



ФЕДЕРАЛЬНАЯ СЛУЖБА
ПО ИНТЕЛЛЕКТУАЛЬНОЙ СОБСТВЕННОСТИ

(19) **RU** (11) **2 522 456** (13) **C2**

(51) МПК

<i>C07D 413/06</i> (2006.01)	<i>C07D 213/71</i> (2006.01)
<i>C07D 413/14</i> (2006.01)	<i>C07D 217/00</i> (2006.01)
<i>C07D 407/14</i> (2006.01)	<i>C07D 223/18</i> (2006.01)
<i>C07D 409/14</i> (2006.01)	<i>C07D 233/22</i> (2006.01)
<i>C07D 417/14</i> (2006.01)	<i>C07D 257/04</i> (2006.01)
<i>C07C 311/16</i> (2006.01)	<i>C07D 307/14</i> (2006.01)
<i>C07C 311/12</i> (2006.01)	<i>C07D 317/58</i> (2006.01)
<i>C07C 311/15</i> (2006.01)	<i>C07D 333/34</i> (2006.01)
<i>C07C 335/12</i> (2006.01)	<i>C07D 241/44</i> (2006.01)
<i>C07D 213/36</i> (2006.01)	<i>C07D 239/96</i> (2006.01)

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ПАТЕНТУ

(21)(22) Заявка: 2010110557/04, 19.08.2008

(24) Дата начала отсчета срока действия патента:
19.08.2008

Приоритет(ы):

(30) Конвенционный приоритет:
21.08.2007 US 60/957,129;
23.04.2008 US 61/047,187

(43) Дата публикации заявки: 27.09.2011 Бюл. № 27

(45) Опубликовано: 10.07.2014 Бюл. № 19

(56) Список документов, цитированных в отчете о поиске: US 2007/0037212 A1, 15.02.2007. US 2006/0263411 A1, 23.11.2006. US 6,903,086 B2, 07.06.2005. US 6,774,241 B2, 10.08.2004. RU 2287525 C2, 20.11.2006

(85) Дата начала рассмотрения заявки РСТ на национальной фазе: 22.03.2010

(86) Заявка РСТ:
US 2008/009864 (19.08.2008)

(87) Публикация заявки РСТ:
WO 2009/025793 (26.02.2009)

Адрес для переписки:

129090, Москва, ул. Большая Спасская, 25, стр. 3, ООО "Юридическая фирма "Городисский и Партнеры"

(72) Автор(ы):

ЛИ Сяодун (US),
ПЭТРОН Эндрю (US),
ТАЧДЖИАН Кэтрин (US),
СЮЙ Хун (US),
ЛИ Цин (US),
ПРОНИН Алексей (US),
СЕРВАНТ Гай (US),
ЧЖАН Лань (US),
БРЭДИ Томас (US),
ДАРМОХУСОДО Винсент (US),
АРЕЛЛАНО Мелисса (US),
СЕЛЧАУ Виктор (US),
ЧИНГ Бретт Вейлан (US),
КАРАНЕВСКИЙ Доналд С. (US),
БРАСТ Пол (US),
ЛИН Цзин (US),
ЧЖАО Вэнь (US),
ПРИСТ Чад (US)

(73) Патентообладатель(и):

СИНОМИКС, ИНК. (US)

(54) СОЕДИНЕНИЯ, ИНГИБИРУЮЩИЕ (БЛОКИРУЮЩИЕ) ГОРЬКИЙ ВКУС, СПОСОБЫ ИХ ПРИМЕНЕНИЯ И ПОЛУЧЕНИЯ

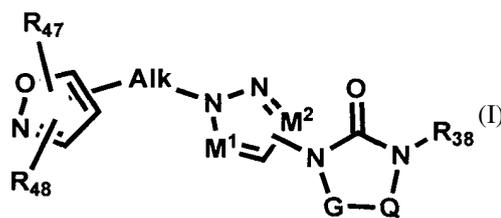
(57) Реферат:

Изобретение относится к соединению общей формулы (I) или к его фармацевтически приемлемым солям, где Alk представляет собой C₁-C₆алкильную группу; G представляет собой C=O и Q представляет собой CR₅₁R₅₂ или NR₅₁, где R₅₁ и R₅₂, будучи одинаковыми или разными, независимо один от другого, представляют собой

H, C₁-C₆алкил, необязательно замещенный заместителем, выбранным из группы, включающей карбокси, фенокси, бензилокси, C₁-C₆алкокси и гидроксид; C₃-C₆циклоалкилC₁-C₆алкил; фенилC₁-C₆алкил, необязательно замещенный галогеном; фениламидоC₁-C₆алкил; фенилC₁-C₆алкиламидоC₁-C₆алкил,

необязательно замещенный C₁-C₆ алкоксигруппой; или R₅₁ и R₅₂, совместно с углеродным атомом, к которому они присоединены, образуют группу C=O или C₂-C₆ алкенильную группу, необязательно замещенную фенилом; M¹ представляет собой CR₄₉, где R₄₉ представляет собой H; M² представляет собой CR₅₀, где R₅₀ представляет собой H; R₃₈ представляет собой H, C₁-C₆алкил, замещенный феноксигруппой; C₃-C₆циклоалкилC₁-C₆алкил; арилC₁-C₆алкил, необязательно замещенный 1 или 2 заместителями, выбранными из группы, включающей C₁-C₆алкил, C₁-C₆алкокси, C₁-C₆ алкоксикарбонил, карбоксил, N-метиламидо, гидрокси, C₁-C₆алкоксиC₁-C₆алкокси, C₁-C₆ алкилтио, C₁-C₆алкилсульфинил, циано, галоген, перфторC₁-C₆алкил, нитро, формил, гидроксиC₁-C₆алкил и amino, причем арильный фрагмент представляет собой фенил или нафтил; и гетероарилC₁-C₆алкил, где гетероарильный

фрагмент представляет собой пиридинил, необязательно замещенный 1 или 2 группами, выбранными из C₁-C₆алкокси или гидроксиC₁-C₆ алкила, пиразолил или изоксазолил, замещенные 1 или 2 C₁-C₆алкильными группами; R₄₇ и R₄₈ представляют собой C₁-C₆алкил. Также изобретение относится к конкретным соединениям, к способу уменьшения или ослабления горького вкуса, к композиции пищевого/непищевого продукта или напитка или лекарственного средства для уменьшения или смягчения горького вкуса, к способу получения соединения формулы (I). Технический результат: получены новые соединения, полезные в качестве ингибиторов горького вкуса или модуляторов вкуса. 19 н. и 18 з.п. ф-лы, 6 ил., 12 табл., 186 пр.



(51) МПК (продолжение)

- C07D 239/96 (2006.01)
- C07D 403/12 (2006.01)
- C07D 405/12 (2006.01)
- C07D 413/12 (2006.01)
- A61K 31/4155 (2006.01)
- A61K 31/422 (2006.01)
- A61K 31/423 (2006.01)
- A61K 31/4178 (2006.01)
- A61K 31/4196 (2006.01)
- A61K 31/17 (2006.01)
- A61K 31/18 (2006.01)
- A61K 31/34 (2006.01)
- A61K 31/38 (2006.01)
- A61K 31/44 (2006.01)
- A61K 31/4166 (2006.01)
- A61K 31/47 (2006.01)
- A61K 31/498 (2006.01)
- A61K 31/517 (2006.01)
- A61P 43/00 (2006.01)

R U 2 5 2 2 4 5 6 C 2

R U 2 5 2 2 4 5 6 C 2



FEDERAL SERVICE
FOR INTELLECTUAL PROPERTY

(51) Int. Cl.

