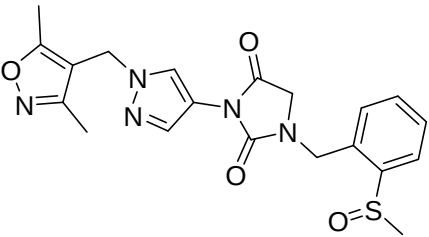
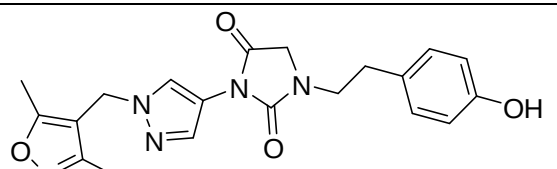
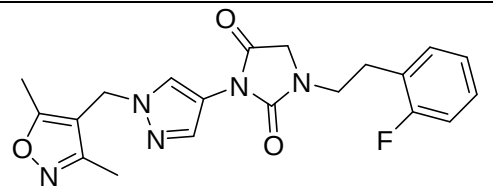
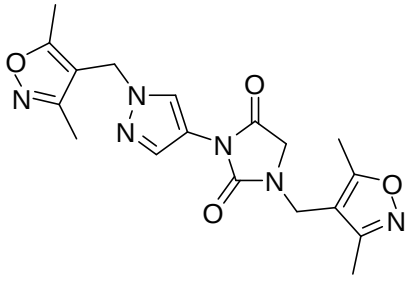
Composto No.	Composto	hT2R8 IC ₅₀ (μM)
10-56	 3-(1-((3,5-dimetilisoxazol-4-il)metil)-1H-pirazol-4-il)-5-(3-metoxibenzil)imidazolidina-2,4-diona	0.131
10-20	 3-(1-((3,5-dimetilisoxazol-4-il)metil)-1H-pirazol-4-il)-1-(2-metilbenzil)imidazolidina-2,4-diona	0.133
10-87	 1-(3,4-dimetoxifenetil)-3-(1-((3,5-dimetilisoxazol-4-il)metil)-1H-pirazol-4-il)imidazolidina-2,4-diona	0.137
10-78	 3-(1-((3,5-dimetilisoxazol-4-il)metil)-1H-pirazol-4-il)-1-fenetilimidazolidina-2,4-diona	0.139
10-9	 3-((3-(1-((3,5-dimetilisoxazol-4-il)metil)-1H-pirazol-4-il)-2,4-dioxoimidazolidin-1-il)metil)-N-metilbenzamida	0.141

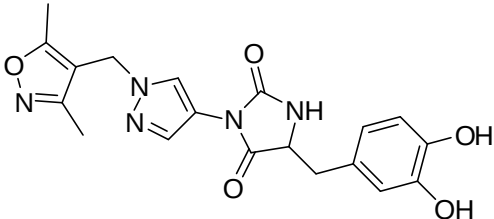
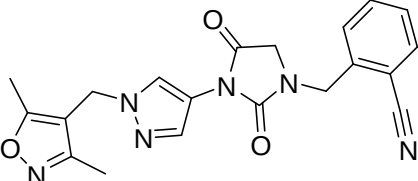
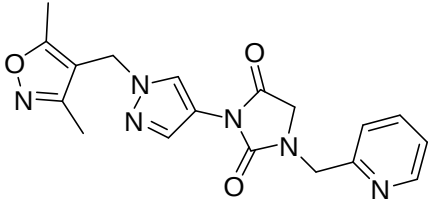
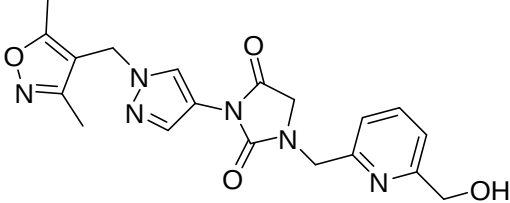
Composto No.	Composto	hT2R8 IC ₅₀ (μM)
10-85	 3-(1-((3,5-dimetilisoxazol-4-il)metil)-1H-pirazol-4-il)-1-(3-metoxifenetil)imidazolidina-2,4-diona	0.158
10-34	 1-(2-aminobenzil)-3-(1-((3,5-dimetilisoxazol-4-il)metil)-1H-pirazol-4-il)imidazolidina-2,4-diona	0.163
10-24	 3-((3-(1-((3,5-dimetilisoxazol-4-il)metil)-1H-pirazol-4-il)-2,4-dioxoimidazolidin-1-il)metil)benzaldeído	0.201
10-90	 1-((1,3-dimetil-1H-pirazol-5-il)metil)-3-(1-((3,5-dimetilisoxazol-4-il)metil)-1H-pirazol-4-il)imidazolidina-2,4-diona	0.215

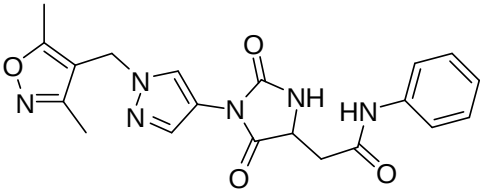
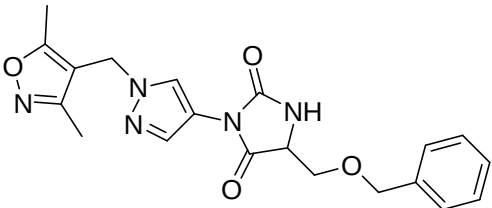
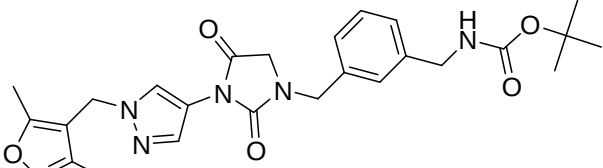
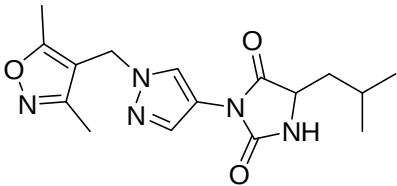
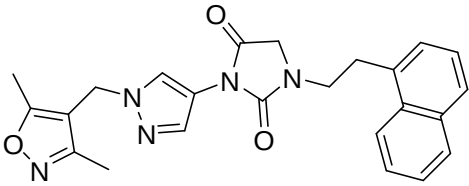
Composto No.	Composto	hT2R8 IC ₅₀ (μM)
10-22	 3-(1-((3,5-dimetilisoxazol-4-il)metil)-1H-pirazol-4-il)-1-(2-(trifluorometil)benzil)imidazolidina-2,4-diona	0.221
10-75	 3-(1-((3,5-dimetilisoxazol-4-il)metil)-1H-pirazol-4-il)-1-((6-metoxypyridin-2-il)metil)imidazolidina-2,4-diona	0.229
10-53	 1-benzil-3-(1-((3,5-dimetilisoxazol-4-il)metil)-1H-pirazol-4-il)imidazolidina-2,4-diona	0.257
10-81	 1-(2-clorofenetil)-3-(1-((3,5-dimetilisoxazol-4-il)metil)-1H-pirazol-4-il)imidazolidina-2,4-diona	0.248

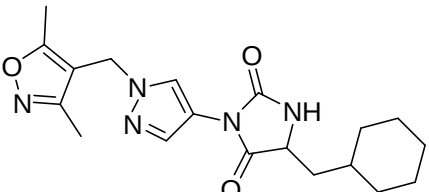
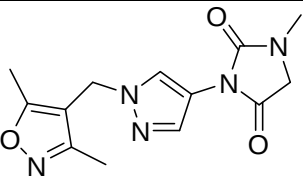
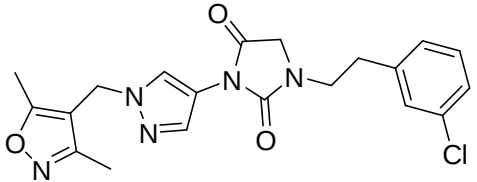
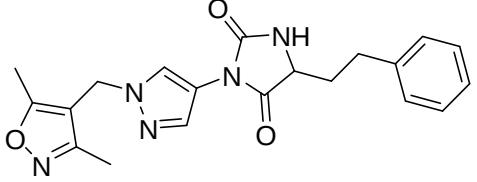
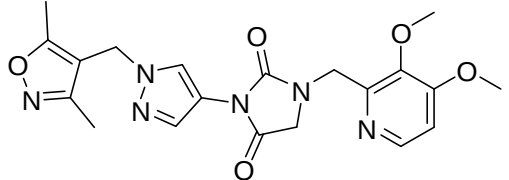
Composto No.	Composto	hT2R8 IC ₅₀ (µM)
10-74	 1-(ciclohexilmetil)-3-(1-((3,5-dimetilisoxazol-4-il)metil)-1H-pirazol-4-il)imidazolidina-2,4-diona	0.276
10-58	 5-(ciclopentilmetil)-3-(1-((3,5-dimetilisoxazol-4-il)metil)-1H-pirazol-4-il)imidazolidina-2,4-diona	0.316
10-28	 1-((1,5-dimetil-1H-pirazol-3-il)metil)-3-(1-((3,5-dimetilisoxazol-4-il)metil)-1H-pirazol-4-il)imidazolidina-2,4-diona	0.322
10-33	 3-(1-((3,5-dimetilisoxazol-4-il)metil)-1H-pirazol-4-il)-1-(3-(hidroximetil)benzil)imidazolidina-2,4-diona	0.322

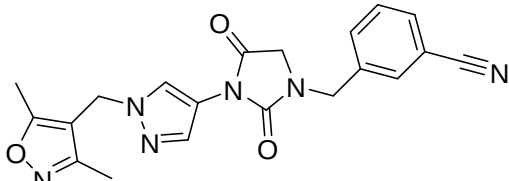
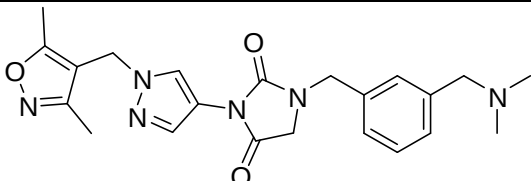
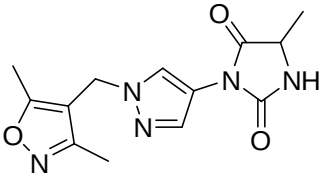
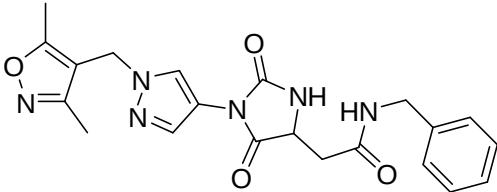
Composto No.	Composto	hT2R8 IC ₅₀ (µM)
10-59	 3-(1-((3,5-dimetilisoxazol-4-il)metil)-1H-pirazol-4-il)-5-(4-hidroxibenzil)imidazolidina-2,4-diona	0.327
10-38	 3-(1-((3,5-dimetilisoxazol-4-il)metil)-1H-pirazol-4-il)-1-((1-metil-1H-pirazol-3-il)metil)imidazolidina-2,4-diona	0.363
10-46	 3-(1-((3,5-dimetilisoxazol-4-il)metil)-1H-pirazol-4-il)-5-(3-fenilpropil)imidazolidina-2,4-diona	0.484
10-95	 1-benzil-2-butil-4-(1-((3,5-dimetilisoxazol-4-il)metil)-1H-pirazol-4-il)-1,2,4-triazolidina-3,5-diona	0.409

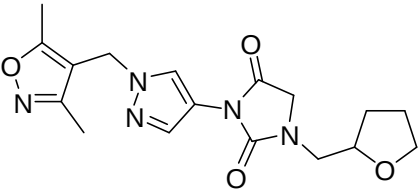
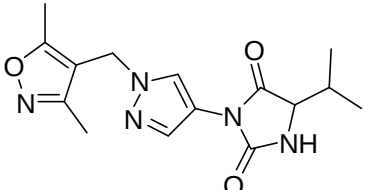
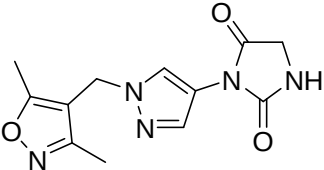
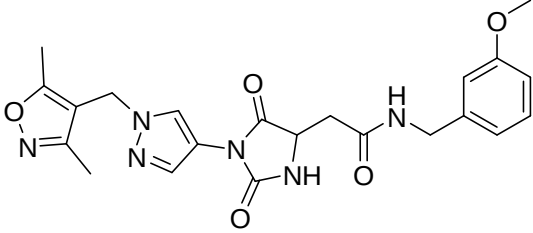
Composto No.	Composto	hT2R8 IC ₅₀ (μM)
10-17	 3-(1-((3,5-dimetilisoxazol-4-il)metil)-1H-pirazol-4-il)-1-(2-(metilsulfinil)benzil)imidazolidina-2,4-diona	0.412
10-86	 3-(1-((3,5-dimetilisoxazol-4-il)metil)-1H-pirazol-4-il)-1-(4-hidroxifenetil)imidazolidina-2,4-diona	0.412
10-83	 3-(1-((3,5-dimetilisoxazol-4-il)metil)-1H-pirazol-4-il)-1-(2-fluorofenetil)imidazolidina-2,4-diona	0.442
10-55	 1-((3,5-dimetilisoxazol-4-il)metil)-3-(1-((3,5-dimetilisoxazol-4-il)metil)-1H-pirazol-4-il)imidazolidina-2,4-diona	0.479

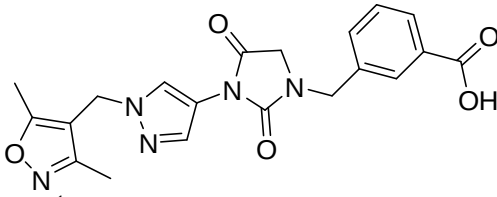
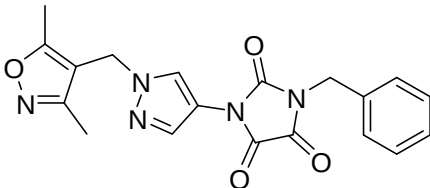
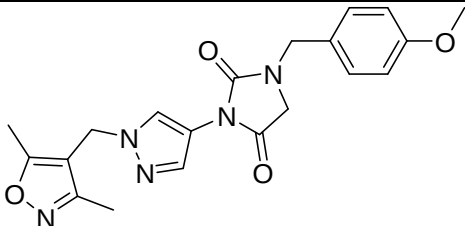
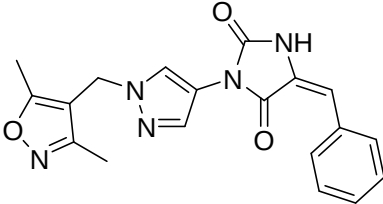
Composto No.	Composto	hT2R8 IC ₅₀ (μM)
10-60	 5-(3,4-dihidroxibenzil)-3-(1-((3,5-dimetilisoxazol-4-il)metil)-1H-pirazol-4-il)imidazolidina-2,4-diona	0.513
10-19	 2-((3-(1-((3,5-dimetilisoxazol-4-il)metil)-1H-pirazol-4-il)-2,4-dioxoimidazolidin-1-il)metil)benzonitrila	0.550
10-54	 3-(1-((3,5-dimetilisoxazol-4-il)metil)-1H-pirazol-4-il)-1-(pyridin-2-il)metil)imidazolidina-2,4-diona	0.609
10-71	 3-(1-((3,5-dimetilisoxazol-4-il)metil)-1H-pirazol-4-il)-1-((6-(hidroximetil)piridin-2-il)metil)imidazolidina-2,4-diona	0.721

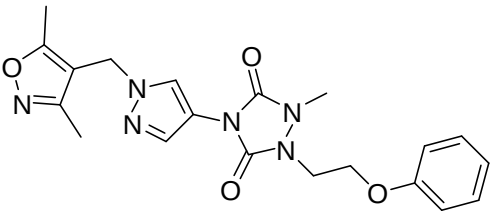
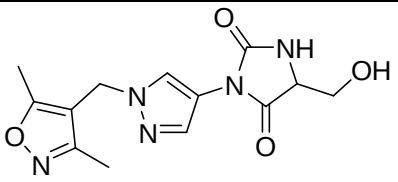
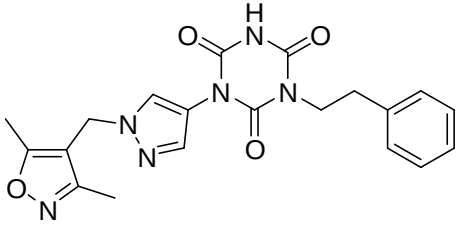
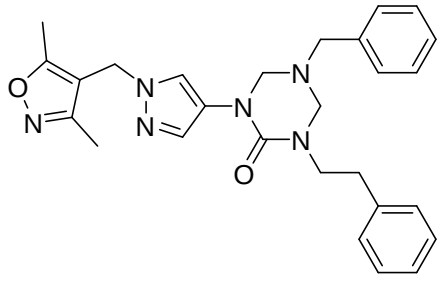
Composto No.	Composto	hT2R8 IC ₅₀ (µM)
10-48	 2-(1-(1-((3,5-dimetilisoxazol-4-il)metil)-1H-pirazol-4-il)-2,5-dioxoimidazolidin-4-il)-N-fenilacetamida	0.747
10-47	 5-(benziloximetil)-3-(1-((3,5-dimetilisoxazol-4-il)metil)-1H-pirazol-4-il)imidazolidina-2,4-diona	0.766
10-96	 tert-butil 3-((3-(1-((3,5-dimetilisoxazol-4-il)metil)-1H-pirazol-4-il)-2,4-dioxoimidazolidin-1-il)metil)benzilcarbamato	0.891
10-61	 3-(1-((3,5-dimetilisoxazol-4-il)metil)-1H-pirazol-4-il)-5-isobutilimidazolidina-2,4-diona	0.912
10-80	 3-(1-((3,5-dimetilisoxazol-4-il)metil)-1H-pirazol-4-il)-1-(2-(naftalen-1-il)etil)imidazolidina-2,4-diona	0.927