<i>C07D 413/06</i> (2006.01)	<i>C07D 213/71</i> (2006.01)
<i>C07D 413/14</i> (2006.01)	<i>C07D 217/00</i> (2006.01)
<i>C07D 407/14</i> (2006.01)	<i>C07D 223/18</i> (2006.01)
<i>C07D 409/14</i> (2006.01)	<i>C07D 233/22</i> (2006.01)
<i>C07D 417/14</i> (2006.01)	<i>C07D 257/04</i> (2006.01)
<i>C07C 311/16</i> (2006.01)	<i>C07D 307/14</i> (2006.01)
<i>C07C 311/12</i> (2006.01)	<i>C07D 317/58</i> (2006.01)
<i>C07C 311/15</i> (2006.01)	<i>C07D 333/34</i> (2006.01)
<i>C07C 335/12</i> (2006.01)	<i>C07D 241/44</i> (2006.01)
<i>C07D 213/36</i> (2006.01)	<i>C07D 239/96</i> (2006.01)

(12) **ABSTRACT OF INVENTION**

(21)(22) Application: 2010110557/04, 19.08.2008

(24) Effective date for property rights:
19.08.2008

Priority:

(30) Convention priority:
21.08.2007 US 60/957,129;
23.04.2008 US 61/047,187

(43) Application published: 27.09.2011 Bull. № 27

(45) Date of publication: 10.07.2014 Bull. № 19

(85) Commencement of national phase: 22.03.2010

(86) PCT application:
US 2008/009864 (19.08.2008)(87) PCT publication:
WO 2009/025793 (26.02.2009)Mail address:
129090, Moskva, ul. Bol'shaja Spasskaja, 25, str. 3,
OOO "Juridicheskaja firma "Gorodisskij i Partnery"

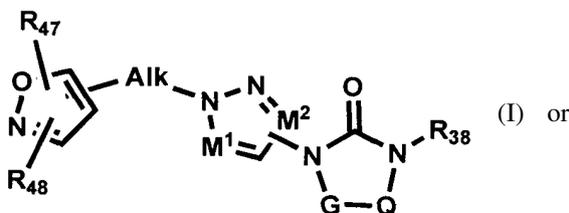
(72) Inventor(s):

LI Sjaodun (US),
PEhTRON Ehndrju (US),
TACHDZhIAN Kehtrin (US),
SJuJ Khun (US),
LI Tsin (US),
PRONIN Aleksej (US),
SERVANT Gaj (US),
ChZhAN Lan' (US),
BREhDI Tomas (US),
DARMOKhUSODO Vinsent (US),
ARELLANO Melissa (US),
SELChAU Viktor (US),
ChING Brett Vejlan (US),
KARANEVSKIJ Donald S. (US),
BRAST Pol (US),
LIN Tszin (US),
ChZhAO Vehn' (US),
PRIST Chad (US)

(73) Proprietor(s):
SINOMIKS, INK. (US)(54) **COMPOUNDS INHIBITING (BLOCKING) BITTER TASTE, METHODS FOR USE AND PRODUCTION THEREOF**

(57) Abstract:

FIELD: chemistry.

SUBSTANCE: invention relates to a compound of
g e n e r a l f o r m u l a

pharmaceutically acceptable salts thereof, where Alk is an C₁-C₆alkyl group; G is C=O and Q is CR₅₁R₅₂ or NR₅₁, where R₅₁ and R₅₂, being identical or different, independently denote H, C₁-C₆alkyl, optionally substituted with a substitute selected from a group comprising

carboxy, phenoxy, benzyloxy, C₁-C₆alkoxy or hydroxy; C₃-C₆cycloalkylC₁-C₆alkyl; phenylC₁-C₆alkyl, optionally substituted with a halogen; phenylamidoC₁-C₆alkyl; phenylC₁-C₆alkylamidoC₁-C₆alkyl, optionally substituted with a C₁-C₆alkoxy group; or R₅₁ and R₅₂, together with a carbon atom with which they are bonded form a C=O or C₂-C₆alkenyl group, optionally substituted with a phenyl; M¹ is CR₄₉, where R₄₉ is H; M² is CR₅₀, where R₅₀ is H; R₃₈ is H, C₁-C₆alkyl, substituted with a phenoxy group; C₃-C₆cycloalkylC₁-C₆alkyl; arylC₁-C₆alkyl, optionally substituted with 1 or 2 substitutes selected from a group comprising C₁-C₆alkyl, C₁-C₆alkoxy, C₁-C₆alkoxycarbonyl, carboxyl, N-methylami-

do, hydroxy, C₁-C₆alkoxy, C₁-C₆alkylthio, C₁-C₆alkylsulphanyl, cyano, halogen, perfluoroC₁-C₆alkyl, nitro, formyl, hydroxyC₁-C₆alkyl and amino, wherein the aryl moiety is a phenyl or naphthyl; and heteroarylC₁-C₆alkyl, where the heteroaryl moiety is pyridinyl, optionally substituted with 1 or 2 groups selected from C₁-C₆alkoxy or hydroxyC₁-C₆alkyl, pyrazolyl or isoxazolyl, substitute with 1 or 2 C₁-C₆alkyl

groups; R₄₇ and R₄₈ is C₁-C₆alkyl. The invention also relates to specific compounds, a method of reducing or weakening bitter taste, a composition of a food/non-food product or beverage or drug for reducing or lightening bitter taste and a method of producing a compound of formula (I).

EFFECT: obtaining novel compounds which are useful as bitter taste inhibitors or taste modulators.

37 cl, 6 dwg, 12 tbl, 186 ex

(51) Int. Cl.

C07D 239/96 (2006.01)

C07D 403/12 (2006.01)

C07D 405/12 (2006.01)

C07D 413/12 (2006.01)

A61K 31/4155 (2006.01)

A61K 31/422 (2006.01)

A61K 31/423 (2006.01)

A61K 31/4178 (2006.01)

A61K 31/4196 (2006.01)

A61K 31/17 (2006.01)

A61K 31/18 (2006.01)

A61K 31/34 (2006.01)

A61K 31/38 (2006.01)

A61K 31/44 (2006.01)

A61K 31/4166 (2006.01)

A61K 31/47 (2006.01)

A61K 31/498 (2006.01)

A61K 31/517 (2006.01)

A61P 43/00 (2006.01)

R U 2 5 2 2 4 5 6 C 2

R U 2 5 2 2 4 5 6 C 2

Настоящая заявка испрашивает приоритет согласно предварительной заявке США сер. №60/957129, поданной 21 августа 2007 года, и предварительной заявке США сер. №61/047187, поданной 23 апреля 2008 года, и относится к заявке США сер. №11/766974, представляющей собой частичное продолжение заявки США сер. №11/555617, поданной 1 ноября 2006 года, которая, в свою очередь, является частичным продолжением заявки США сер. №10/191058, поданной 10 июля 2002 года, и также является частичным продолжением заявки США сер. №10/742209, поданной 1 декабря 2003 года, являющейся выделенной заявкой США сер. №09/825882, поданной 5 апреля 2001 года, в настоящее время патент США №7105650, все указанные заявки включены в настоящий текст в полном объеме посредством ссылки.

ОБЛАСТЬ ТЕХНИКИ

Настоящая заявка касается идентификации вкусовых рецепторов человека 2 типа (hT2R) и их применения в средствах анализа для идентификации лигандов, активирующих специфические T2R. В предыдущих заявках на патент настоящих авторов, они описывали функциональную экспрессию рецепторов горького вкуса у человека, включая hT2R8 и hT2R14. В настоящей заявке сообщается, что hT2R8 и hT2R14 активируются фракцией кофе, обогащенной горькими соединениями. Также сообщается об идентификации антагонистов hT2R8 и hT2R14 с использованием высокопроизводительного скринингового анализа, а также о том, что комбинации антагонистов могут ослаблять горький вкус кофе и фракций кофе. Согласно настоящему изобретению, предложен способ изменения и улучшения вкуса кофейных напитков.

В частности, согласно настоящему изобретению, предложено применение hT2R8 и/или hT2R14 в скрининговом анализе и вкусовых пробах для идентификации соединений, ингибирующих (блокирующих) горький вкус кофе и других напитков.

Также, настоящее изобретение относится к выявлению лиганда, обладающего свойствами антагониста горького вкуса широкого спектра действия, т.е. такого лиганда, который обладал бы способностью в значительной степени блокировать или ингибировать активацию множества (13) рецепторов горького вкуса рядом различных лигандов горького вкуса, и блокировать или ингибировать активацию шести других рецепторов горького вкуса, а также ингибировать горький вкус, вызываемый некоторыми горькими соединениями, к которым к настоящему моменту не выявлены рецептор(ы) горького вкуса.

В частности, изобретение относится к выявлению лиганда, указанного в настоящем описании как Соединение С, обладающего свойствами антагониста горького вкуса широкого спектра действия, т.е. в значительной степени блокирующего или ингибирующего активацию hT2R3, 7, 10, 14, 16, 44, 51, 55, 61, 63, 64, 65 и 71 рецепторов горького вкуса рядом различных горьких лигандов, и блокирующего или ингибирующего активацию шести других рецепторов горького вкуса, т.е. hT2R5, 9, 13, 54, 67 и 75, а также ингибирующего горький вкус, вызываемый некоторыми горькими соединениями, к которым к настоящему моменту не выявлены рецептор(ы) горького вкуса.

Также, в частности, согласно настоящему изобретению обнаружено, что такое соединение-антагонист ослабляет горький вкус салицина, антагониста hT2R16, и фенилтиомочевины, агониста hT2R51.

Также, в частности, согласно настоящему изобретению, обнаружено блокирование указанным соединением-антагонистом горького вкуса, вызываемого горькими соединениями, активирующими различные рецепторы горького вкуса, включая омепразол, активирующий hT2R10, 14 и 75; Ребаудиозид А, природный подсластитель,

активирующий, по меньшей мере, 7 рецепторов горького вкуса; а также далее подавление тем же антагонистом горького вкуса, вызываемого горькими соединениями, рецепторы горького вкуса к которым неизвестны, включая декстрометорфан и дифенгидрамин.

5 На основании описанного выше, согласно настоящему изобретению, предложено применение такого соединения в пищевых продуктах, напитках, лекарственных средствах и других продуктах потребления с целью ослабления их горького вкуса, включая горький вкус, вызываемый неустановленными горькими лигандами или соединениями, в случае, когда ощущение горечи вызывается активацией нескольких рецепторов горького вкуса, или в случае, когда его специфичность к рецептору не
10 установлена.

Также, на основании описанного выше, согласно настоящему изобретению предложено применение такого антагониста в целях выявления консервативного мотива, представленного в составе различных T2R человека, участвующего в связывании лиганда, и активации T2R, а также конструирование химерных и мутированных
15 рецепторов, сопряженных с G-белком (GPCR), конструируют таким образом, что они содержат указанный мотив.

Далее, настоящее изобретение относится к любому из соединений, идентифицированному при помощи описанного скринингового анализа, и его применению в пищевых продуктах, напитках и лекарственных средствах, включая кофе
20 и продукты с добавлением кофе, а также напитки и лекарственные средства.

УРОВЕНЬ ТЕХНИКИ

Одним из основных вкусов, распознаваемых человеком, является горький. До недавнего времени физиологию горького вкуса понимали очень слабо. Недавно начались исследования для прояснения биологии вкуса (Lindemann, Nature (2001)). В настоящее
25 время известно, что многие горькие соединения вызывают горький вкус благодаря взаимодействию с рецепторами клеточной поверхности. Эти рецепторы принадлежат к семейству рецепторов, состоящих из семи трансмембранных доменов, которые взаимодействуют с внутриклеточными G-белками. В организме человека и грызунов было выделено новое семейство GPCR, названное T2R (Adler et al., Cell 100(6):693-702
30 (2000); Chandrashekar et al., Cell 100(6): 703-711 (2000); Matsunami H, Montmayeur J P, Buck L B. Nature 404(6778): 601-4 (2000)). Согласно заявленному изобретению предложен ряд доказательств того, что T2R являются медиаторами ответа на горькие соединения. Во-первых, гены T2R специфичным образом экспрессировали в субпопуляции клеток вкусового рецептора языка и эпителия неба. Во-вторых, ген одного из T2R человека
35 (hT2R1) расположен в локусе хромосомы, связанном с чувствительностью к горькому соединению 6-н-пропил-2-тиоурацилу у людей (Adler et al., (Id) (2000)). В-третьих, один из T2R мыши (mT2R5) расположен в локусе хромосомы, связанном с чувствительностью к горькому соединению циклогексимиду у мышей. Также было показано, что mT2R5 могут активировать густдудин, G-белок, специфичным образом экспрессируемый во
40 вкусовых клетках и связанный с преобразованием горького стимула (Wong et al., Nature 381:796-800 (1996)). Активация густдудина mT2R5 происходит только в ответ на циклогексимид (Chandrashekar et al., (Id.) (2000)). Таким образом, было сделано предположение о том, что семейство mT2R является медиаторами ответа на горький вкус у мышей, в то время как семейство hT2R являются медиаторами ответа на горький
45 вкус у человека. Только у T2R было предположено наличие идентифицированного горького лиганда. Было показано, что hT2R4 активируется денатониумом (Chandrashekar et al., (Id.) 2000). Хотя, эффективные концентрации денатониума, применяемые в исследованиях (1,5 мМ), были необычайно высокими, т.е. в 10^5 раз выше, чем

указывавшаяся ранее граница восприятия горького для денатониума в организме человека (Saroli, *Naturwissenschaften* 71:428-429 (1984)). Таким образом, не обнаружено специфического горького лиганда, полностью совместимого с любым из hT2R. Также было сделано предположение о том, что каждый из hT2R способен связывать множество горьких лигандов. Это предположение основывается на том факте, что семейство hT2R состоит всего из 25 идентифицированных рецепторов, в то время как человек может определять сотни различных соединений как горькие. Последовательности hT2R были ранее опубликованы и раскрыты в опубликованных заявках PCT Zuker et al. (WO 01/18050 A2, (2001)) и Adler et al. (WO 01/77676 A1 (2001)), обе заявки включены в настоящий текст в полном объеме посредством ссылки.