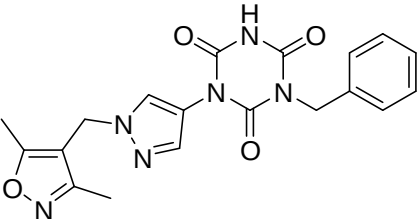
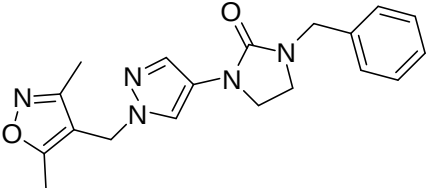
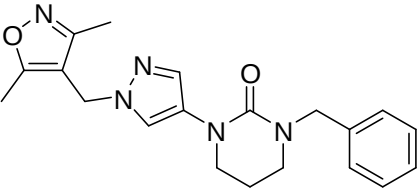
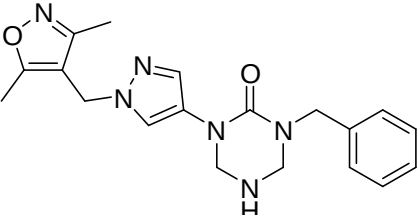
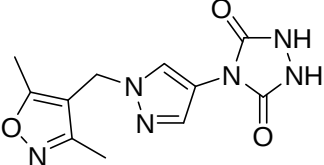
Composto No.	Composto	hT2R8 IC ₅₀ (μM)
10-57	 5-(ciclohexilmetil)-3-(1-((3,5-dimetilisoxazol-4-il)metil)-1H-pirazol-4-il)imidazolidina-2,4-diona	0.962
10-51	 3-(1-((3,5-dimetilisoxazol-4-il)metil)-1H-pirazol-4-il)-1-metilimidazolidina-2,4-diona	0.966
10-82	 1-(3-clorofenetil)-3-(1-((3,5-dimetilisoxazol-4-il)metil)-1H-pirazol-4-il)imidazolidina-2,4-diona	0.982
10-45	 3-(1-((3,5-dimetilisoxazol-4-il)metil)-1H-pirazol-4-il)-5-fenetilimidazolidina-2,4-diona	0.793
10-72	 1-((3,4-dimetoxipiridin-2-il)metil)-3-(1-((3,5-dimetilisoxazol-4-il)metil)-1H-pirazol-4-il)imidazolidina-2,4-diona	0.999

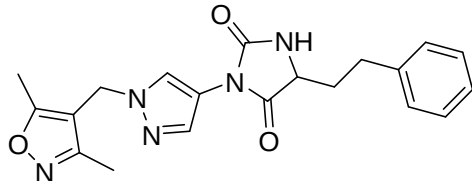
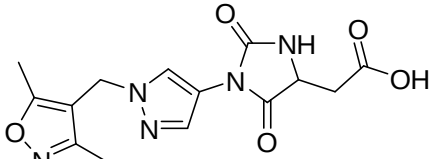
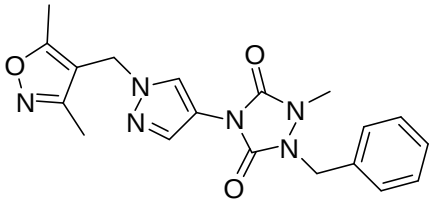
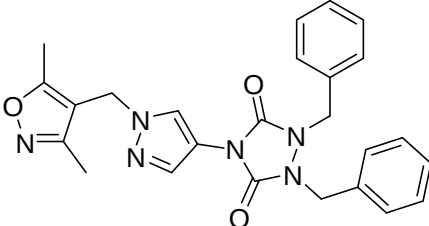
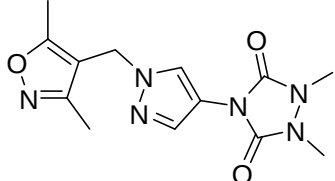
Composto No.	Composto	hT2R8 IC ₅₀ (µM)
10-25	 3-((3-(1-((3,5-dimetilisoxazol-4-il)metil)-1H-pirazol-4-il)-2,4-dioxoimidazolidin-1-il)metil)benzonitrila	1.003
10-37	 1-(3-((dimetilamino)metil)benzil)-3-(1-((3,5-dimetilisoxazol-4-il)metil)-1H-pirazol-4-il)imidazolidina-2,4-diona	1.220
10-41	 3-(1-((3,5-dimetilisoxazol-4-il)metil)-1H-pirazol-4-il)-5-metilimidazolidina-2,4-diona	1.285
10-49	 N-benzil-2-(1-(1-((3,5-dimetilisoxazol-4-il)metil)-1H-pirazol-4-il)-2,5-dioxoimidazolidin-4-il)acetamida	1.329

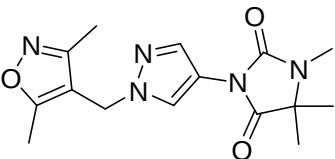
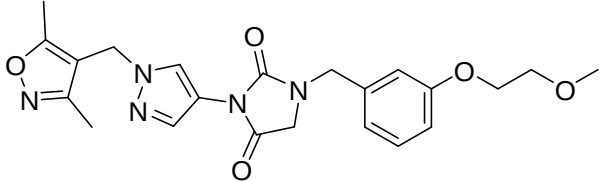
Composto No.	Composto	hT2R8 IC ₅₀ (μM)
10-73	 3-(1-((3,5-dimetilisoxazol-4-il)metil)-1H-pirazol-4-il)-1-((tetrahidrofuran-2-il)metil)imidazolidina-2,4-diona	1.362
10-62	 3-(1-((3,5-dimetilisoxazol-4-il)metil)-1H-pirazol-4-il)-5-isopropilimidazolidina-2,4-diona	1.440
10-1	 3-(1-((3,5-dimetilisoxazol-4-il)metil)-1H-pirazol-4-il)imidazolidina-2,4-diona	1.696
10-50	 2-(1-(1-((3,5-dimetilisoxazol-4-il)metil)-1H-pirazol-4-il)-2,5-dioxoimidazolidin-4-il)-N-(3-metoxibenzil)acetamida	1.773

Composto No.	Composto	hT2R8 IC ₅₀ (μM)
10-8	 Ácido 3-((3-(1-((3,5-dimetilisoxazol-4-il)metil)-1H-pirazol-4-il)-2,4-dioxoimidazolidin-1-il)metil)benzoico	1.798
9-5	 1-benzil-3-(1-((3,5-dimetilisoxazol-4-il)metil)-1H-pirazol-4-il)imidazolidina-2,4,5-triona	2.493
10-29	 3-(1-((3,5-dimetilisoxazol-4-il)metil)-1H-pirazol-4-il)-1-(4-metoxibenzil)imidazolidina-2,4-diona	3.117
10-63	 (E)-5-benzilideno-3-(1-((3,5-dimetilisoxazol-4-il)metil)-1H-pirazol-4-il)imidazolidina-2,4-diona	

Composto No.	Composto	hT2R8 IC ₅₀ (μM)
10-67	 4-(1-((3,5-dimetilisoxazol-4-il)metil)-1H-pirazol-4-il)-1-metil-2-(2-fenoxietil)-1,2,4-triazolidina-3,5-diona	
10-97	 3-(1-((3,5-dimetilisoxazol-4-il)metil)-1H-pirazol-4-il)-5-(hidroximetil)imidazolidina-2,4-diona	
9-8	 1-(1-((3,5-dimetilisoxazol-4-il)metil)-1H-pirazol-4-il)-3-fenetil-1,3,5-triazinano-2,4,6-triona	6.151
9-7	 5-benzil-1-(1-((3,5-dimetilisoxazol-4-il)metil)-1H-pirazol-4-il)-3-fenetil-1,3,5-triazinan-2-ona	6.580

Composto No.	Composto	hT2R8 IC ₅₀ (µM)
9-9	 1-benzil-3-(1-((3,5-dimetilisoxazol-4-il)metil)-1H-pirazol-4-il)-1,3,5-triazinano-2,4,6-triona	1.562
10-88	 1-benzil-3-(1-((3,5-dimetilisoxazol-4-il)metil)-1H-pirazol-4-il)imidazolidin-2-ona	1.250
9-5	 1-benzil-3-(1-((3,5-dimetilisoxazol-4-il)metil)-1H-pirazol-4-il)tetrahidropirimidin-2(1H)-ona	3.434
9-6	 1-benzil-3-(1-((3,5-dimetilisoxazol-4-il)metil)-1H-pirazol-4-il)-1,3,5-triazinano-2-ona	6.029
10-68	 4-(1-((3,5-dimetilisoxazol-4-il)metil)-1H-pirazol-4-il)-1,2,4-triazolidina-3,5-diona	

Composto No.	Composto	hT2R8 IC ₅₀ (μM)
10-45	 3-(1-((3,5-dimetilisoxazol-4-il)metil)-1H-pirazol-4-il)-5-fenetilimidazolidina-2,4-diona	0.793
10-44	 Ácido 2-(1-(1-((3,5-dimetilisoxazol-4-il)metil)-1H-pirazol-4-il)-2,5-dioxoimidazolidin-4-il)acético	
10-65	 1-benzil-4-(1-((3,5-dimetilisoxazol-4-il)metil)-1H-pirazol-4-il)-2-metil-1,2,4-triazolidina-3,5-diona	0.019
10-70	 1,2-dibenzil-4-(1-((3,5-dimetilisoxazol-4-il)metil)-1H-pirazol-4-il)-1,2,4-triazolidina-3,5-diona	1.799
10-69	 4-(1-((3,5-dimetilisoxazol-4-il)metil)-1H-pirazol-4-il)-1,2-dimetil-1,2,4-triazolidina-3,5-diona	0.707

Composto No.	Composto	hT2R8 IC ₅₀ (µM)
10-52	 3-(1-((3,5-dimetilisoxazol-4-il)metil)-1H-pirazol-4-il)-1,5,5-trimetilimidazolidina-2,4-diona	0.810
10-14	 3-(1-((3,5-dimetilisoxazol-4-il)metil)-1H-pirazol-4-il)-1-(3-(2-metoxietóxi)benzil)imidazolidina-2,4-diona	0.071

Exemplo 11. hT2R8 contribui com o sabor amargo da sacarina para pessoas com versões “não-degustadoras” dos genes hT2R43

5 e hT2R44

FIG.. 6 mostra a relação da resposta-dose e os efeitos de sacarina nas atividades do receptor em variantes expressando células transfectadas de hT2R43, hT2R44 e hT2R8. hT2R8 é menos responsivo à sacarina no ensaio in vitro do que os

10 alelos “degustadores” hT2R43-W35 e hT2R44-W35, porém responde melhor do que os alelos “não-degustadores” hT2R43-S35 e hT2R44-R35. Pronin et al., *Curr. Biol.* 17: 1403-8 (2007). Cinco indivíduos com os alelos “degustadores” (hT2R43-W35 e/ou hT2R44-W35) e cinco com os alelos “não-degustadores”

15 (hT2R43-S35 e hT2R44-R35) foram selecionados baseados na análise de genótipo. Cada indivíduo foi presenteado com 6 pares de soluções e solicitado a determinar quais das amostras testadas em pares foram mais amargas. O resultado mostrado na Tabela 8, abaixo, mostra que o bloqueador hT2R8

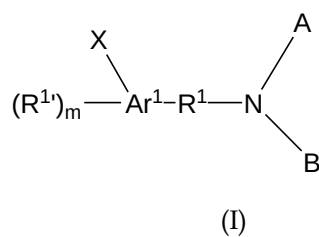
Cpd-D reduz o sabor amargo de sacarina em pessoas com os alelos "não-degustadores" hT2R43 e hT2R44 porém não tem efeito em pessoas com os alelos "degustadores" daqueles genes.

5 Tabela 8: Resultados de Teste de Sabor

Teste de Sabor	Agonista amargo	Grupo Genótipo	Selecionado como mais amargo		Valor P
			sem	+ Cpd-D	
1	sacarina	hT2R43- W35 e/ou hT2R44- W35	13	17	0.82
2	sacarina	hT2R43- S35 e hT2R44- R35	27	3	<0.001

Outros compostos exemplares fornecidos pela presente invenção e/ou adequados a serem usados para métodos da presente invenção incluem Compostos da seguinte fórmula.

Em um primeiro aspecto, um composto da Fórmula estrutural (I) é fornecido:



ou um sal, hidrato, solvato ou N-óxido do mesmo, em que:

Ar¹ um anel arila, heteroarila ou cicloalquila de cinco ou seis membros;

m é 0, 1, 2 ou 3;

R¹ é SO₂; C=O; C=S; ou C=NOR⁴;

X é selecionado do grupo consistindo em hidrogênio, halogênio, alquila, alquila substituída, arila, arila substituída, arilalquila, arilalquila substituída, acila, acila substituída, heteroalquila, heteroalquila substituída, heteroarila, heteroarila substituída, heteroarilalquila, heteroarilalquila substituída, 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), e P(O)(R⁵)(OR⁶);

10 Cada R^{1'} é independentemente selecionado do grupo consistindo em hidrogênio, halogênio, alquila, alquila substituída, arila, arila substituída, arilalquila, arilalquila substituída, acila, acila substituída, heteroalquila, heteroalquila substituída, heteroarila, heteroarila substituída, heteroarilalquila, heteroarilalquila substituída, 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), e P(O)(R⁵)(OR⁶);

20 ou alternativamente, X e/ou pelo menos um R^{1'} junto com os átomos aos quais eles são ligados formam uma arila, arila substituída, heteroarila, heteroarila substituída, cicloalquila, cicloalquila substituída, anel cicloheteroalquila ou cicloheteroalquila substituída onde o
25 anel é opcionalmente fundido a outro anel arila, arila substituída, heteroarila, heteroarila substituída, cicloalquila, cicloalquila substituída, cicloheteroalquila ou cicloheteroalquila substituída;

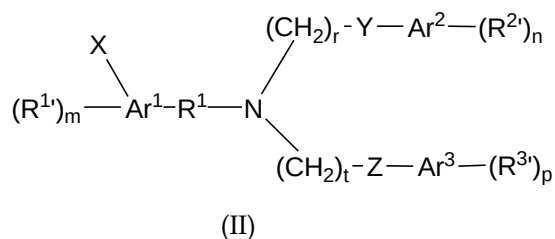
R⁴-R⁸ são independentemente selecionados do grupo
30 consistindo em hidrogênio, alquila, alquila substituída, arila, arila substituída, arilalquila, arilalquila substituída, heteroalquila, heteroalquila substituída,

heteroarila, heteroarila substituída, heteroarilalquila e heteroarilalquila substituída ou alternativamente, R^5 e R^6 , R^6 e R^7 , R^7 e R^8 , junto com os átomos aos quais eles são ligados formam um anel cicloheteroalquila ou cicloheteroalquila
5 substituída;

A e B são independentemente selecionados do grupo consistindo em hidrogênio, alquila, alquila substituída, arila, arila substituída, arilalquila, arilalquila substituída, acila, acila substituída, heteroalquila,
10 heteroalquila substituída, heteroarila, heteroarila substituída, heteroarilalquila, heteroarilalquila substituída; e

b é 0, 1, ou 2;

Em um segundo aspecto da invenção fornece Compostos de
15 Fórmula estrutural (II) mostrada abaixo:



ou um sal, hidrato, solvato ou N-óxido do mesmo, em que:

Ar^1 , Ar^2 e Ar^3 são independentemente um anel arila, heteroarila, ou cicloalquila de cinco ou seis membros;

20 m é 0, 1, 2 ou 3;

n e p são independentemente 0, 1, 2, 3 ou 4;

r e t são independentemente 0, 1 ou 2;

Y e Z são independentemente selecionados do grupo consistindo em CR^6R^7 , $\text{C}=\text{O}$, $\text{C}=\text{S}$, $\text{C}=\text{NOR}^6$, O, NR^6 , e $\text{S}(\text{O})_b$;