Одна из сложностей в исследовании функций T2R заключается в том, что указанные рецепторы не удается легко экспрессировать в культивируемых клеточных линиях млекопитающих. Для улучшения экспрессии T2R к последовательностям T2R присоединяли N-терминальную последовательность хорошо экспрессируемого GPCR, родопсина (Chandrashekar et al., (Id.) 2000). Этот N-концевой фрагмент также позволял с легкостью контролировать экспрессию белка с помощью доступного антитела. Дополнительно, для улучшения экспрессии T2R применяли SSTR3 концевой фрагмент (Bufe et al., *Nat. Genet.* 32:397-400 (2002)), другой N-концевой фрагмент. Несмотря на то, что введение родопсинового концевой фрагмента улучшало экспрессию некоторых T2R в клеточных линиях млекопитающих, многие из них не экспрессировались в степени, достаточной для исследования функций. При применении другой методики, mT2R5 успешно экспрессировали в клетках насекомых Sf9, и их использовали в исследованиях функций при помощи биохимического анализа связывания GTP γ S (Chandrashekar et al., (Id.) 2000).

В своей более ранней заявке США сер. № 09/825882, в настоящее время патент США № 7105650, заявители настоящей заявки на патент выявили и представили последовательности нуклеиновых кислот и последовательности полипептидов нескольких новых на момент публикации вкусовых рецепторов человека, включая hT2R51, hT2R54, hT2R55, hT2R61, hT2R63, hT2R64, hT2R65, hT2R67, hT2R71, и hT2R75. В дополнение, в заявках на патент США сер. № 11/182942 и 10/628464, включенных в настоящее описание целиком посредством ссылки, заявители представляют последовательности полипептидов и ДНК другого выделенного нового вкусового рецептора, названного hT2R76.

Также, в заявке на патент США сер. № 10/191058, полностью включенной в настоящий текст посредством ссылки, заявители выявили лиганды, специфичным образом активирующие три различных T2R человека. В дополнение, заявители недавно подали заявку на патент США сер. № 11/455693, помещенную в настоящий текст целиком посредством ссылки, в которой далее идентифицируют горькие лиганды, специфичным образом связывающиеся с другими T2R человека, и предоставляют соответствующие анализы.

Также, в отношении практического осуществления настоящего изобретения, были опубликованы данные о том, что оба вида вкусовых рецепторов: T2R и T1R экспрессируются в желудочно-кишечном тракте. Например, Wu et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 99(4):2392-7(2002) сообщали о том, что T2R экспрессируются в эндокринных клетках ЖКТ (клетки STC1), также как субъединицы густдущина и трансдущина, и о том, что эти клетки, вероятно, реагируют на горькие лиганды в желудочно-кишечном тракте. Также, Chen et al., *AM J. Physiol. Cell Physiol.* 291(4):C726-39 (2006) сообщали, что указанные стимулы горького вкуса индуцируют передачу сигнала с участием Ca⁺⁺

и высвобождение холецистокинина (ССК) в эндокринных клетках STC-1. Также, Rozengurt, A. J. *Physiol. Gastrointest Liver Physiol.* 291(2):G171-7 (2006) сообщают, что вкусовые рецепторы в кишечнике, вероятно, играют роль в молекулярной чувствительности и контролируют пищеварительные функции и гормональные и/или нервные пути, а также о том, что они могут играть роль в распознавании вредных лекарственных средств и реакциях выживаемости. Далее, в Sternini *Am. J. Physiol. Gastrointest Liver Physiol.* 292(2):G457-61 (2007) сообщается, что вкусовые рецепторы в кишечнике необязательно участвуют в пищеварительных функциях, таких как молекулярная чувствительность, всасывание питательных соединений, защита от вредных соединений, и, далее, высказано предположение, что понимание этих механизмов может иметь значение в лечении таких болезненных состояний, как расстройства пищеварения и воспаления. Далее, недавно Mace et al., *J. Physiol.* 2007 (Epub) было сделано предположение о том, что T2R и T1R активируют фосфолипазу C бета 2, PLC beta2, и, вероятно, в кишечнике существует молекулярная сенсорная система, сходная с системой, имеющейся в клетках языка, и такие клетки кишечника, как клетки реснитчатого эпителия или одиночные хемосенсорные клетки, экспрессирующие вкусовые рецепторы, могут вызывать повышение содержания GLUT2 и участвовать в распознавании питательных соединений, а также в регуляции питания при лечении ожирения и различных видов диабета. Также, Cui et al., *Curr. Pharm. Des.* 12(35):4591-600 (2006) предполагают, что T1R, экспрессируемые в кишечнике, можно использовать в исследовании соединений, предназначенных для лечения ожирения и диабетов, а также в качестве искусственных подсластителей.

Тем не менее, несмотря на все опубликованные данные и понимание того, что рецепторы семейства T2R регулируют восприятие горького вкуса, и, необязательно, участвуют в пищеварительной функции, существует необходимость в определении конкретных лигандов, активирующих вкусовые рецепторы человека T2R. Лучшее понимание способности к связыванию различных T2R, в частности T2R человека, будет очень полезным, поскольку оно будет облегчать их использование в выборе соединений с желаемыми свойствами модуляции вкуса, т.е. блокирующих или ингибирующих вкус отдельных горьких соединений. Также, оно будет способствовать идентификации соединений, подходящих для лечения и модуляции желудочно-кишечных функций и связанных с ними заболеваний, таких как ожирение, диабет, нарушения всасывания пищи, распознавания пищи, пищевые расстройства, и в регуляции связанных с этой функцией гормонов и пептидов, таких как GLUT2, холецистокин, и др.

КРАТКОЕ ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ

Соответственно, настоящее изобретение связано с обнаружением того факта, что hT2R8 и hT2R14 активируются обогащенной горькими соединениями фракцией кофе.

Также, согласно настоящему изобретению предложено применение изобретения для определения антагонистов hT2R8 и hT2R14, ингибирующих или блокирующих горький вкус кофе и связанных с кофе продуктов, напитков и лекарственных средств.

Далее, настоящее изобретение относится к специфичным соединениям-антагонистам (блокаторам горького вкуса), подавляющим горький вкус кофе и пищевых продуктов, напитков и лекарственных средств с добавлением кофе.

Также, настоящее изобретение относится к выявлению лиганда, обладающего свойствами антагониста горького вкуса широкого спектра действия, т.е. он в значительной степени блокирует или ингибирует активацию многих (13) рецепторов горького вкуса рядом различных горьких лигандов и блокирует или ингибирует активацию шести других рецепторов горького вкуса, а также ингибирует горечь,

вызываемую некоторыми горькими соединениями, рецептор(ы) горького вкуса к которым не выявлены в настоящее время.

В частности, настоящее изобретение относится к выявлению лиганда, указанного в настоящем описании как соединений С, обладающего свойствами антагониста горького вкуса широкого спектра действия, т.е. он в значительной степени блокирует или ингибирует активацию hT2R3, 7, 10, 14, 16, 44, 51, 55, 61, 63, 64, 65 и 71 рецепторов горького вкуса рядом различных горьких лигандов и блокирует или ингибирует активацию шести других рецепторов горького вкуса, т.е. hT2R5, 9, 13, 54, 67 и 75, а также ингибирует горечь, вызываемую некоторыми горькими соединениями, рецептор(ы) горького вкуса к которым не выявлены в настоящее время.

Также, в частности, согласно настоящему изобретению, обнаружено, что такое соединение-антагонист ослабляет горький вкус салицина, антагониста hT2R16, и фенилтиомочевины, агониста hT2R51.

Также, в частности, согласно настоящему изобретению, обнаружено, что то же соединение-антагонист блокирует горький вкус, вызываемый горькими соединениями, активирующими несколько рецепторов горького вкуса, включая омепразол, активирующий hT2R10, 14 и 75; Ребаудиозид А, природный подсластитель, активирующий, по меньшей мере, 7 рецепторов горького вкуса; и что то же соединение-антагонист также подавляет горький вкус, вызываемый горькими соединениями, для которых не известны рецепторы горького вкуса, с которыми они взаимодействуют, включая декстрометорфан и дифенгидрамин.

Настоящее изобретение относится также к применению соединения согласно настоящему изобретению и близких к нему соединений в пищевых продуктах, напитках, лекарственных средствах и других средствах, что обеспечивает ослабление их горького вкуса, включая горький вкус, вызываемый неустановленными горькими лигандами или соединениями, в случае, когда ощущение горечи вызывается активацией нескольких рецепторов горького вкуса, или в случае, когда его специфичность к рецептору(ам) не установлена.

Также, настоящее изобретение относится к пищевым продуктам, напиткам и лекарственным средствам, содержащим по меньшей мере одно из идентифицированных соединений-антагонистов горького, в количестве, достаточном для того, чтобы ингибировать или блокировать их горький вкус.

Факты, на которых основано настоящее изобретение, были обнаружены при помощи клеточного анализа, в котором измеряли активность T2R, используя клетки, экспрессирующие определенный T2R в присутствии или в отсутствие специфичных лигандов. В частности, как описано ниже в подробном описании, в клеточном анализе по определению изменений концентрации внутриклеточного кальция, в котором использовали клеточные линии НЕК, экспрессирующие на своей поверхности указанные выше специфические T2R, далее экспрессировавшие химерный G-белок, функционально связанный с указанными T2R, установили, что они специфичным образом активируются определенными горькими соединениями, в то время, как другие hT2R в аналогичных условиях не активировались.

Таким образом, настоящее изобретение охватывает применение указанных выше рецепторов вкуса человека в средствах (способах) анализа, предпочтительно, в высокопроизводительных средствах анализа, для определения других соединений, модулирующих, предпочтительно блокирующих, активацию таких рецепторов указанным и другими горькими соединениями, присутствующими в кофе и родственных кофе пищевых продуктах и напитках.

Также, согласно настоящему изобретению предложено применение указанных рецепторов для идентификации соединений, вызывающих ощущение горького вкуса, в частности, присутствующих в кофе и пищевых продуктах, напитках и лекарственных средствах с добавлением кофе.

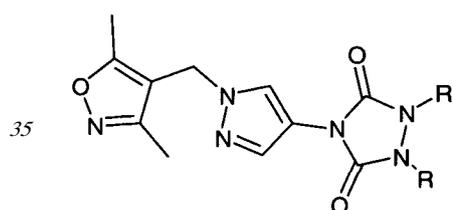
5 Также, согласно настоящему изобретению предложено применение соединения-антагониста, обладающего свойствами антагониста горького вкуса широкого спектра действия, средствах анализа и вкусовых пробах *in vitro* и *in vivo* для определения горького (их) соединения(ий) или горьких фракций, для которых данное соединение подавляет ощущение горького вкуса от употребления которых ингибируют данное соединение, и/или подавляет активацию одного или более рецепторов горького вкуса указанным горьким соединением или фракцией, содержащей указанное горькое соединение.

10 Далее, в частности, согласно настоящему изобретению предложено применение указанного соединения, обладающего свойствами антагониста горького вкуса широкого спектра действия, в пищевых продуктах, напитках, лекарственных средствах и других продуктах потребления, предназначенных для людей или животных, интенсивность горького вкуса которых желательно снизить.

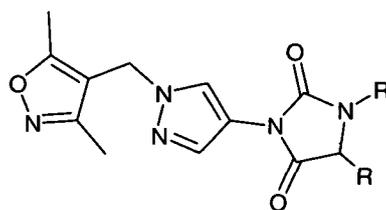
Настоящее изобретение также охватывает способы анализа, включающие дополнительный этап оценки влияния идентифицированных модулирующих соединений для человека и в других вкусовых пробах, и, в частности, оценку влияния идентифицированных соединений на горький вкус, в частности, горький вкус кофе и фракций кофе, содержащих одно или более соединений, вызывающих ощущение горького вкуса.

15 Далее, настоящее изобретение включает получение кофе и пищевых продуктов, напитков и лекарственных средств с добавлением кофе, из которых удаляют соединения, специфичным образом активирующие описанные выше рецепторы горького вкуса, например, пищевых продуктов и напитков, которые подвергают обработке с удалением или снижением количества горьких соединений, присутствующих в них.

20 Согласно некоторым аспектам настоящего изобретения, также предложены структурные классы соединений, представленные двумя приведенными ниже Каркасными Структурами. На Каркасной Структуре 1 изображен пример уразолинового каркаса, а на Каркасной Структуре 2 - пример гидантоинового каркаса.



Каркасная Структура 1



Каркасная Структура 2

40 Другой конкретной задачей настоящего изобретения является применение приведенных выше соединений и аналогов структур 1 и 2 в качестве ингибиторов горького, опосредованных рецепторами T2R8, применимых в пищевой/фармацевтической областях для ослабления горечи, в частности, кофе и продуктов, напитков и лекарственных средств с добавлением кофе.

45 Другой задачей настоящего изобретения является подтверждение того, что установленные соединения модулируют, предпочтительно ингибируют или блокируют, горький вкус, например, в кофе и пищевых продуктах, напитках и лекарственных средствах с добавлением кофе, при помощи вкусовой пробы с участием человека или

животных, предпочтительно, при помощи вкусовой пробы с участием человека. В Примере 1 приведены типичные данные чувствительности к одному из таких соединений. Данные ясно показывают значительное уменьшение горечи для специфичного агониста T2R8 и значительное повышение эффективности в сравнении с известным ингибитором T2R8.

Другой задачей настоящего изобретения является применение соединений согласно настоящему изобретению в качестве добавок или усилителей вкуса в композициях для ингибирования или блокирования горького вкуса, вызываемого соединениями, специфичным образом активирующими рецепторы горького вкуса. Предпочтительной задачей изобретения является применение соединения, ингибирующего активацию рецепторов T2R8, для блокирования горького вкуса соединений, присутствующих в кофе и продуктах, напитках и лекарственных средствах с добавлением кофе.

Соединения, идентифицированные согласно настоящему изобретению, можно добавлять в пищевые продукты, напитки, косметические средства или медицинские композиции для модулирования, предпочтительно, блокирования горького вкуса, вызываемого активацией hT2R8 горькими соединениями, присутствующими в кофе и родственных кофе пищевых продуктах, напитках и лекарственных средствах, или сходными по структуре соединениями, или другими горькими соединениями, например, встречающимися в пищевых продуктах и напитках, или лекарственных средствах и косметических средствах, и вызывающими ощущение горького вкуса.

ЗАДАЧИ ИЗОБРЕТЕНИЯ

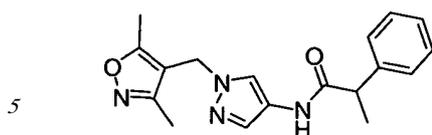
Задачей настоящего изобретения является представление методов исследования с применением hT2R8 и/или hT2R14, а также их химерных вариантов и модификаций, определяющих соединения и композиции, содержащих такие соединения, вызывающих или блокирующих горький вкус кофе и пищевых продуктов, напитков и лекарственных средств с добавлением кофе.