R^1 é selecionado do grupo consistindo em SO_2 , $C=O$, $C=S$, e $C=NOR^4$;

X pode ser selecionado do grupo consistindo em hidrogênio, alquila, alquila substituída, arila, arila substituída, arilalquila, arilalquila substituída, acila, acila substituída, heteroalquila, heteroalquila substituída, heteroarila, heteroarila substituída, heteroarilalquila, heteroarilalquila substituída, CN , NO_2 , $-OR^6$, $S(O)_bR^6$, NR^6R^7 , $CONR^6R^7$, CO_2R^6 , $NR^6CO_2R^7$, $NR^6CONR^7R^8$, $NR^6CSNR^7R^8$, $NR^6C(=NH)NR^7R^8$, $SO_2NR^5R^6$, $NR^5SO_2R^6$, $NR^5SO_2NR^6R^7$, $B(OR^5)(OR^6)$, $P(O)(OR^5)(OR^6)$, e $P(O)(R^5)(OR^6)$;

X é preferivelmente selecionado do grupo consistindo em hidrogênio, heteroalquila, heteroalquila substituída, heteroarila, heteroarila substituída, heteroarilalquila, heteroarilalquila substituída, CN , $S(O)_bR^6$, $CONR^6R^7$, $-CO_2R^6$, $SO_2NR^5R^6$, $NR^5SO_2R^6$, $NR^5SO_2NR^6R^7$, $B(OR^5)(OR^6)$, $P(O)(OR^5)(OR^6)$, e $P(O)(R^5)(OR^6)$.

cada $R^{1'}$ é independentemente selecionado do grupo consistindo em hidrogênio, halogênio, alquila, alquila substituída, arila, arila substituída, arilalquila, arilalquila substituída, acila, acila substituída, heteroalquila, heteroalquila substituída, heteroarila, heteroarila substituída, heteroarilalquila, heteroarilalquila substituída, CN , NO_2 , OR^6 , $S(O)_bR^6$, NR^6R^7 , $CONR^6R^7$, CO_2R^6 , $NR^6CO_2R^7$, $NR^6CONR^7R^8$, $NR^6CSNR^7R^8$, $NR^6C(=NH)NR^7R^8$, $SO_2NR^5R^6$, $NR^5SO_2R^6$, $NR^5SO_2NR^6R^7$, $B(OR^5)(OR^6)$, $P(O)(OR^5)(OR^6)$, e $P(O)(R^5)(OR^6)$;

cada $R^{2'}$ é independentemente selecionado do grupo consistindo em hidrogênio, halogênio, alquila, alquila substituída, arila, arila substituída, arilalquila, arilalquila substituída, acila, acila substituída,

heteroalquila, heteroalquila substituída, heteroarila, heteroarila substituída, heteroarilalquila, heteroarilalquila substituída, CN, NO₂, OR⁶, S(O)_bR⁶, NR⁶R⁷, CONR⁶R⁷, CO₂R⁶, NR⁶CO₂R⁷, NR⁶CONR⁷R⁸, NR⁶CSNR⁷R⁸, NR⁶C(=NH)NR⁷R⁸, SO₂NR⁵R⁶,
 5 NR⁵SO₂R⁶, NR⁵SO₂NR⁶R⁷, B(OR⁵)(OR⁶), e P(O)(OR⁵)(OR⁶);

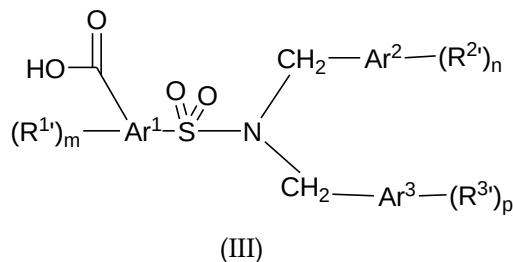
cada R^{3'} é independentemente selecionado do grupo consistindo em hidrogênio, halogênio, alquila, alquila substituída, arila, arila substituída, arilalquila, arilalquila substituída, acila, acila substituída,
 10 heteroalquila, heteroalquila substituída, heteroarila, heteroarila substituída, heteroarilalquila, heteroarilalquila substituída, 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), e
 15 P(O)(R⁵)(OR⁶);

ou alternativamente, X e/ou pelo menos um de R^{1'} junto com os átomos aos quais eles são ligados formam uma arila, arila substituída, heteroarila, heteroarila substituída, cicloalquila, cicloalquila substituída, anel
 20 cicloheteroalquila ou cicloheteroalquila substituída onde o anel é opcionalmente fundido a outro anel arila, arila substituída, heteroarila, heteroarila substituída, cicloalquila, cicloalquila substituída, cicloheteroalquila ou cicloheteroalquila substituída;

R⁴-R⁸ são independentemente hidrogênio, alquila, alquila substituída, arila, arila substituída, arilalquila, arilalquila substituída, heteroalquila, heteroalquila substituída, heteroarila, heteroarila substituída, heteroarilalquila ou heteroarilalquila substituída ou
 30 alternativamente, R⁵ e R⁶, R⁶ e R⁷, R⁷ e R⁸, junto com os átomos aos quais eles são ligados formam um anel cicloheteroalquila ou cicloheteroalquila substituída;

b é 0, 1, ou 2.

Em outro aspecto da invenção fornece Compostos tendo Fórmula estrutural (III) mostrada abaixo:



ou um sal, hidrato, solvato ou N-óxido do mesmo, em que:

Ar^1 , Ar^2 e Ar^3 são independentemente um anel arila, heteroarila, ou cicloalquila de cinco ou seis membros, e Ar^2 e Ar^3 podem opcionalmente ser omitidos;

m é 0, 1, 2 ou 3;

n e p são independentemente 0, 1, 2, 3 ou 4;

cada R^1 é independentemente selecionado do grupo consistindo em hidrogênio, halogênio, alquila, alquila substituída, arila, arila substituída, arilalquila, arilalquila substituída, acila, acila substituída, heteroalquila, heteroalquila substituída, heteroarila, heteroarila substituída, heteroarilalquila, heteroarilalquila substituída, CN, NO_2 , OR^6 , $\text{S}(\text{O})_b\text{R}^6$, NR^6R^7 , CONR^6R^7 , CO_2R^6 , $\text{NR}^6\text{CO}_2\text{R}^7$, $\text{NR}^6\text{CONR}^7\text{R}^8$, $\text{NR}^6\text{CSNR}^7\text{R}^8$, $\text{NR}^6\text{C}(=\text{NH})\text{NR}^7\text{R}^8$, $\text{SO}_2\text{NR}^5\text{R}^6$, $\text{NR}^5\text{SO}_2\text{R}^6$, $\text{NR}^5\text{SO}_2\text{NR}^6\text{R}^7$, $\text{B}(\text{OR}^5)(\text{OR}^6)$, $\text{P}(\text{O})(\text{OR}^5)(\text{OR}^6)$, e $\text{P}(\text{O})(\text{R}^5)(\text{OR}^6)$;

cada R^2 é independentemente selecionado do grupo consistindo em hidrogênio, halogênio, alquila, alquila substituída, arila, arila substituída, arilalquila, arilalquila substituída, acila, acila substituída, heteroalquila, heteroalquila substituída, heteroarila,

heteroarila substituída, heteroarilalquila, heteroarilalquila substituída, 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), e

5 P(O)(R⁵)(OR⁶);

cada R^{3'} é independentemente selecionado do grupo consistindo em hidrogênio, halogênio, alquila, alquila substituída, arila, arila substituída, arilalquila, arilalquila substituída, acila, acila substituída,

10 heteroalquila, heteroalquila substituída, heteroarila, heteroarila substituída, heteroarilalquila, heteroarilalquila substituída, 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), e

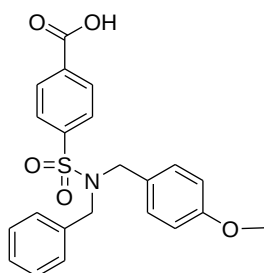
15 P(O)(R⁵)(OR⁶);

R⁵-R⁸ são independentemente hidrogênio, alquila, alquila substituída, arila, arila substituída, arilalquila, arilalquila substituída, heteroalquila, heteroalquila substituída, heteroarila, heteroarila substituída,

20 heteroarilalquila ou heteroarilalquila substituída ou alternativamente, R⁵ e R⁶, R⁶ e R⁷, R⁷ e R⁸, junto com os átomos aos quais eles são ligados formam um anel cicloheteroalquila ou cicloheteroalquila substituída;

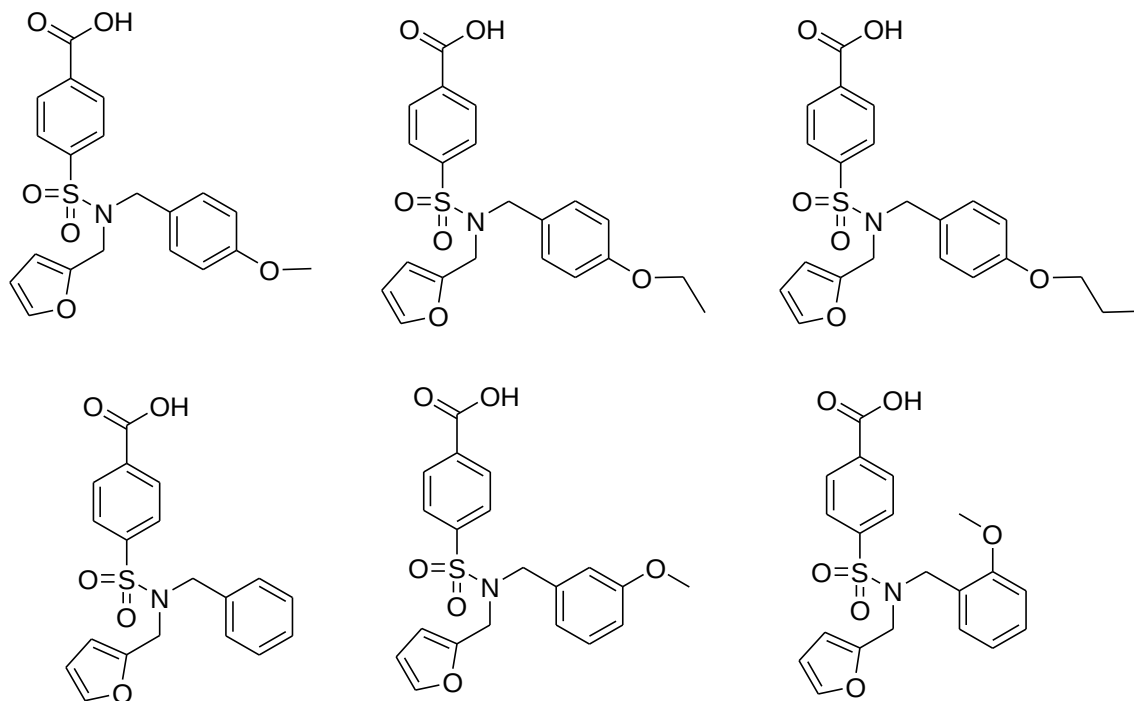
b é 0, 1, ou 2.

25 Em ainda outro aspecto da invenção fornece um Composto tendo a estrutura abaixo:



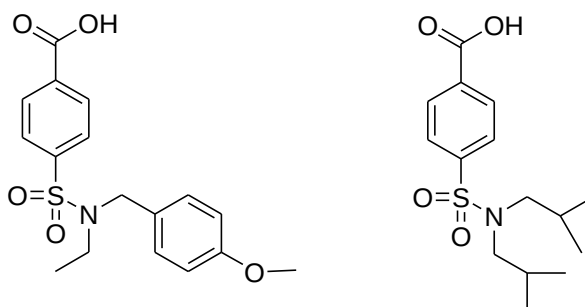
ou um sal, hidrato, solvato ou N-óxido do mesmo.

Em ainda outro aspecto da invenção fornece Compostos tendo a estrutura abaixo:



5 ou um sal, hidrato, solvato ou N-óxido do mesmo.

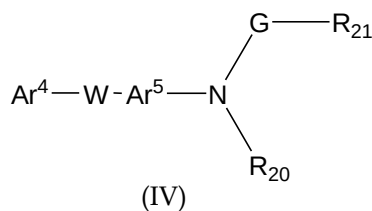
Em ainda outras modalidades, a invenção fornece Compostos tendo a estrutura abaixo:



ou um sal, hidrato, solvato ou N-óxido do mesmo.

10

Em um aspecto relacionado, um Composto de Fórmula estrutural (IV) é fornecido:



ou um sal, hidrato, solvato ou N-óxido do mesmo, em que:

Ar^4 e Ar^5 são independentemente um anel arila ou heteroarila de cinco ou seis membros;

5 W é selecionado do grupo consistindo em CR^6R^7 , $\text{C}=\text{O}$, $\text{C}=\text{S}$; $\text{C}=\text{NOR}^6$; O , NR^6 , S , SO , SO_2 , e $(\text{CH}_2)_n$;

n é 0, 1, 2, ou 3;

G é selecionado do grupo consistindo em CR^6R^7 , $\text{C}=\text{O}$, $\text{C}=\text{S}$, $\text{C}=\text{NOR}^6$, e $\text{S}(\text{O})_b$;

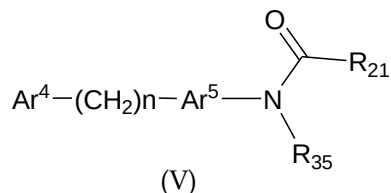
10 R^{20} é selecionado do grupo consistindo em hidrogênio, arilalquenila, heteroarilalquenila, arilalquila, heteroarilalquila, arila, heteroarila, alquila, alcóxi-alquila, alquenila, cicloalquila, cicloalquenila, e derivados substituídos;

15 R^{21} é selecionado do grupo consistindo em arilalquenila, heteroarilalquenila, arilalquila, heteroarilalquila, arila, heteroarila, alquila, alcóxi-alquila, alquenila, cicloalquila, cicloalquenila, e derivados substituídos;

R^6 e R^7 são independentemente selecionados do grupo
 20 consistindo em hidrogênio, alquila, alquila substituída, arila, arila substituída, arilalquila, arilalquila substituída, heteroalquila, heteroalquila substituída, heteroarila, heteroarila substituída, heteroarilalquila ou heteroarilalquila substituída ou alternativamente, R^6 e R^7 ,
 25 junto com os átomos aos quais eles são ligados formam um anel cicloheteroalquila ou cicloheteroalquila substituída; e

b é 0, 1, ou 2.

Em outro aspecto relacionado um Composto de Fórmula estrutural (V) é fornecido:



5 ou um sal, hidrato, solvato ou N-óxido do mesmo, em que:

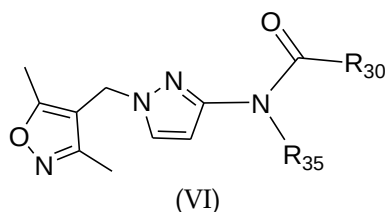
Ar⁴ e Ar⁵ são independentemente um anel arila ou heteroarila de cinco ou seis membros;

n é 0, 1, 2, ou 3;

R²¹ é selecionado do grupo consistindo em arilalquenila, heteroarilalquenila, arilalquila, hereoarilalqui, arila, heteroarila, alquila, alcóxi-alquila, alquenila, cicloalquila, cicloalquenila, e derivados substituídos;

R³⁵ é selecionado do grupo consistindo em hidrogênio, alquila, e alquila substituída.

15 Em ainda modalidades adicionais da invenção um Composto de Fórmula estrutural (VI) é fornecido



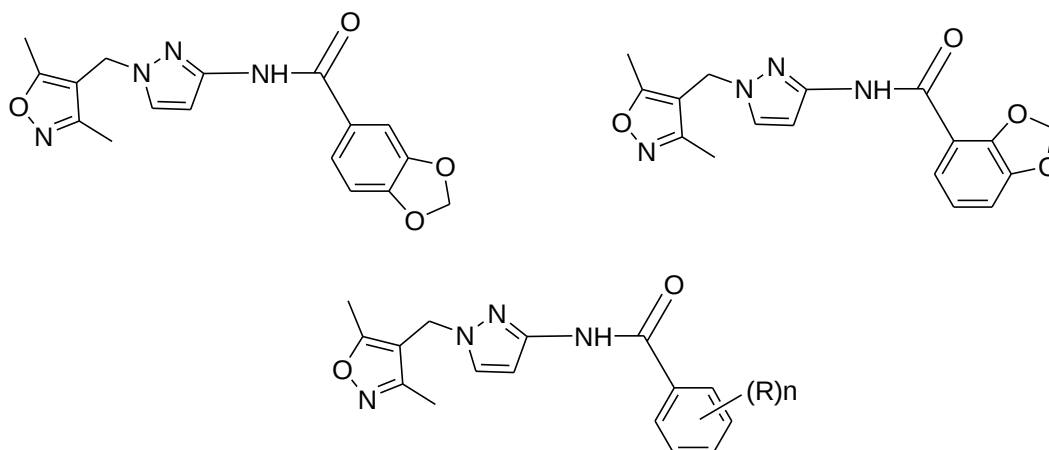
ou um sal, hidrato, solvato ou N-óxido do mesmo, em que:

R³⁰ é selecionado do grupo consistindo em arilalquenila, heteroarilalquenila, arilalquila, hereoarilalqui, arila,

heteroarila, alquila, alcóxi-alquila, alquenila, cicloalquila, cicloalquenila, e derivados substituídos;

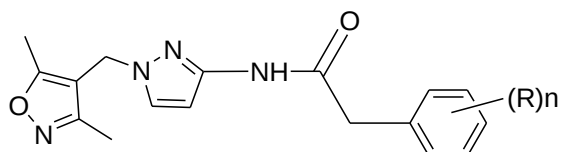
R^{35} é selecionado do grupo consistindo em hidrogênio, alquila, e alquila substituída.