Конкретной задачей настоящего изобретения является обеспечение способов анализа, для идентификации соединений, активирующих, или блокирующих или модулирующих активацию и/или связывание hT2R8 с соединениями или композициями, содержащими соединения, связанные с горьким вкусом кофе.

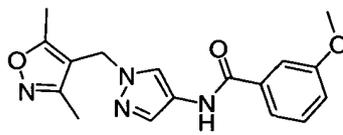
Также конкретной задачей настоящего изобретения является обеспечение способов анализа, для идентификации соединений, активирующих, или блокирующих или модулирующих активацию и/или связывание hT2R14 с соединениями или композициями, содержащими соединения, связанные с горьким вкусом кофе.

Другой конкретной задачей настоящего изобретения является обеспечение конкретных соединений, установленных при помощи способов анализа согласно настоящему изобретению и композиций, их содержащих, в особенности, в составе кофе и пищевых продуктов, напитков и лекарственных средств с добавлением кофе.

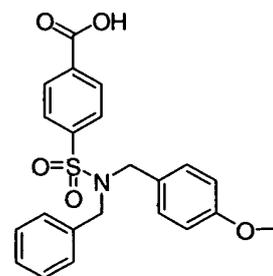
Конкретной задачей настоящего изобретения является обеспечение соединений, приведенных ниже, являющихся антагонистами T2R8 и T2R14, для которых было показано, что они блокируют горький вкус кофе.



Соединение А
IC₅₀=0.3 μM (hT2R08)



Соединение В
IC₅₀=0.4 μM (hT2R08)



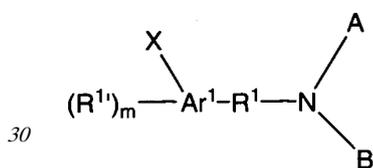
Соединение С
IC₅₀=0.2 μM(hT2R14)

10 Другой конкретной задачей настоящего изобретения является применение соединений, изображенных выше, а также аналогов Соединения А, Соединения В и Соединения С в качестве ингибиторов горького вкуса для ослабления горького вкуса, опосредуемого рецепторами T2R8 и/или T2R14, в пищевой/фармацевтической областях, в частности, в кофе и продуктах, напитках и лекарственных средствах с добавлением кофе.

15 Другой конкретной задачей настоящего изобретения является применение Соединения С и его аналогов в качестве ингибиторов горького вкуса широкого спектра действия для ослабления ощущения горького вкуса, опосредуемого любым из перечисленных рецепторов человека: T2R3, 7, 10, 14, 16, 44, 51, 55, 61, 63, 64, 65 или 71 и/или T2R5, 9, 13, 54, 67 или 75, в пищевой/фармацевтической областях, в частности, в пищевых
20 продуктах, напитках и лекарственных средствах, содержащих большое количество горьких соединений, горькие соединения, взаимодействующие с множественными рецепторами горького вкуса, или горькие соединения, специфичность к рецепторам которых не известна.

Еще одна конкретная задача настоящего изобретения состоит в обеспечении соединений, которые могут быть представлены следующими формулами.

Согласно первому аспекту, предложено соединение структурной формулы (I):



(I)

или соль, гидрат, сольват или N-оксид указанного соединения, где

35 Ar¹ представляет собой пяти- или шестичленное арильное, гетероарильное или циклоалкильное кольцо;

m равен 0, 1, 2 или 3;

R¹ представляет собой SO₂; C=O; C=S; или C=NOR⁴;

40 X выбран из группы, включающей водород, галоген, алкил, замещенный алкил, арил, замещенный арил, арилалкил, замещенный арилалкил, ацил, замещенный ацил, гетероалкил, замещенный гетероалкил, гетероарил, замещенный гетероарил, гетероарилалкил, замещенный гетероарилалкил, 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) и P(O)(R⁵)(OR⁶);

каждый R¹ независимо выбран из группы, включающей водород, галоген, алкил, замещенный алкил, арил, замещенный арил, арилалкил, замещенный арилалкил, ацил,

замещенный ацил, гетероалкил, замещенный гетероалкил, гетероарил, замещенный гетероарил, гетероарилалкил, замещенный гетероарилалкил, 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) и P(O)(R⁵)(OR⁶);

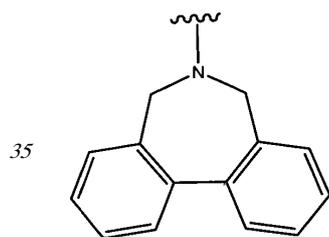
или, альтернативным образом, X и/или по меньшей мере один R¹¹ совместно с атомами, с которыми они связаны, образуют арильное, замещенное арильное, гетероарильное, замещенное гетероарильное, циклоалкильное, замещенное циклоалкильное, циклогетероалкильное или замещенное циклогетероалкильное кольцо, при этом кольцо может быть конденсировано с еще одним арильным, замещенным арильным, гетероарильным, замещенным гетероарильным, циклоалкильным, замещенным циклоалкильным, циклогетероалкильным или замещенным циклогетероалкильным кольцом;

R⁴-R⁸ независимо выбраны из группы, включающей водород, алкил, замещенный алкил, арил, замещенный арил, арилалкил, замещенный арилалкил, гетероалкил, замещенный гетероалкил, гетероарил, замещенный гетероарил, гетероарилалкил и замещенный гетероарилалкил, или, альтернативным образом, R⁵ и R⁶, R⁶ и R⁷, R⁷ и R⁸ совместно с атомами, с которыми они связаны, образуют циклогетероалкильное или замещенное циклогетероалкильное кольцо;

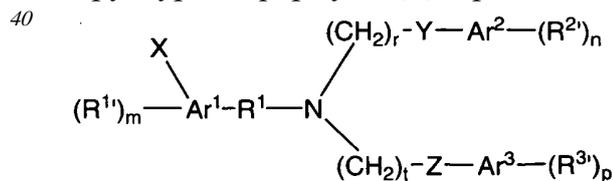
A и B независимо выбраны из группы, включающей водород, алкил, замещенный алкил, арил, замещенный арил, арилалкил, замещенный арилалкил, ацил, замещенный ацил, гетероалкил, замещенный гетероалкил, гетероарил, замещенный гетероарил, гетероарилалкил, замещенный гетероарилалкил; и

b равен 0, 1 или 2.

Согласно некоторым вариантам реализации изобретения, A и B совместно с атомом азота, к которому они присоединены, образуют кольцо, которое может быть конденсировано с дополнительными замещенными или незамещенными кольцами и может содержать по меньшей мере одну двойную связь. Неограничивающий пример такого кольца включает группу, имеющую формулу:



Согласно второму аспекту, в настоящем изобретении предложены соединения структурной формулы (II), приведенной ниже:



(II)

или соль, гидрат, сольват или N-оксид указанных соединений, где

Ar¹, Ar² и Ar³ независимо представляют собой пяти- или шестичленное арильное, гетероарильное или циклоалкильное кольцо;

m равен 0, 1, 2 или 3;

n и p независимо равны 0, 1, 2, 3 или 4;

г и t независимо равны 0, 1 или 2;

Y и Z независимо выбраны из группы, включающей CR^6R^7 , C=O, C=S, C=NOR⁶, O,
5 NR⁶ и S(O)_b;

R¹ выбран из группы, включающей SO₂, C=O, C=S и C=NOR⁴;