- 5 Em ainda modalidades adicionais da invenção fornece Compostos tendo a estrutura abaixo:



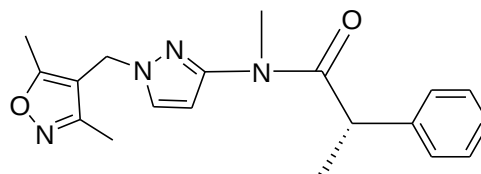
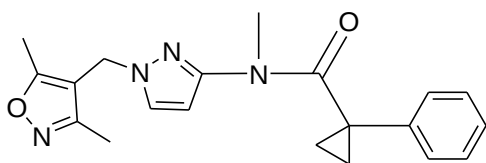
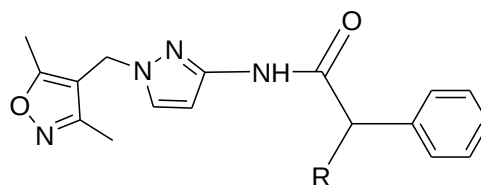
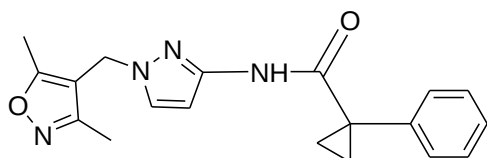
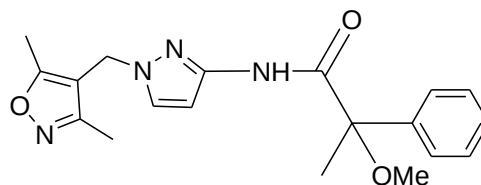
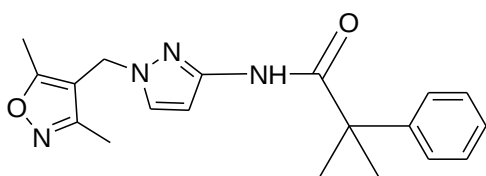
- ou um sal, hidrato, solvato ou N-óxido do mesmo, em que cada R é independentemente Cl, MeO, CN, EtO, OH, Me, -
 10 SO_2Me , F, ou H, e
 n é 0,1,2,3 ou 4.

Em ainda outras modalidades, a invenção fornece Compostos tendo a estrutura abaixo:



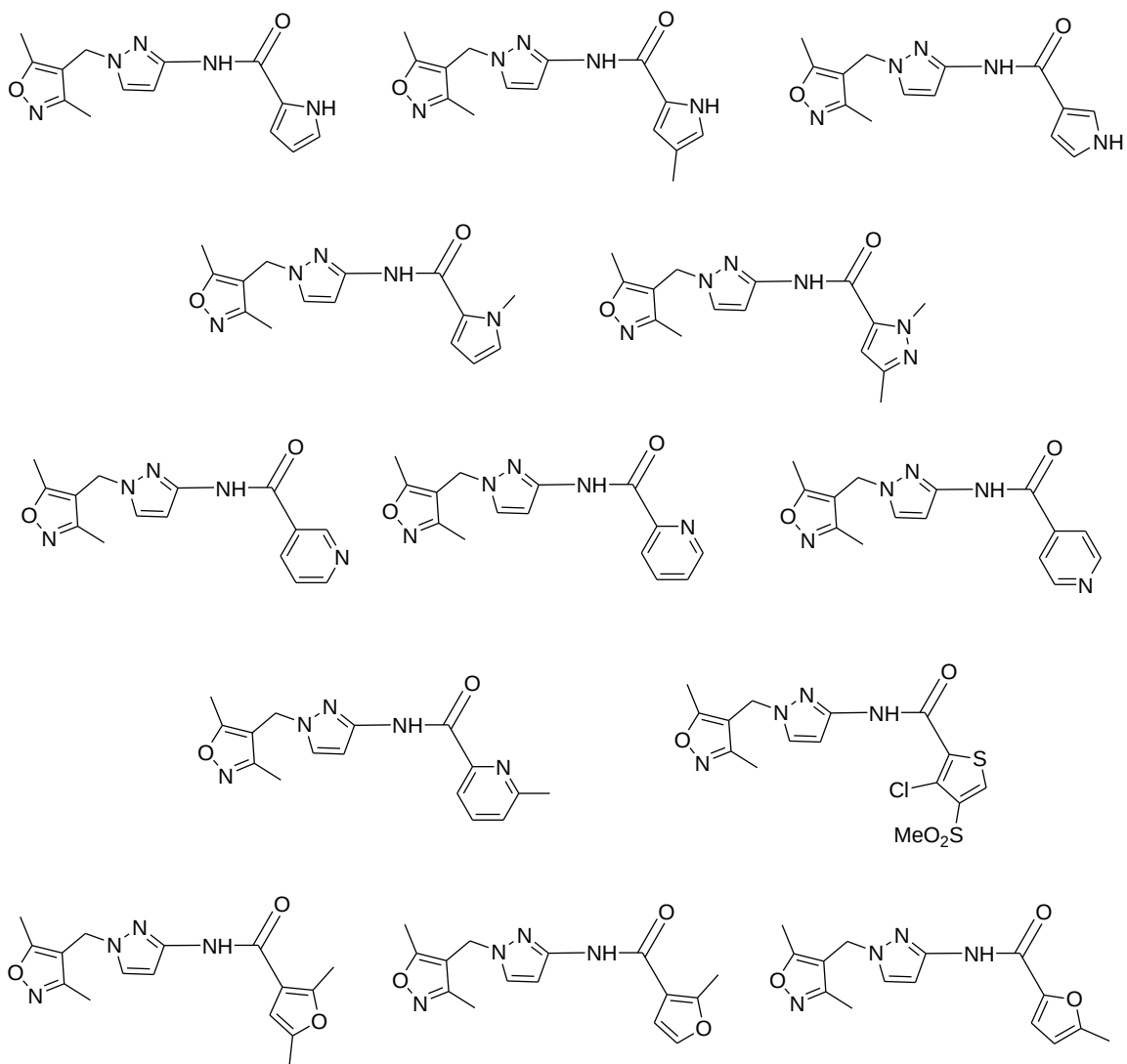
- 15 ou um sal, hidrato, solvato ou N-óxido do mesmo, em que cada R é independentemente MeO ou OH, e
 n é 0,1,2,3 ou 4.

Em ainda outras modalidades, a invenção fornece Compostos tendo a estrutura abaixo:



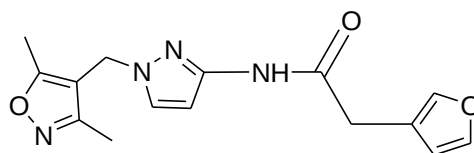
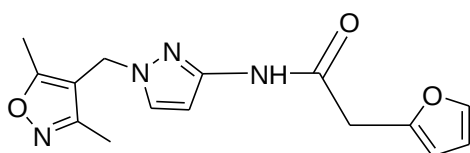
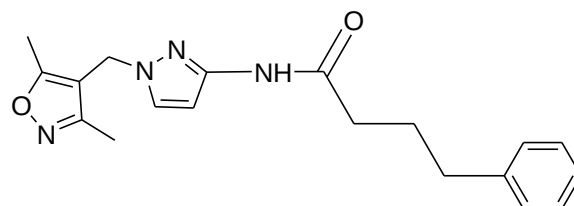
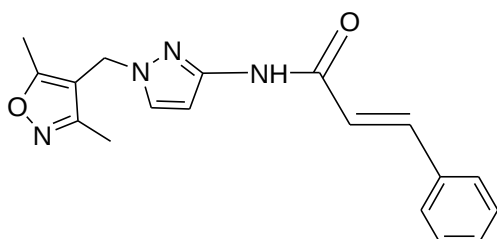
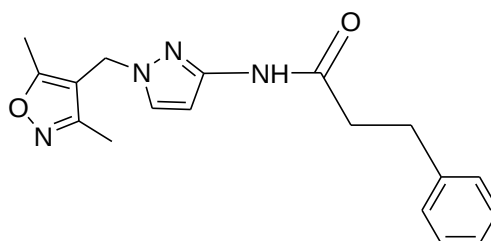
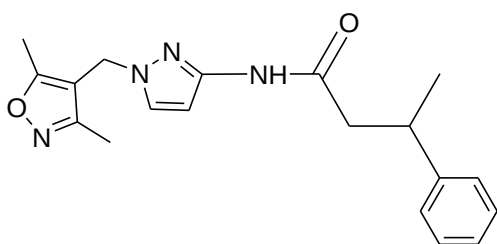
ou um sal, hidrato, solvato ou N-óxido do mesmo,
em que R é H, Me, Et, OCOMe, CH₂OH, OMe, ou Ph.

- 5 Em ainda outras modalidades, a invenção fornece
Compostos tendo a estrutura abaixo:



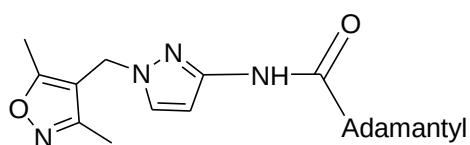
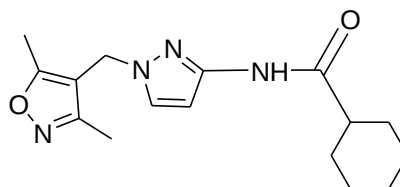
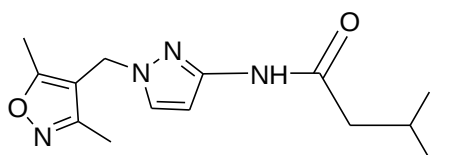
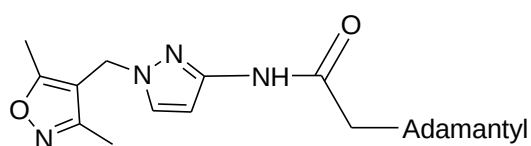
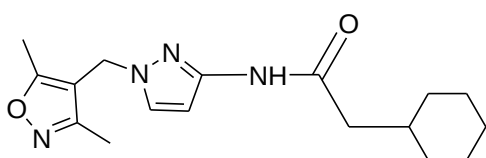
ou um sal, hidrato, solvato ou N-óxido do mesmo.

Em ainda outras modalidades, a invenção fornece Compostos tendo a estrutura abaixo:



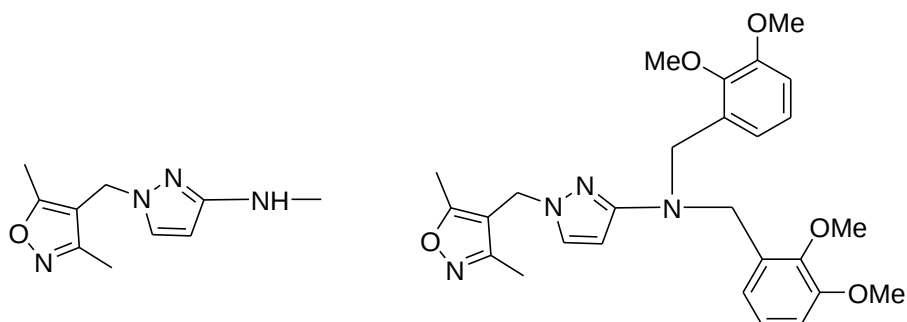
ou um sal, hidrato, solvato ou N-óxido do mesmo.

5 Em ainda outras modalidades, a invenção fornece Compostos tendo a estrutura abaixo:

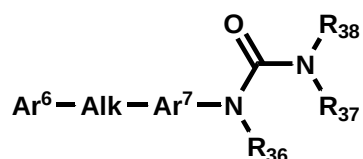


ou um sal, hidrato, solvato ou N-óxido do mesmo.

Em ainda outras modalidades, a invenção fornece Compostos tendo a estrutura abaixo:



5 Em um aspecto, a invenção refere-se a um Composto de fórmula:



ou um sal, hidrato, solvato, N-óxido ou pró-droga do mesmo,

10 em que Ar^6 e Ar^7 são, os mesmos ou diferentes independentemente um do outro, um grupo arila de cinco ou seis membros ou um grupo heteroarila de cinco ou seis membros;

Alk é um grupo alquila, opcionalmente interrompido por um heteroátomo;

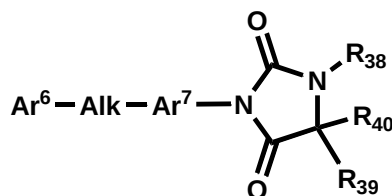
15 R_{36} e R_{37} são, os mesmos ou diferentes independentemente um do outro, H, alquila, ou, R_{36} e R_{37} , juntos com os átomos aos quais eles são ligados, formam um heterociclo de cinco ou seis membros opcionalmente substituído; e

20 R_{38} é H, alquila substituída ou não substituída, cicloalquil alquila substituída ou não substituída, heterocicloalquilalquila substituída ou não substituída, arila substituída ou não substituída, arilamidoalquila substituída ou não substituída, heteroarilamidoalquila

substituída ou não substituída, arilalquila substituída ou não substituída, arilalcóxi substituído ou não substituído, heteroarila substituída ou não substituída, heteroarilalquila substituída ou não substituída, ou haloalquila.

Em um aspecto, os compostos da invenção contém um heterociclo com cinco membros. Em uma modalidade, o heterociclo com cinco membros é uma hidantoína ou uma ureia cíclica substituída or não substituída.

Em uma modalidade, a hidantoína é uma hidantoína de fórmula:



ou um sal, hidrato, solvato, N-óxido ou sua pró-droga, em que Ar⁶ e Ar⁷ são, iguais ou diferentes independentemente uns dos outros, um grupo arila com cinco ou com seis membros ou grupo heteroarila com cinco ou seis membros;

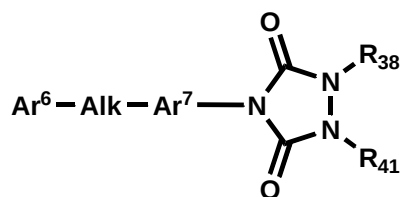
Alk é um grupo alquila, opcionalmente interrompido por um heteroátomo;

R₃₈ é H, alquila substituída ou não substituída, cicloalquilalquila substituída ou não substituída, heterocicloalquilalquila substituída ou não substituída, arila substituída ou não substituída, arilamidoalquila substituída ou não substituída, heteroarilamidoalquila substituída ou não substituída, arilalquila substituída ou não substituída, arilalcóxi substituído ou não substituído, heteroarila substituída ou não substituída, heteroarilalquila substituída ou não substituída ou haloalquila; e

R₃₉ e R₄₀ são, iguais ou diferentes independentemente uns entre os outros, H, alquila substituída ou não substituída, cicloalquilalquila substituída ou não substituída, heterocicloalquilalquila substituída ou não substituída,

arila substituída ou não substituída, arilamidoalquila substituída ou não substituída, arilalquilamidoalquila substituída ou não substituída, heteroarilamidoalquila substituída ou não substituída, heteroarilalquilamidoalquila substituída ou não substituída, arilalquila substituída ou não substituída, arialcóxi substituído ou não substituído, heteroarila substituída ou não substituída, heteroarilalquila substituída ou não substituída, haloalquila ou R_{39} e R_{40} , junto com átomo de carbono a qual são anexados, formam um grupo C=O ou um grupo alquenila substituído ou não substituído.

Em outro aspecto, os compostos da invenção contém um heterociclo com cinco membros que é um urazol. Em uma modalidade, o urazol é um urazol de fórmula:



15

ou um sal, hidrato, solvato, N-óxido ou sua pró-droga, em que Ar^6 e Ar^7 são, iguais ou diferentes independentemente uns dos outros, um grupo arila com cinco ou com seis membros ou um grupo heteroarila com cinco ou seis membros;

20

Alk é um grupo alquila, opcionalmente interrompido por um heteroátomo;

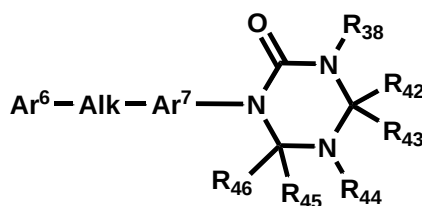
R_{38} é H, alquila substituída ou não substituída, cicloalquilalquila substituída ou não substituída, heterocicloalquilalquila substituída ou não substituída, arila substituída ou não substituída, arilamidoalquila substituída ou não substituída, heteroarilamidoalquila substituída ou não substituída, arilalquila substituída ou não substituída, arilalcóxi substituído ou não substituído, heteroarila substituída ou não substituída, heteroarilalquila substituída ou não substituída ou haloalquila; e

30

R_{41} é H, alquila substituída ou não substituída,

cicloalquilalquila substituída ou não substituída, heterocicloalquilalquila substituída ou não substituída, arila substituída ou não substituída, arilamidoalquila substituída ou não substituída, arilalquilamidoalquila substituída ou não substituída, heteroarilamidoalquila substituída ou não substituída, heteroarilalquilamidoalquila substituída ou não substituída, arilalquila substituída ou não substituída, arilalcóxi substituído ou não substituído, heteroarila substituída ou não substituída, heteroarilalquila substituída ou não substituída ou haloalquila.

Em outro aspecto, os compostos da invenção contém um heterociclo com seis membros. Em uma modalidade, o heterociclo com seis membros é um heterociclo com seis membros de fórmula:



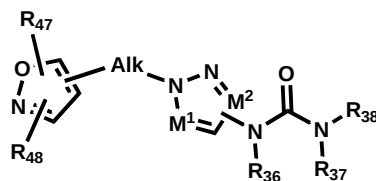
ou um sal, hidrato, solvato, N-óxido ou sua pró-droga, em que R₃₈ é H, alquila substituída ou não substituída, cicloalquilalquila substituída ou não substituída, heterocicloalquilalquila substituída ou não substituída, arila substituída ou não substituída, arilamidoalquila substituída ou não substituída, heteroarilamidoalquila substituída ou não substituída, arilalquila substituída ou não substituída, arilalcóxi substituído ou não substituído, heteroarila substituída ou não substituída, heteroarilalquila substituída ou não substituída ou haloalquila; e

R₄₂, R₄₃, R₄₄, R₄₅, e R₄₆ são, iguais ou diferentes independentemente uns dos outros, H, alquila substituída ou não substituída, cicloalquilalquila substituída ou não substituída, arilalquila substituída ou não substituída, arilalcóxi substituído ou não substituído, heteroarila substituída ou não substituída, heteroarilalquila substituída

ou não substituída ou R₄₂ e R₄₃ ou R₄₅ e R₄₆, junto com o átomo de carbono a qual cada um é anexado, formam um grupo C=O.

Em outro aspecto ainda, a invenção se refere a um composto de fórmula:

5



ou um sal, hidrato, solvato, N-óxido ou sua pró-droga,

em que Alk é um grupo alquila, opcionalmente

10 interrompido por um heteroátomo;

M¹ é N ou CR₄₉, em que R₄₉ é H ou alquila substituída ou não substituída;

M² é N ou CR₅₀, em que R₅₀ é H ou alquila substituída ou não substituída;

15 R₃₆ e R₃₇ são, iguais ou diferentes independentemente uns dos outros, H, alquila, ou, R₃₆ e R₃₇, junto com os átomos aos quais são anexados, formam um heterociclo com cinco ou seis membros opcionalmente substituídos; e

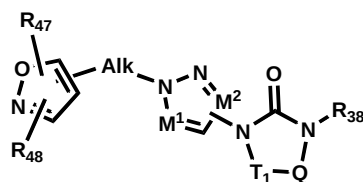
R₃₈ é H, alquila substituída ou não substituída, 20 cicloalquilalquila substituída ou não substituída, heterocicloalquilalquila substituída ou não substituída, arila substituída ou não substituída, arilamidoalquila substituída ou não substituída, heteroarilamidoalquila substituída ou não substituída, arilalquila substituída ou não substituída, 25 arilalcóxi substituído ou não substituído, heteroarila substituída ou não substituída, heteroarilalquila substituída ou não substituída ou haloalquila;

R₄₇ é H, alquila substituída ou não substituída, alcóxi substituído ou não substituído, arila substituída ou não substituída, 30 arilalquila substituída ou não substituída ou halo; e

R₄₈ é H, alquila substituída ou não substituída, alcóxi substituído ou não substituído, arila substituída ou não substituída, 35 arilalquila substituída ou não substituída ou halo.

Em outro aspecto ainda, a invenção se refere a um

composto de fórmula:



ou um sal, hidrato, solvato, N-óxido ou sua pró-droga, em que Alk é um grupo alquila, opcionalmente interrompido por um heteroátomo;

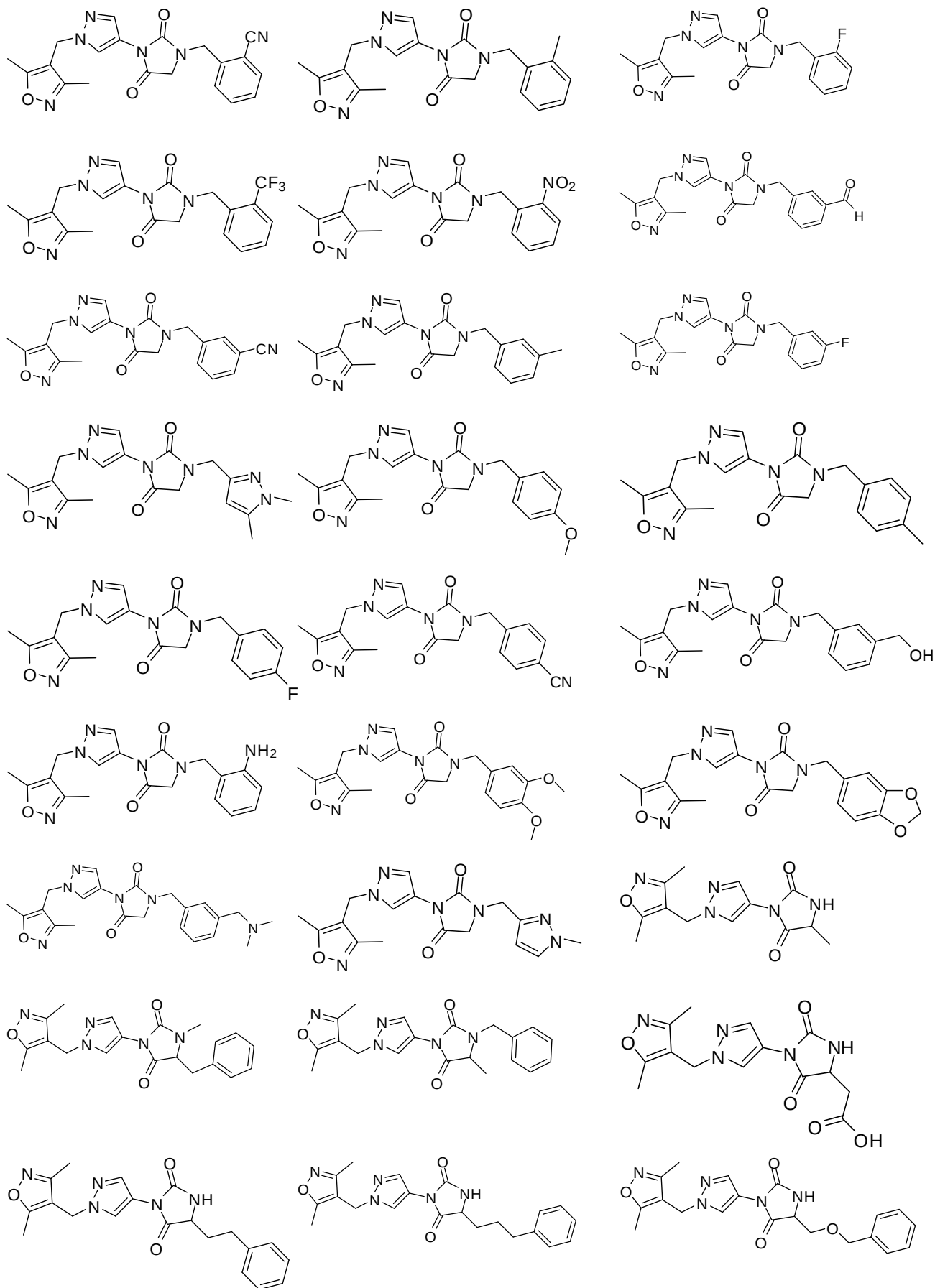
T₁ é C=O e Q é CR₅₁R₅₂ ou NR₅₁, em que R₅₁ e R₅₂ são, iguais ou diferentes independentemente uns dos outros, H, alquila substituída ou não substituída, cicloalquilalquila substituída ou não substituída, heterocicloalquilalquila substituída ou não substituída, arila substituída ou não substituída, arilamidoalquila substituída ou não substituída, arilalquilaamidoalquila substituída ou não substituída, heteroarilamidoalquila substituída ou não substituída, heteroarilalquilaamidoalquila substituída ou não substituída, arilalquila substituída ou não substituída, arilalcóxi substituído ou não substituído, heteroarila substituída ou não substituída, heteroarilalquila substituída ou não substituída, haloalquila, ou R₅₁ e R₅₂, junto com o átomo de carbono ao qual são anexados, formam um grupo C=O ou um grupo alquenila substituído ou não substituído;

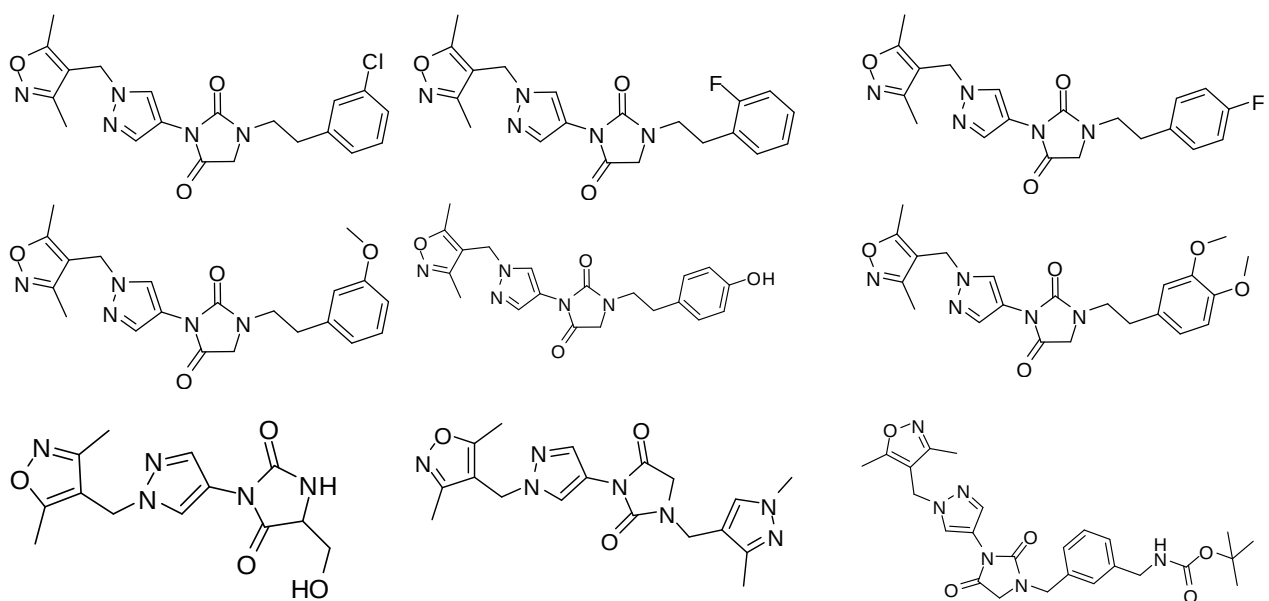
M¹ é N ou CR₄₉, em que R₄₉ é H ou alquila substituída ou não substituída;

M² é N ou CR₅₀, em que R₅₀ é H ou alquila substituída ou não substituída;

R₃₈ é H, alquila substituída ou não substituída, cicloalquilalquila substituída ou não substituída, heterocicloalquilalquila substituída ou não substituída, arila substituída ou não substituída, arilamidoalquila substituída ou não substituída, heteroarilamidoalquila substituída ou não substituída, arilalquila substituída ou não substituída, arilalcóxi substituído ou não substituído, heteroarila substituída ou não substituída, heteroarilalquila substituída ou não substituída ou haloalquila;

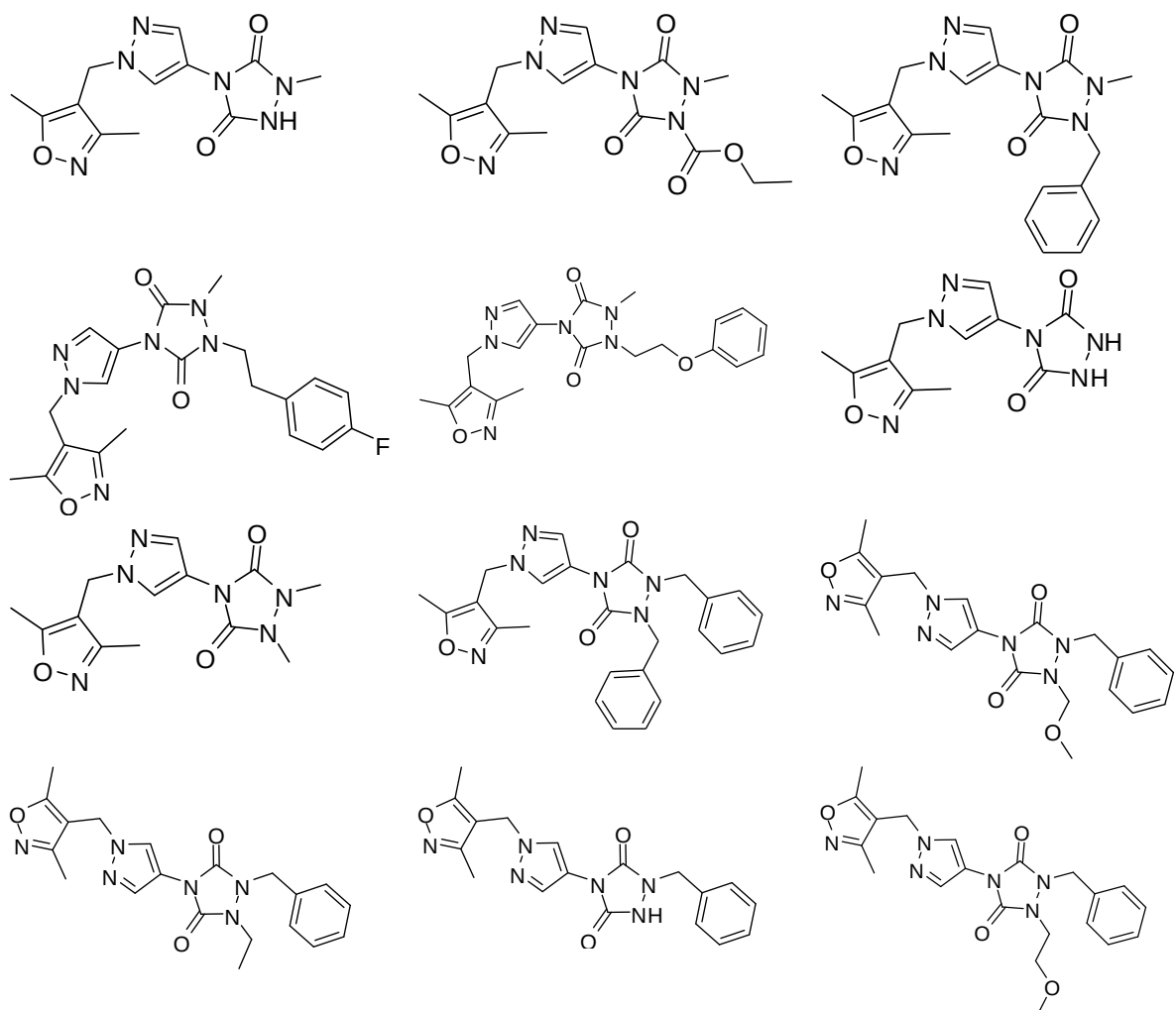
R₄₇ é H, alquila substituída ou não substituída, alcóxi

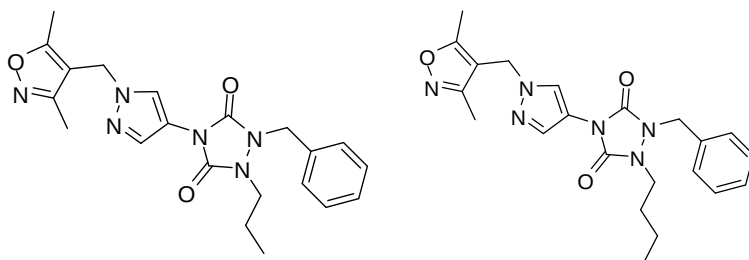




ou um sal, hidrato, solvato, N-óxido ou sua pró-droga.