X можно выбрать из группы, включающей водород, алкил, замещенный алкил, арил,
10 замещенный арил, арилалкил, замещенный арилалкил, ацил, замещенный ацил,
гетероалкил, замещенный гетероалкил, гетероарил, замещенный гетероарил,
гетероарилалкил, замещенный гетероарилалкил, CN, NO₂, -OR⁶, S(O)_bR⁶, NR⁶R⁷, CONR⁶
R⁷, CO₂R⁶, NR⁶CO₂R⁷, NR⁶CONR⁷R⁸, NR⁶CSNR⁷R⁸, NR⁶C(=NH)NR⁷R⁸, SO₂NR⁵R⁶, NR⁵
15 SO₂R⁶, NR⁵SO₂NR⁶R⁷, B(OR⁵)(OR⁶), P(O)(OR⁵)(OR⁶) и P(O)(R⁵)(OR⁶);

X предпочтительно выбран из группы, включающей водород, гетероалкил,
замещенный гетероалкил, гетероарил, замещенный гетероарил, гетероарилалкил,
замещенный гетероарилалкил, CN, S(O)_bR⁶, CONR⁶R⁷, -CO₂R⁶, SO₂NR⁵R⁶, NR⁵SO₂R⁶,
20 NR⁵SO₂NR⁶R⁷, B(OR⁵)(OR⁶), P(O)(OR⁵)(OR⁶) и P(O)(R⁵)(OR⁶).

каждый R^{1'} независимо выбран из группы, включающей водород, галоген, алкил,
замещенный алкил, арил, замещенный арил, арилалкил, замещенный арилалкил, ацил,
замещенный ацил, гетероалкил, замещенный гетероалкил, гетероарил, замещенный
25 гетероарил, гетероарилалкил, замещенный гетероарилалкил, 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) и P(O)(R⁵)(OR⁶);

каждый R^{2'} независимо выбран из группы, включающей водород, галоген, алкил,
30 замещенный алкил, арил, замещенный арил, арилалкил, замещенный арилалкил, ацил,
замещенный ацил, гетероалкил, замещенный гетероалкил, гетероарил, замещенный
гетероарил, гетероарилалкил, замещенный гетероарилалкил, CN, NO₂, OR⁶, S(O)_bR⁶,
NR⁶R⁷, CONR⁶R⁷, CO₂R⁶, NR⁶CO₂R⁷, NR⁶CONR⁷R⁸, NR⁶CSNR⁷R⁸, NR⁶C(=NH)NR⁷R⁸,
35 SO₂NR⁵R⁶, NR⁵SO₂R⁶, NR⁵SO₂NR⁶R⁷, B(OR⁵)(OR⁶) и P(O)(OR⁵)(OR⁶);

каждый R^{3'} независимо выбран из группы, включающей водород, галоген, алкил,
замещенный алкил, арил, замещенный арил, арилалкил, замещенный арилалкил, ацил,
замещенный ацил, гетероалкил, замещенный гетероалкил, гетероарил, замещенный
40 гетероарил, гетероарилалкил, замещенный гетероарилалкил, 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) и P(O)(R⁵)(OR⁶);

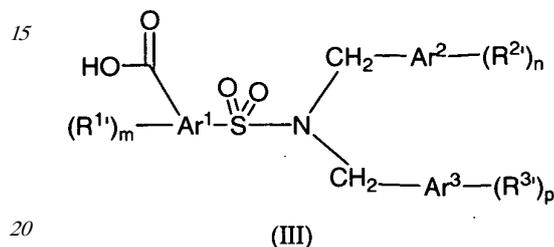
или, альтернативным образом, X и/или по меньшей мере один из R^{1'} совместно с
45 атомами, с которыми они связаны, образуют арильное, замещенное арильное,
гетероарильное, замещенное гетероарильное, циклоалкильное, замещенное
циклоалкильное, циклогетероалкильное или замещенное циклогетероалкильное кольцо,

при этом указанное кольцо может быть конденсировано с еще одним арильным, замещенным арильным, гетероарильным, замещенным гетероарильным, циклоалкильным, замещенным циклоалкильным, циклогетероалкильным или замещенным циклогетероалкильным кольцом;

R^4 - R^8 независимо представляют собой водород, алкил, замещенный алкил, арил, замещенный арил, арилалкил, замещенный арилалкил, гетероалкил, замещенный гетероалкил, гетероарил, замещенный гетероарил, гетероарилалкил или замещенный гетероарилалкил или, альтернативным образом, R^5 и R^6 , R^6 и R^7 , R^7 и R^8 совместно с атомами, с которыми они связаны, образуют циклогетероалкильное или замещенное циклогетероалкильное кольцо;

b равен 0, 1 или 2.

Согласно еще одному аспекту, в изобретении предложены соединения, имеющие структурную формулу (III), приведенную ниже:



или соль, гидрат, сольват или N-оксид указанных соединений, где

Ar¹, Ar² и Ar³ независимо представляют собой пяти- или шестичленное арильное, гетероарильное или циклоалкильное кольцо, при этом Ar² и Ar³ могут отсутствовать;

m равен 0, 1, 2 или 3;

n и p независимо равны 0, 1, 2, 3 или 4;

каждый R^{1'} независимо выбран из группы, включающей водород, галоген, алкил, замещенный алкил, арил, замещенный арил, арилалкил, замещенный арилалкил, ацил, замещенный ацил, гетероалкил, замещенный гетероалкил, гетероарил, замещенный гетероарил, гетероарилалкил, замещенный гетероарилалкил, 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) и P(O)(R⁵)(OR⁶);

каждый R^{2'} независимо выбран из группы, включающей водород, галоген, алкил, замещенный алкил, арил, замещенный арил, арилалкил, замещенный арилалкил, ацил, замещенный ацил, гетероалкил, замещенный гетероалкил, гетероарил, замещенный гетероарил, гетероарилалкил, замещенный гетероарилалкил, 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) и P(O)(R⁵)(OR⁶);

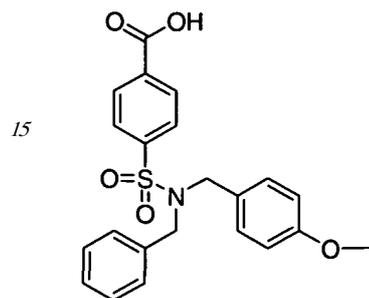
каждый R^{3'} независимо выбран из группы, включающей водород, галоген, алкил, замещенный алкил, арил, замещенный арил, арилалкил, замещенный арилалкил, ацил, замещенный ацил, гетероалкил, замещенный гетероалкил, гетероарил, замещенный гетероарил, гетероарилалкил, замещенный гетероарилалкил, CN, NO₂, OR⁶, S(O)_bR⁶, NR⁶R⁷, CONR⁶R⁷, CO₂R⁶, NR⁶CO₂R⁷, NR⁶CONR⁷R⁸, NR⁶CSNR⁷R⁸, NR⁶C(=NH)NR⁷R⁸,

$\text{SO}_2\text{NR}^5\text{R}^6$, $\text{NR}^5\text{SO}_2\text{R}^6$, $\text{NR}^5\text{SO}_2\text{NR}^6\text{R}^7$, $\text{B}(\text{OR}^5)(\text{OR}^6)$, $\text{P}(\text{O})(\text{OR}^5)(\text{OR}^6)$ и $\text{P}(\text{O})(\text{R}^5)(\text{OR}^6)$;

R^5 - R^8 независимо представляют собой водород, алкил, замещенный алкил, арил, замещенный арил, арилалкил, замещенный арилалкил, гетероалкил, замещенный гетероалкил, гетероарил, замещенный гетероарил, гетероарилалкил или замещенный гетероарилалкил или, альтернативным образом, R^5 и R^6 , R^6 и R^7 , R^7 и R^8 совместно с атомами, с которыми они связаны, образуют циклогетероалкильное или замещенное циклогетероалкильное кольцо;