Em outro aspecto ainda, a invenção se refere a um composto de fórmula:

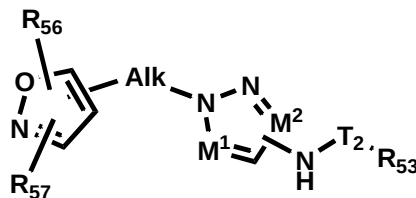




ou um sal, hidrato, solvato, N-óxido ou sua pró-droga.

Em outro aspecto ainda, a invenção se refere a um método de fabricação de um composto de fórmula:

5



ou um sal, hidrato, solvente, N-óxido ou pró-droga do mesmo,

10 onde Alk é um grupo alquila, opcionalmente interrompido por um heteroátomo;

T₂ é C=S, C=O, ou S(O)₂;

15 R₅₃ é alquila substituída ou não substituída, cicloalquila substituída ou não substituída, heteroarila substituída ou não substituída, arila substituída ou não substituída, ou arilalquila substituída ou não substituída;

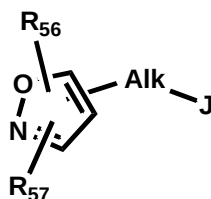
M¹ é N ou CR₅₄, onde R₅₄ é H ou alquila substituída ou não substituída;

M² é N ou CR₅₅, onde R₅₅ é H ou alquila substituída ou não substituída;

20 R₅₆ é H, alquila substituída ou não substituída, alcóxi substituído ou não substituído, arila substituída ou não substituída, arilalquila substituída ou não substituída, ou haleto; e

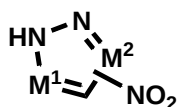
25 R₅₇ é H, alquila substituída ou não substituída, alcóxi substituído ou não substituído, arila substituída ou não substituída, arilalquila substituída ou não substituída, ou haleto;

onde o método compreende reagir um composto da fórmula:

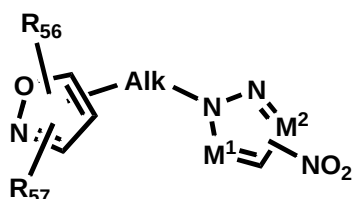


onde R₅₆, R₅₇, e Alquila são definidos acima e J é um grupo de partida;

5 com um composto da fórmula:



onde M¹ e M² são definidos acima para resultar em um composto da fórmula



10 com um grupo NO₂;

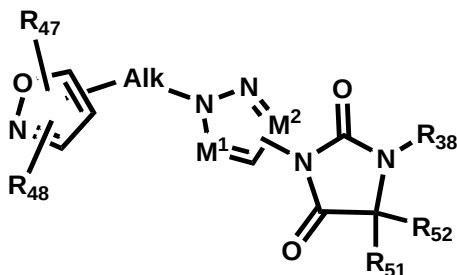
reduzindo o grupo NO₂ para fornecer um composto com um grupo NH₂; e

reagir o composto com um grupo NH₂ com um composto da fórmula



onde J₂ é um grupo de partida e T₂ e R₅₃ são definidos acima.

Em ainda outro aspecto, a invenção se refere a um método de fabricar um composto da fórmula:



20

ou um sal, hidrato, solvente, N-óxido ou pró-droga do mesmo,

onde Alquila é um grupo alquila, opcionalmente interrompida por um heteroátomo;

R₅₁ e R₅₂ são, o mesmo ou diferente independentemente um do outro, H, alquila substituída ou não substituída, 5 cicloalquil alquila substituída ou não substituída, heterocicloalquilaalquila substituída ou não substituída, arila substituída ou não substituída, arilamidoalquila substituída ou não substituída, arilalquilaamidoalquila substituída ou não substituída, heteroarilaamidoalquila 10 substituída ou não substituída, heteroarilalquilaamidoalquila substituída ou não substituída, arilalquila substituída ou não substituída, arilalcóxi substituído ou não substituído, heteroarila substituída ou não substituída, heteroarilalquila substituída ou não substituída, haloalquila, ou R₅₁ e R₅₂, 15 junto com o átomo de carbono ao qual são fixado, formam um grupo alquenila substituído ou não substituído;

M¹ é N ou CR₄₉, onde R₄₉ é H ou alquila substituída ou não substituída;

M² é N ou CR₅₀, onde R₅₀ é H ou alquila substituída ou não 20 substituída;

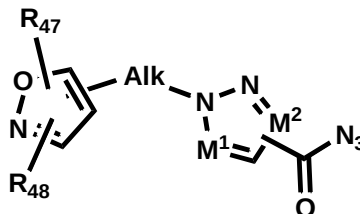
R₃₈ é H, alquila substituída ou não substituída, cicloalquil alquila substituída ou não substituída, heterocicloalquilaalquila substituída ou não substituída, arila substituída ou não substituída, arilaamidoalquila 25 substituída ou não substituída, heteroarilaamidoalquila substituída ou não substituída, arilalquila substituída ou não substituída, arilalcóxi substituído ou não substituído, heteroarila substituída ou não substituída, heteroarilalquila substituída ou não substituída, ou haloalquila;

30 R₄₇ é H, alquila substituída ou não substituída, alcóxi substituído ou não substituído, arila substituída ou não substituída, arilalquila substituída ou não substituída, ou haleto; e

R₄₈ é H, alquila substituída ou não substituída, alcóxi 35 substituído ou não substituído, arila substituída ou não substituída, arilalquila substituída ou não substituída, ou

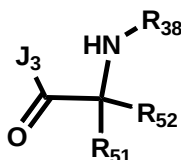
haletos;

onde o método compreende aquecer um composto da fórmula:



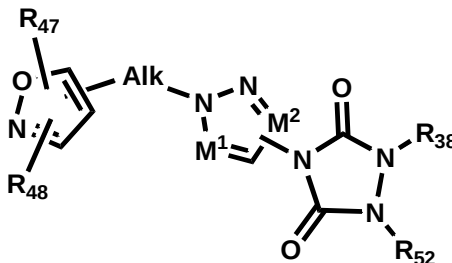
onde R₄₇, R₄₈, Alquila, M¹, e M² são definidos acima;

- 5 para converter o -Grupo CON₃ para um grupo -N=C=O, e então reagir com um composto da fórmula:



onde J₃ é um grupo de partida e R₃₈, R₅₁, e R₅₂ são definidos acima.

- 10 Em ainda outro aspecto, a invenção se refere a um método de fabricar um composto da fórmula:



ou um sal, hidrato, solvente, N-óxido ou pró-droga do mesmo,

- 15 onde Alquila é um grupo alquila, opcionalmente interrompida por um heteroátomo;

- R₅₂ é H, alquila substituída ou não substituída, cicloalquil alquila substituída ou não substituída, heterocicloalquilaalquila substituída ou não substituída, arila substituída ou não substituída, arilaamidoalquila substituída ou não substituída, arilalquilaamidoalquila substituída ou não substituída, heteroarilaamidoalquila substituída ou não substituída, heteroarilalquilaamidoalquila substituída ou não substituída, arilalquila substituída ou
25 não substituída, arilalcóxi substituído ou não substituído,

heteroarila substituída ou não substituída, heteroarilalquila substituída ou não substituída, haloalquila;

M^1 é N ou CR_{49} , onde R_{49} é H ou alquila substituída ou não substituída;

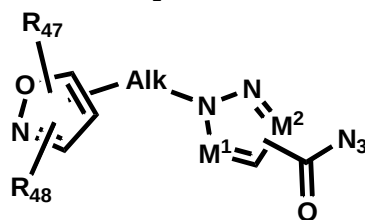
5 M^2 é N ou CR_{50} , onde R_{50} é H ou alquila substituída ou não substituída;

R_{38} é H, alquila substituída ou não substituída, cicloalquil alquila substituída ou não substituída, heterocicloalquilaalquila substituída ou não substituída, 10 arila substituída ou não substituída, arilaamidoalquila substituída ou não substituída, heteroarilaamidoalquila substituída ou não substituída, arilalquila substituída ou não substituída, arilalcóxi substituído ou não substituído, heteroarila substituída ou não substituída, heteroarilalquila 15 substituída ou não substituída, ou haloalquila;

R_{47} é H, alquila substituída ou não substituída, alcóxi substituído ou não substituído, arila substituída ou não substituída, arilalquila substituída ou não substituída, ou haleto; e

20 R_{48} é H, alquila substituída ou não substituída, alcóxi substituído ou não substituído, arila substituída ou não substituída, arilalquila substituída ou não substituída, ou haleto;

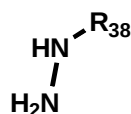
onde o método compreende aquecer um composto da fórmula:



25

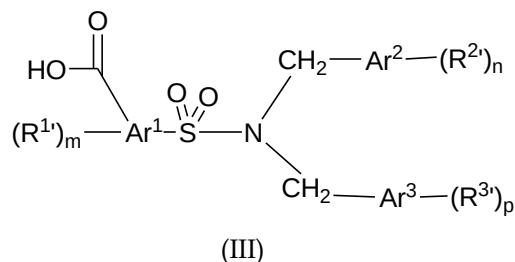
onde R_{47} , R_{48} , Alquila, M^1 , e M^2 são definidos acima;

para converter o -Grupo CON_3 para um grupo $-N=C=O$, e então reagir com a hidrazina da fórmula:



30 onde R_{38} é definido acima.

Em ainda outro aspecto, a invenção se refere a um método de fabricar um composto da fórmula:



ou um sal, hidrato, solvente ou N-óxido do mesmo onde:

Ar¹, Ar² e Ar³ são independentemente arila com cinco ou seis membros, anel de heteroarila, ou cicloalquila, e Ar² e Ar³ podem opcionalmente ser omitidas;

m é 0, 1, 2 ou 3;

n e p são independentemente 0, 1, 2, 3 ou 4;

cada R^{1'} é independentemente selecionado do grupo que consiste em hidrogênio, halogênio, alquila, substituído alquila, arila, arila substituída, arilalquila, arilalquila substituída, acila, acila substituída, heteroalquila, heteroalquila substituída, heteroarila, heteroarila substituída, heteroarilalquila, heteroarilalquila substituída, 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), e P(O)(R⁵)(OR⁶);

cada R^{2'} é independentemente selecionado do grupo que consiste em hidrogênio, halogênio, alquila, alquila substituída, arila, arila substituída, arilalquila, arilalquila substituída, acila, acila substituída, heteroalquila, heteroalquila substituída, heteroarila, heteroarila substituída, heteroarilalquila, heteroarilalquila substituída, 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), e P(O)(R⁵)(OR⁶);

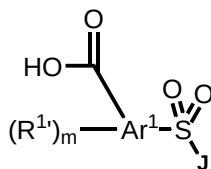
cada R^{3'} é independentemente selecionado do grupo que consiste em hidrogênio, halogênio, alquila, alquila

substituída, arila, arila substituída, arilalquila, arilalquila substituída, acila, acila substituída, heteroalquila, heteroalquila substituída, heteroarila, heteroarila substituída, heteroarilalquila, heteroarilalquila substituída, 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), e P(O)(R⁵)(OR⁶);

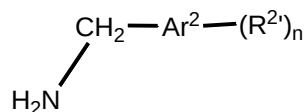
R⁵-R⁸ são independentemente hidrogênio, alquila, alquila substituída, arila, arila substituída, arilalquila, arilalquila substituída, heteroalquila, heteroalquila substituída, heteroarila, heteroarila substituída, heteroarilalquila ou heteroarilalquila substituída ou alternativamente, R⁶ e R⁷, R⁷ e R⁸, junto com os átomos aos quais são ligados formam um anel de cicloheteroalquila ou cicloheteroalquila substituída;

b é 0, 1, ou 2;

onde o método compreende reagir um composto da fórmula:

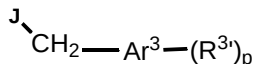


onde J é um grupo de partida;
com um composto da fórmula:



para fornecer um produto; e

reagir o produto com um composto da fórmula:



onde J é um grupo de partida.

SEQUÊNCIA DE PROTEÍNA G QUIMÉRICA E GENES ht2R E POLIPEPTÍDEOS

Sequência de proteína of the Etiqueta de Rodopsina: (SEQ

ID NO:1)

MNGTEGPNFYVPFSNKTGVVRSPFEAPQYYLAEPW

Sequência de proteína de Gl6gust44: (SEQ ID NO:2)

MARSLTWRCPPWCLTEDEKAAARVDQEINRILLEQKKQDRGELKLLLLGPGESGKS
TFIKQMRIIHGAGYSEEERKGRPLVYQNI FVSMRAMIEAMERLQIPFSRPESKHHASLVM
5 SQDPYKVTTFEKRYAAAAMQWLWRDAGIRACYERRREFHLLDSAVYYLSHLERITEEGYVPT
AQDVLRSRMPTTGINEYCFVSQKTNLRIVDVGGQKSERKKWIHCFENVIALIYLASLSEYD
QCLEENNQENRMKESLALFGTILELPWFKSTSVILFLNKTDILEEKIPTSHLATYFPSFQG
PKQDAEAAKRFILDMYTRMYTGCVDGPEGSNLKKEDKEIYSHMTCATDTQNVKFVFDVTD
IIIKENLKDCLF

10 ht2R8 sequências:

DNA- (SEQ ID NO:3)

ATGTTTCAGTCCTGCAGATAACATCTTTATAATCCTAATAACTGGAGAATTCATACT
AGGAATATTGGGGAATGGATACAT

TGCACTAGTCAACTGGATTGACTGGATTAAGAAGAAAAGATTTCCACAGTTGACT
15 ACATCCTTACCAATTTAGTTATCG

CCAGAATTTGTTTGATCAGTGTAATGGTTGTAAATGGCATTGTAATAGTACTGAAC
CCAGATGTTTATACAAAAAATAAA

CAACAGATAGTCATTTTTACCTTCTGGACATTTGCCAACTACTTAAATATGTGGAT
TACCACCTGCCTTAATGTCTTCTA

20 TTTTCTGAAGATAGCCAGTTCCTCTCATCCACTTTTTCTCTGGCTGAAGTGGAAAA
TTGATATGGTGGTGCCTGGATCC

TGCTGGGATGCTTTGCCATTTCTTGTGGTCAGCCTTATAGCAGCAATAGTACTG
AGTTGTGATTATAGGTTTCATGCA

ATTGCCAAACATAAAAGAAACATTACTGAAATGTTCCATGTGAGTAAAATACCATA
25 CTTTGAACCCTTaACTCTCTTTAA

CCTGTTTGCAATTGTCCCATTTATTGTGTCACTGATATCATTTTTCTTTTAGTAA
GATCTTTATGGAGACATACCAAGC

AAATAAACTCTATGCTACCGGCAGTAGAGACCCAGCACAGAAGTTCATGTGAGA
GCCATTAAACTATGACTTCATTT

30 ATCTTCTTTTTTTTCTATACTATATTTCTTCTATTTTGATGACCTTTAGCTATCT
TATGACAAAATACAAGTTAGCTGT

GGAGTTTGGAGAGATTGCAGCAATTCTCTACCCCTTGGGTCACCTCACTTATTTTAA
TTGTTTTAAATAATAAACTGAGGC

AGACATTTGTCAGAAATGCTGACATGTAGAAAAATTGCCTGCATGATATGA

35 Proteína- (SEQ ID NO:4)

MFSPADNIFIILITGEFILGILNGYIALVNWIDWIKKKKISTVDYIILTNLVIARI

CLISVMVVGIVIVLNPVYTKNK

QQIVIFTFWTFANYLNMWITTCLNVFYFLKIASSSHPLFLWLKWKIDMVVHWILLG
CFAISLLVSLIAAIVLSCDYRFHA

IAKHKRNITEMFHVSKIPIYFEPLTLFNLFAIVPFIVSLISFFLLVRSLWRHTKQIK

5 LYATGSRDPSTEVHVRAIKTMTSF

IFFFFLYYISSILMTFSYLMTKYKLAVEFGEIAAILYPLGHSLILIVLNNKLRQTF
VRMLTCRKIACMI

ht2R14 sequências:

DNA- (SEQ ID NO:5)

10 ATGGGTGGTGTGCATAAAGAGCATATTTACATTCGTTTTAATTGTGGAATTTATAATTGGAA
ATTTAGGAAATAGTTTCAT

AGCACTGGTGAAGTGTATTGACTGGGTCAAGGGAAGAAAGATCTCTTCGGTTGATC
GGATCCTCACTGCTTTGGCAATCT

CTCGAATTAGCCTGGTTTGGTTAATATTCGGAAGCTGGTGTGTGTCTGTGTTTTTC
15 CCAGCTTTATTTGCCACTGAAAAA

ATGTTCAGAATGCTTACTAATATCTGGACAGTGATCAATCATTTTAGTGTCTGGTT
AGCTACAGGCCTCGGTACTTTTTTA

TTTTCTCAAGATAGCCAATTTTTCTAACTCTATTTTTCTCTACCTAAAGTGGAGaG
TTAAAAAGGTGGTTTTGGTGCTGC

20 TTCTTGTGACTTCGGTCTTCTTGTTTTTAAATATTGCACTGATAAACATCCATATA
AATGCCAGTATCAATGGATACAGA

AGAAACAAGACTTGCAGTTCTGATTCAAGTAACTTTACACGATTTTCCAGTCTTAT
TGTATTAACCAGCACTGTGTTCAT

TTTCATACCCTTTACTTTGTCCCTGGCAATGTTTCTTCTCCTCATCTTCTCCATGT
25 GGAAACATCGCAAGAAGATGCAGC

ACACTGTCAAAATATCCGGAGACGCCAGCACCAAAGCCCACAGAGGAGTTAAAAGT
GTGATCACTTTCTTCCTACTCTAT

GCCATTTTCTCTCTGTCTTTTTTTCATATCAGTTTGGACCTCTGAAAGGTTGGAGGA
AAATCTAATTATTCTTTCCCAGGT

30 GATGGGAATGGCTTATCCTTCATGTCACTCATGTGTTCTGATTCTTGAAACAAGA
AGCTGAGACAGGCCTCTCTGTCAG

TGCTACTGTGGCTGAGGTACATGTTCAAAGATGGGGAGCCCTCAGGTCACAAAGAA
TTAGAGAATCATCTTGA

Proteína- (SEQ ID NO:6)

35 MGGVIKSIFTFVLIVEFIIGNLGNFIALVNCIDWVKGRKISSVDRILTALAISRI
SLVWLIFGSWCVSVFFPALFATEK

MFRMLTNIWTVINHFSVWLATGLGTFYFLKIANFSNSIFLYLKWRVKKVVLVLLLV
TSVFLFLNIALINIHINASINGYR

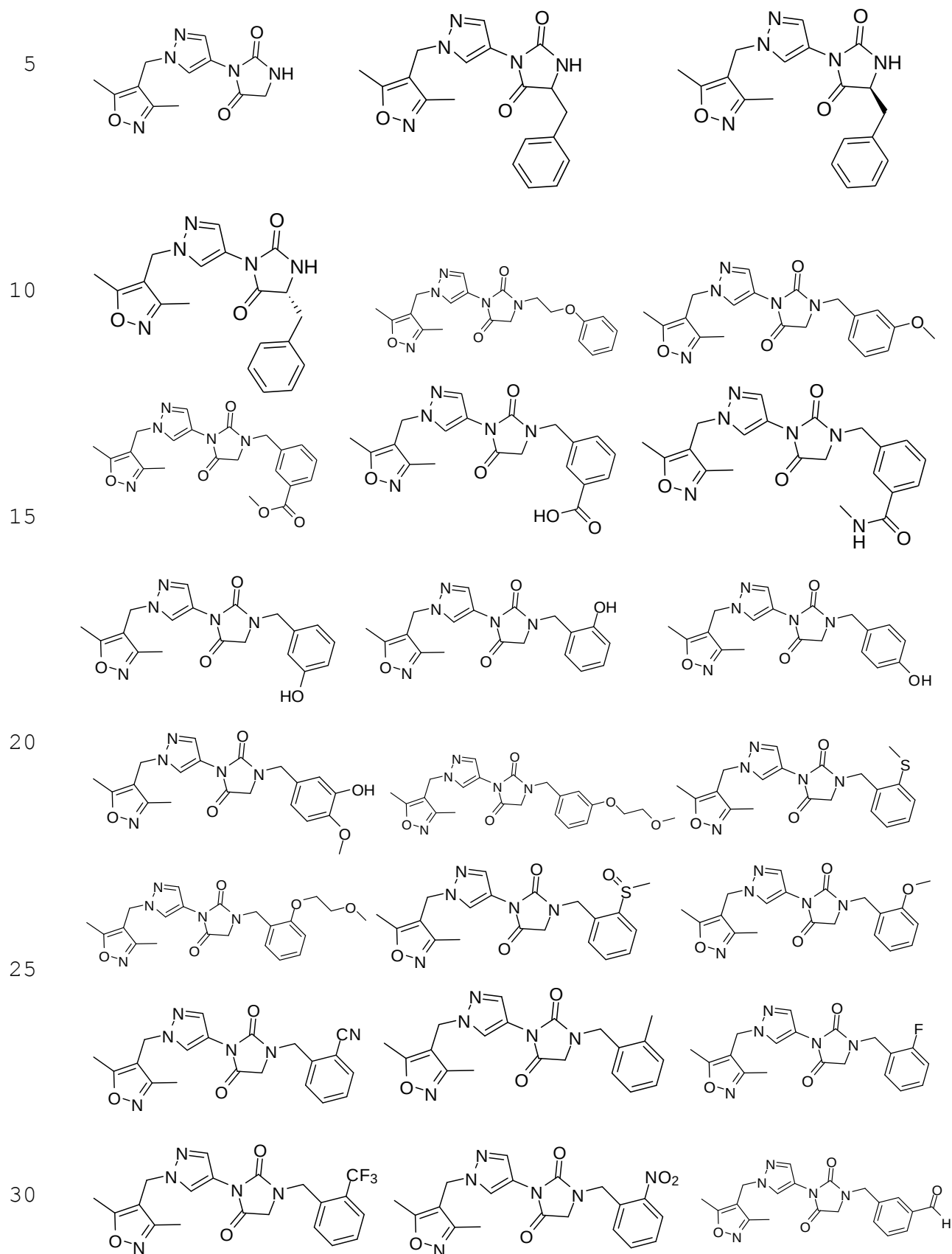
RNKTCSSDSSNFTRFSSLIVLTSTVFIFIPFTLSLAMFLLLIIFSMWKHRKKMQHTV
KISGDASTKAHRGVKSVITFFLLY

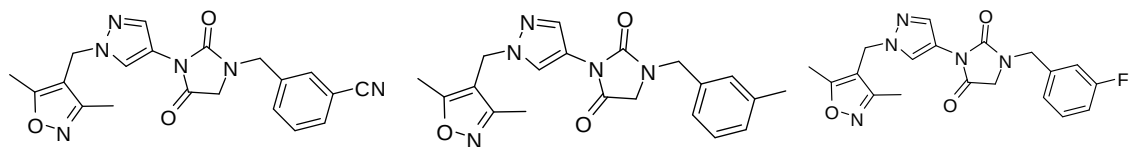
5 AIFSLSFFISVWTSERLEENLIILSQVMGMAYPSCHSCVLILGNKKLRQASLSVLL
WLRYMFKDGEPSGHKEFRESS

Embora a descrição detalhada acima tenha descrito várias
modalidades da presente invenção, é preciso entender que a
descrição acima é meramente ilustrativa e não limita a
10 invenção divulgada. A invenção deve ser limitada pelas
reivindicações que a seguir.

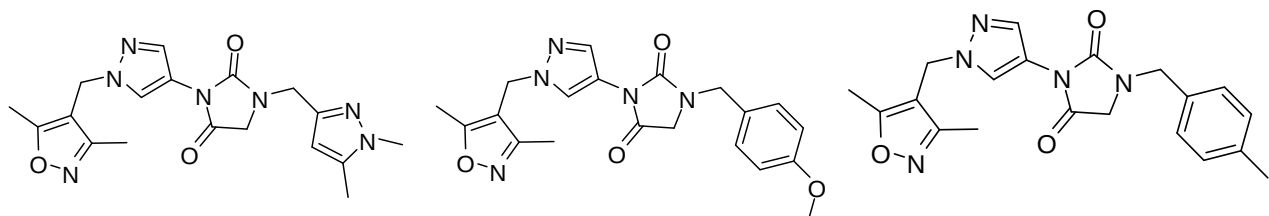
REIVINDICAÇÕES

1.Composto **caracterizado** pelo fato de apresentar a fórmula:

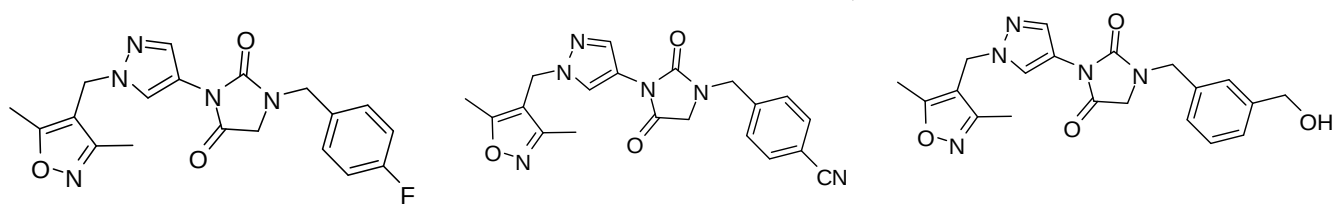




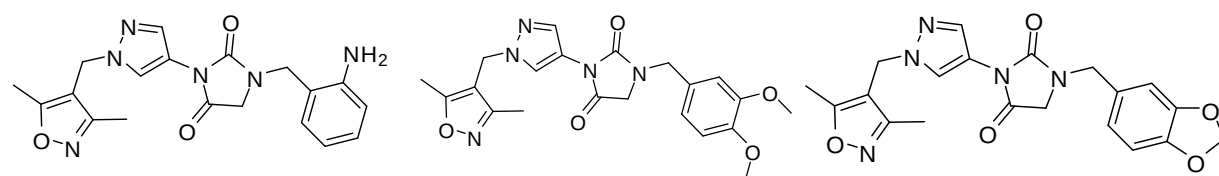
5



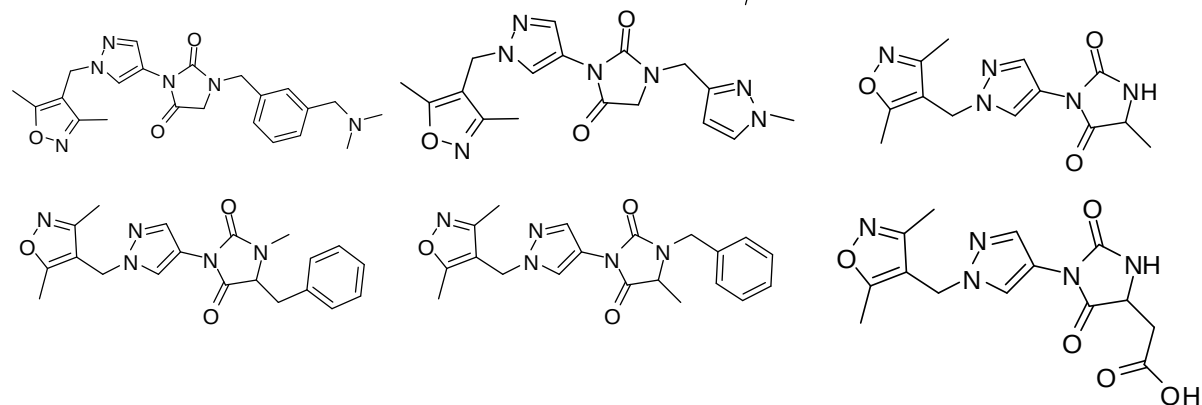
10



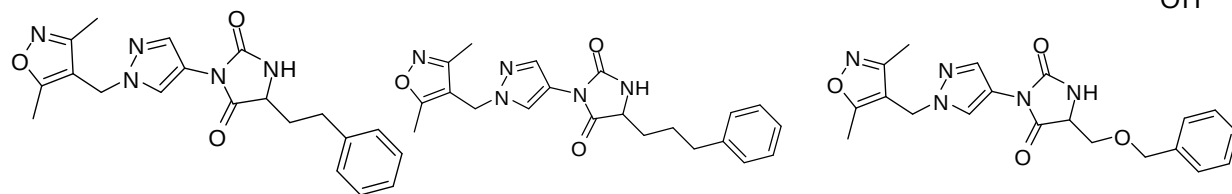
15



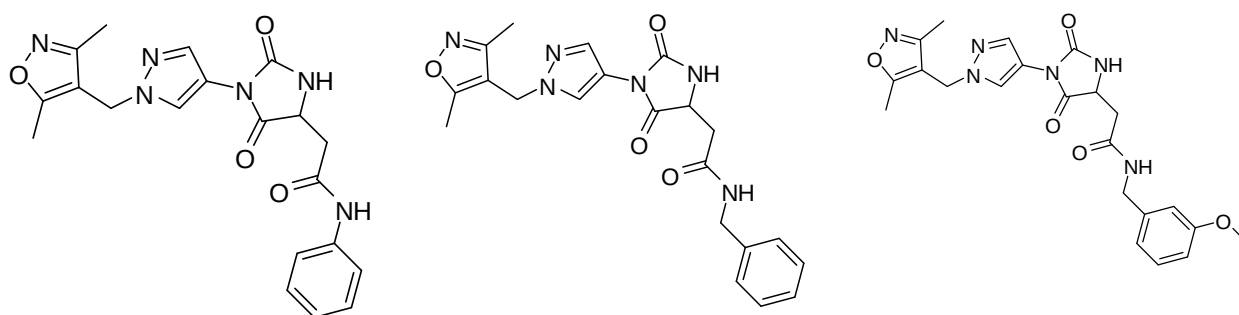
20



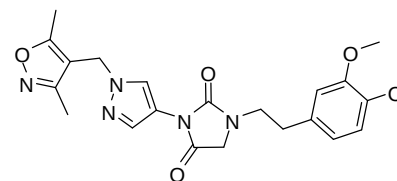
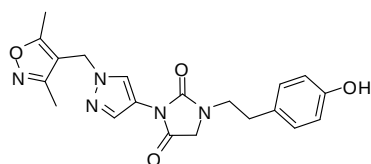
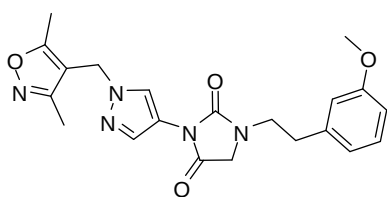
25



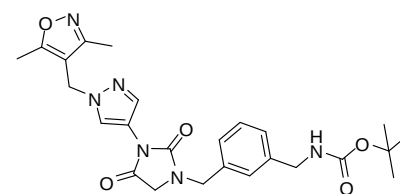
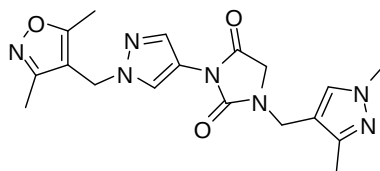
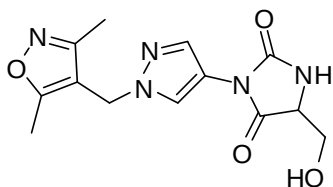
30



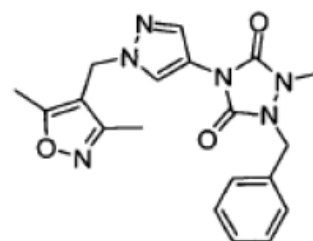
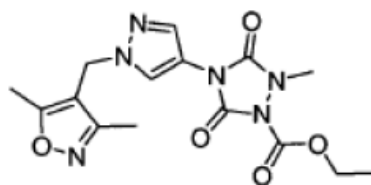
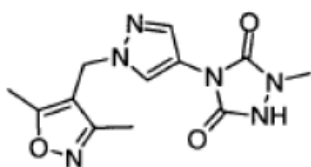




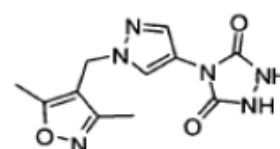
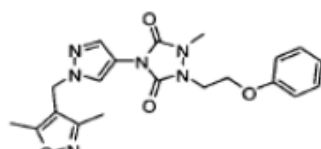
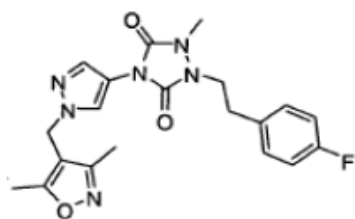
5



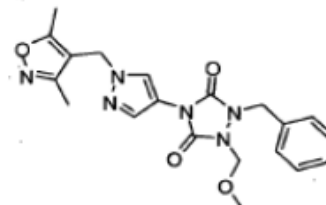
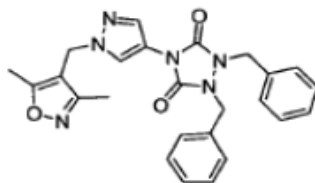
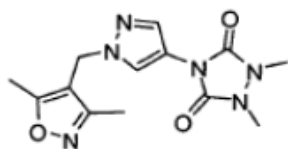
10 2.Composto, de acordo com a reivindicação 1,
caracterizado pelo fato de apresentar a fórmula:



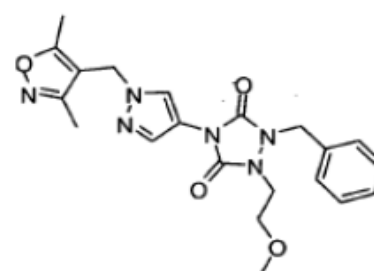
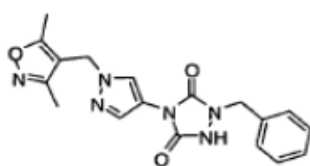
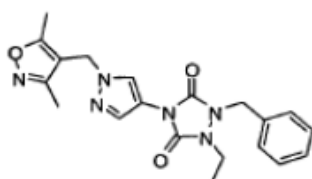
15



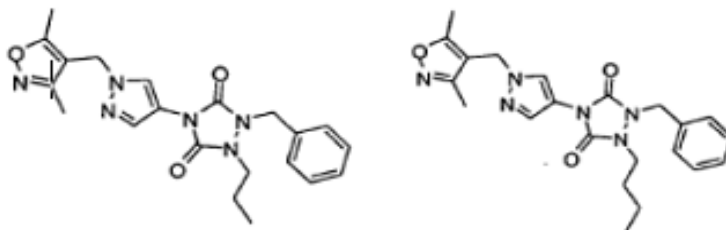
20



25



30



5

3. Método de redução ou alívio do sabor amargo em uma composição **caracterizado** por compreender a adição de pelo menos um composto, conforme definido na reivindicação 1 ou 2, à composição para ingestão por humanos ou animais em uma concentração efetiva para aliviar ou reduzir o sabor amargo associado com a composição, em que a concentração de pelo menos um composto é de 0,1 ppm a 100 ppm.

4. Método, de acordo com a reivindicação 3, **caracterizado** pelo fato de que a concentração de pelo menos um composto é de 1 ppm até 25 ppm.

5. Método, de acordo com a reivindicação 3, **caracterizado** pelo fato de que a composição é um alimento, bebida ou medicamento.

6. Método, de acordo com a reivindicação 3, **caracterizado** pelo fato de que a composição contém compostos amargos que ativam um ou mais de hT2R3, 7, 10, 14, 16, 44, 51, 55, 61, 63, 65, 71 e/ou hT2R5, 9, 13, 54, 67 e 75.

7. Método, de acordo com a reivindicação 3, **caracterizado** pelo fato de que a composição é um café ou uma composição com sabor café.

8. Método, de acordo com a reivindicação 7, **caracterizado** pelo fato de que a composição compreende pelo menos dois compostos, pelo menos um dos quais é um

antagonista hT2R8 e pelo menos um deles é um antagonista hT2R14.

9. Método, de acordo com a reivindicação 7, **caracterizado** pelo fato de que o café ou a composição com
5 sabor café é um café instantâneo ou café moído.

10. Composição de alimento, bebida ou medicamento ou composição de um produto não-comestível **caracterizado** por compreender pelo menos um composto conforme definido na reivindicação 1 ou 2.

10 11. Composição de alimento, bebida ou medicamento ou composição de um produto não-comestível, de acordo com a reivindicação 10, **caracterizado** pelo fato de que a composição de alimento ou bebida é um café ou alimento
sabor café ou composição de bebida.

15 12. Composição de alimento, bebida ou medicamento ou composição de um produto não-comestível, de acordo com a reivindicação 10, **caracterizado** por compreender pelo menos dois compostos, pelo menos um dos quais é um antagonista hT2R8 e pelo menos um dos quais é um antagonista hT2R14.

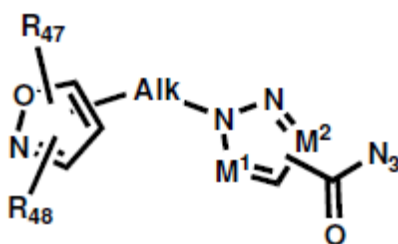
20 13. Composição de alimento, bebida ou medicamento ou composição de um produto não-comestível, de acordo com a reivindicação 10, **caracterizado** pelo fato de que a composição de bebida é café pronto para beber, solúvel e em pó, uma mistura de bebida de café ou um concentrado de
25 bebida de café.

14. Composição de alimento, bebida ou medicamento ou composição de um produto não-comestível, de acordo com a reivindicação 10, **caracterizado** pelo fato de que a composição de bebida é um creme à base de lácteos, um creme
30 não lácteo ou um branqueador para bebidas de café.

15. Composição de alimento, bebida ou medicamento ou composição de um produto não-comestível, de acordo com a reivindicação 10, **caracterizado** pelo fato de que o produto não-comestível é um suplemento, nutracêutico, produto de alimento funcional, farmacêutico, medicamento livre de prescrição ou produto de cuidados orais ou um produto cosmético.

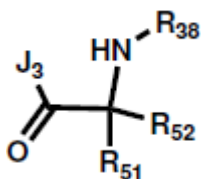
16. Composição de alimento, bebida ou medicamento ou composição de um produto não-comestível, de acordo com a reivindicação 15, **caracterizado** pelo fato de que o produto de cuidados orais é um dentifrício, enxaguante bucal ou goma de mascar.

17. Método para produzir um composto, conforme definido na reivindicação 1, **caracterizado** por compreender o aquecimento de um composto apresentando a fórmula:



em que R_{47} , R_{48} , Alk, M^1 e M^2 são definidos como: R_{47} é metila; R_{48} é metila; Alk é CH_2 ; M^1 é CR_{49} , em que R_{49} é H; e M^2 é CR_{50} , em que R_{50} é H;

para converter o grupo $-CON_3$ em um grupo $-N=C=O$ e em seguida reagir com um composto apresentando a fórmula:



em que J_3 é um grupo de saída e R_{38} , R_{51} e R_{52} são

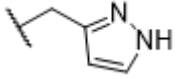
definidos como:

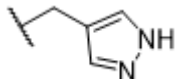
R_{51} e R_{52} são iguais ou diferentes independentemente um do outro:

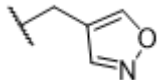
- (a) H;
 - 5 (b) metila opcionalmente substituída com grupo isopropila, ciclopentila, ciclohexila, hidróxi, metóxi, benzilóxi ou carboxila;
 - (c) etila opcionalmente substituída com grupo metóxi ou fenóxi;
 - 10 (d) propila opcionalmente substituída com grupo fenila;
 - (e) isopropila;
 - (f) butila;
 - (g) $-\text{CH}_2-\text{C}(\text{O})-\text{NH}-\text{Ph}$;
 - 15 (h) $-\text{C}(\text{O})-\text{O}-\text{CH}_2\text{CH}_3$;
 - (i) $-\text{CH}_2-\text{Ph}$ opcionalmente substituído com de 1 a 2 substituintes independentemente selecionados em cada ocorrência do mesmo a partir de grupo metóxi ou hidróxi;
 - (j) $-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{Ph}$ opcionalmente substituído com
 - 20 halogênio ou $-\text{CH}_2-\text{C}(\text{O})-\text{NH}-\text{CH}_2-\text{Ph}$ opcionalmente substituído com grupo metóxi;
- R_{38} é
- (a) H;
 - (b) metila opcionalmente substituída com grupo
 - 25 ciclohexila, metóxi ou tetrahydrofuranila;
 - (c) etila opcionalmente substituída com grupo metóxi, fenóxi ou naftila;
 - (d) propila;
 - (e) butila;
 - 30 (f) $-\text{C}(\text{O})-\text{O}-\text{CH}_2\text{CH}_3$;

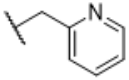
(g) $-\text{CH}_2\text{-Ph}$ opcionalmente substituído com de 1 a 2 substituintes independentemente selecionados em cada ocorrência do mesmo a partir de halogênio, metila, $-\text{CF}_3$, hidróxi, metóxi, $-\text{O}(\text{CH}_2)_2\text{OCH}_3$, $-\text{COOMe}$, $-\text{CH}_2\text{OH}$, carboxila, $-\text{C}(\text{O})\text{N}(\text{H})\text{Me}$, metiltio, $-\text{S}(\text{O})\text{CH}_3$, ciano, nitro, $-\text{C}(\text{O})\text{H}$, amino, $-\text{O}(\text{CH}_2)\text{O}-$, $-\text{CH}_2\text{N}(\text{CH}_3)_2$, ou $-\text{CH}_2\text{-NH-C}(\text{O})-\text{O-C}(\text{CH}_3)_3$;

(h) $-\text{CH}_2\text{-CH}_2\text{-Ph}$ opcionalmente substituído com de 1 a 2 substituintes independentemente selecionados em cada ocorrência do mesmo a partir de halogênio, hidróxi ou metóxi; ou

(i)  opcionalmente substituído 1 ou 2 vezes com metila;

(j)  opcionalmente substituído 1 ou 2 vezes com metila;

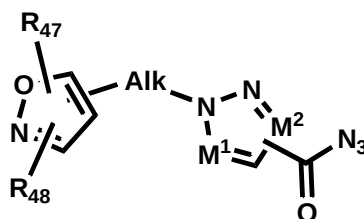
(k)  opcionalmente substituído 1 ou 2 vezes com metila;

(l)  opcionalmente substituído com 1 a 2 substituintes independentemente selecionados em cada ocorrência do mesmo a partir de metóxi ou $-\text{CH}_2\text{OH}$.

18. Método para fazer um composto, conforme definido na reivindicação 2,

o método **caracterizado** por compreender o aquecimento de um composto de fórmula:

25

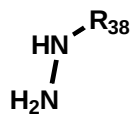


em que R_{47} , R_{48} , Alk, M^1 e M^2 são definidos como: R_{47} é metila; R_{48} é metila; Alk é CH_2 ; M^1 é CR_{49} , em que R_{49} é H;

e M^2 é CR_{50} , em que R_{50} é H;

para converter o grupo $-CON_3$ em um grupo $-N=C=O$ e em seguida reagir com uma hidrazina de fórmula:

5



em que R_{38} é definido como:

(a) H;

(b) metila; ou

10

(c) $-\text{CH}_2\text{-Ph}$.

Fig. 1 Fração de café amargo ativado hT2R8 e hT2R14

[Fração de café] = 1 mg/mL

Corante azul = 1.9 mM FD&C 1

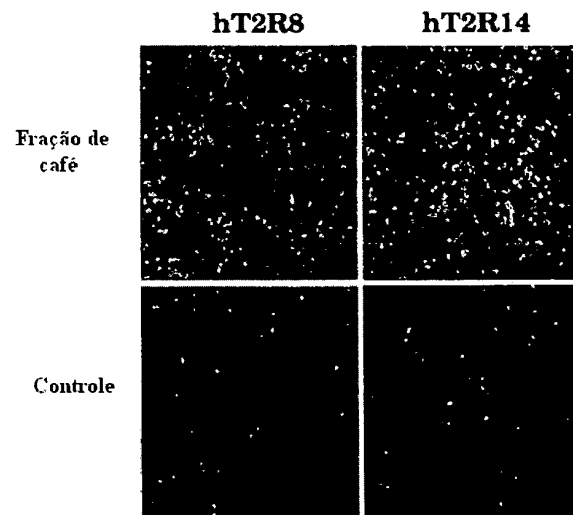


Fig. 2 Resposta da dose-dependente de hT2R8 e hT2R14 no fração de café

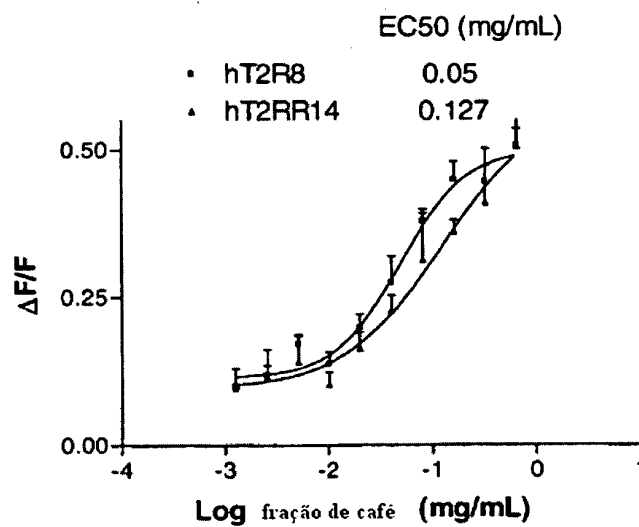


Fig. 3 Curvas de inibição de dose-dependente para composto A e B em linha de célula estável hT2R8

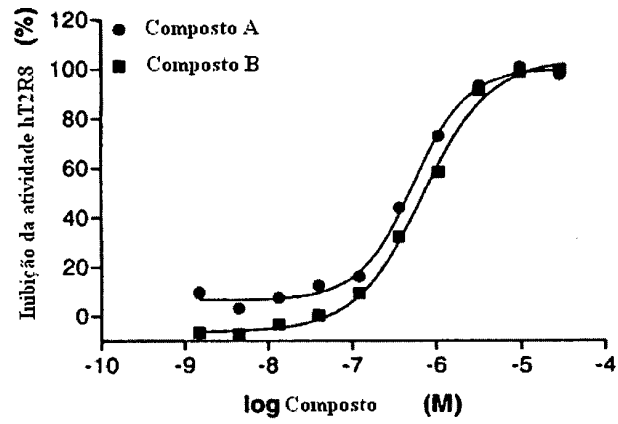


Fig. 4 Curvas de inibição de dose-dependente para composto C em linha de célula estável hT2R14

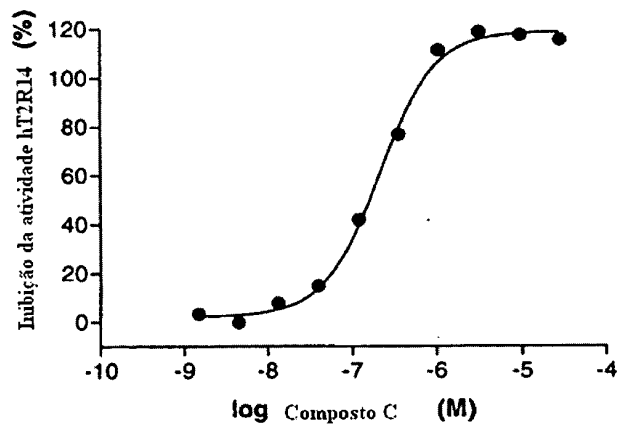
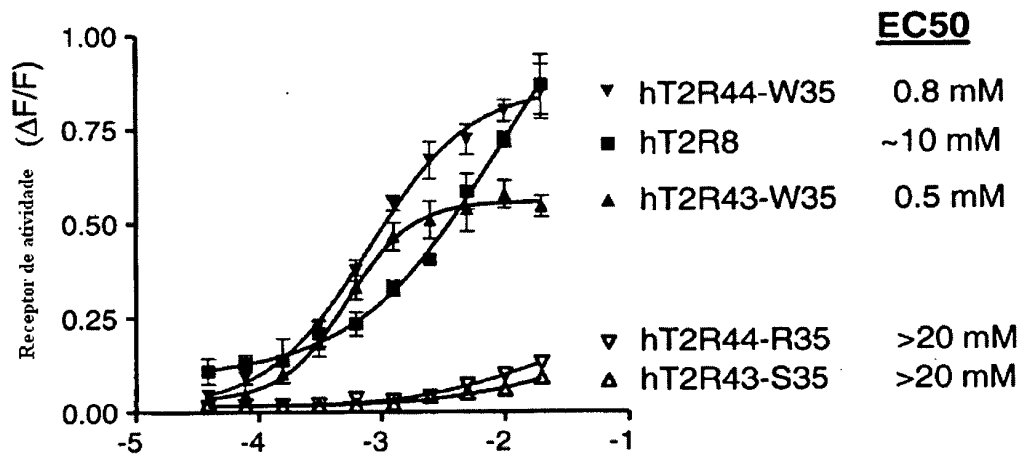
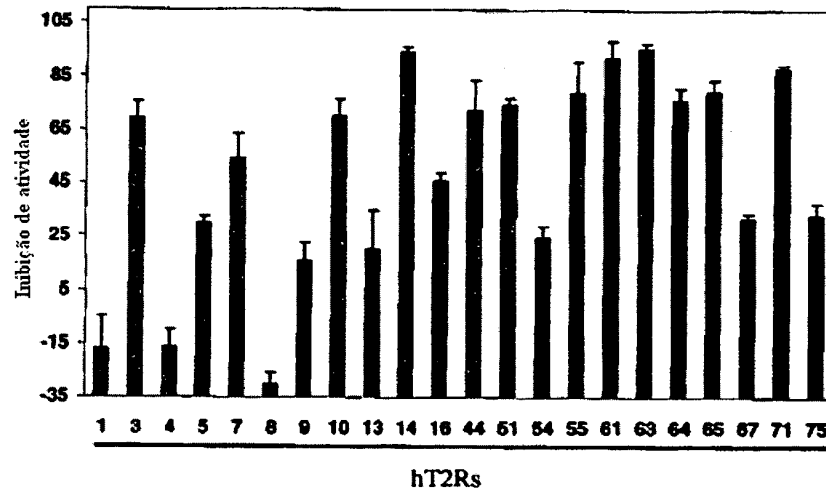


Fig 5 Inibição da atividade de SS105 em 22 hT2Rs**FIG. 6**