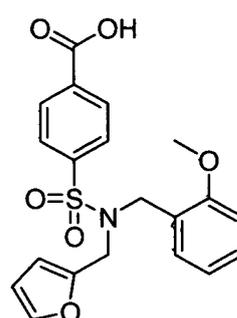
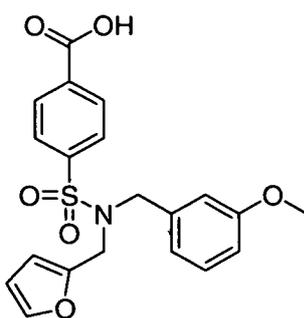
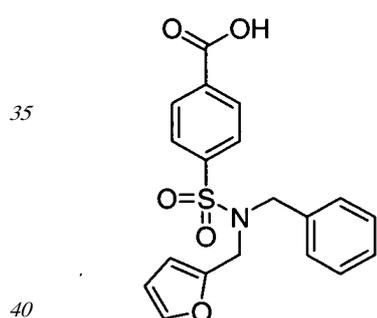
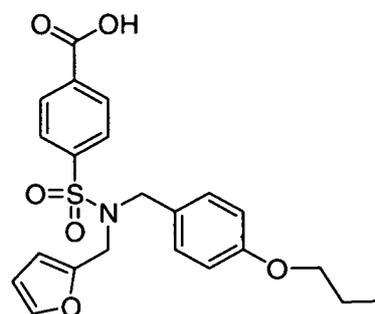
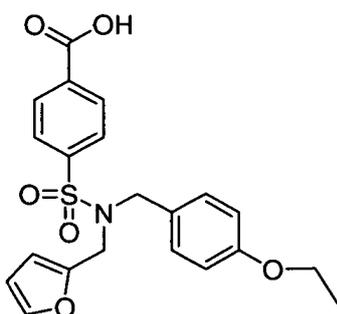
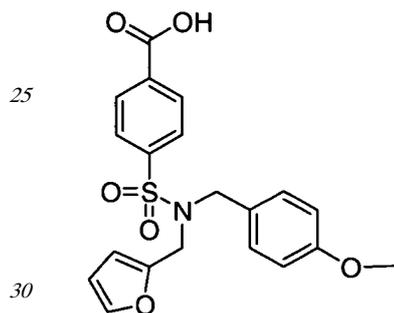
b равен 0, 1 или 2.

Согласно еще одному аспекту, в изобретении предложено соединение, имеющее структуру, представленную ниже:



20 или соль, гидрат, сольват или N-оксид указанного соединения.

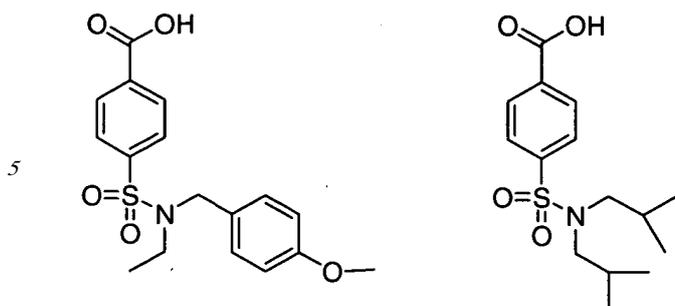
Согласно еще одному аспекту, в изобретении предложены соединения, имеющие структуру, представленную ниже:



или соль, гидрат, сольват или N-оксид указанных соединений.

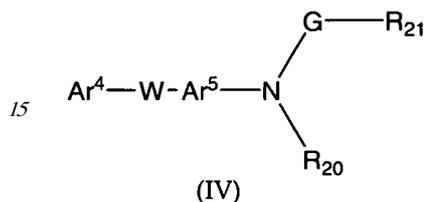
Согласно другим вариантам реализации, в изобретении предложены соединения, имеющие структуру, представленную ниже:

45



или соль, гидрат, сольват или N-оксид указанных соединений.

10 Согласно родственному аспекту, предложено соединение структурной формулы (IV):



или соль, гидрат, сольват или N-оксид указанного соединения, где

20 Ar⁴ и Ar⁵ независимо представляют собой пяти- или шестичленное арильное или гетероарильное кольцо;

W выбран из группы, включающей CR⁶R⁷, C=O, C=S, C=NOR⁶; O, NR⁶, S, SO, SO₂ и (CH₂)_n;

n равен 0, 1, 2 или 3;

25 G выбран из группы, включающей CR⁶R⁷, C=O, C=S, C=NOR⁶ и S(O)_b;

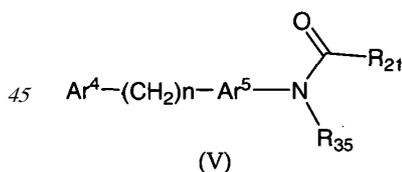
R²⁰ выбран из группы, включающей водород, арилалкенил, гетероарилалкенил, арилалкил, гетероарилалкил, арил, гетероарил, алкил, алкокси-алкил, алкенил, циклоалкил, циклоалкенил и замещенные производные;

30 R²¹ выбран из группы, включающей арилалкенил, гетероарилалкенил, арилалкил, гетероарилалкил, арил, гетероарил, алкил, алкокси-алкил, алкенил, циклоалкил, циклоалкенил и замещенные производные;

R⁶ и R⁷ независимо выбраны из группы, включающей водород, алкил, замещенный алкил, арил, замещенный арил, арилалкил, замещенный арилалкил, гетероалкил, замещенный гетероалкил, гетероарил, замещенный гетероарил, гетероарилалкил или замещенный гетероарилалкил, или, альтернативным образом, R⁶ и R⁷ совместно с атомами, с которыми они связаны, образуют циклогетероалкильное или замещенное циклогетероалкильное кольцо; и

40 b равен 0, 1 или 2.

Согласно еще одному родственному аспекту, предложено соединение структурной формулы (V):



или соль, гидрат, сольват или N-оксид указанного соединения, где

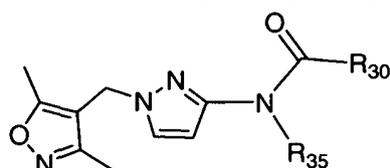
Ar^4 и Ar^5 независимо представляют собой пяти- или шестичленное арильное или гетероарильное кольцо;

n равен 0, 1, 2 или 3;

R^{21} выбран из группы, включающей арилалкенил, гетероарилалкенил, арилалкил, гетероарилалкил, арил, гетероарил, алкил, алкокси-алкил, алкенил, циклоалкил, циклоалкенил и замещенные производные;

R^{35} выбран из группы, включающей водород, алкил и замещенный алкил.

Согласно дополнительному варианту реализации, в изобретении предложено соединение структурной формулы (VI)



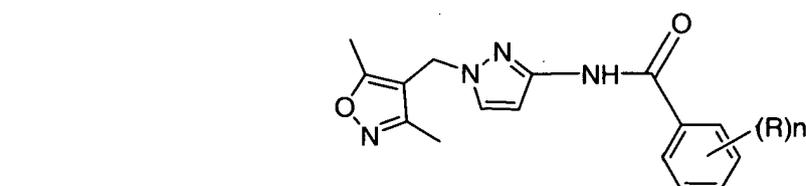
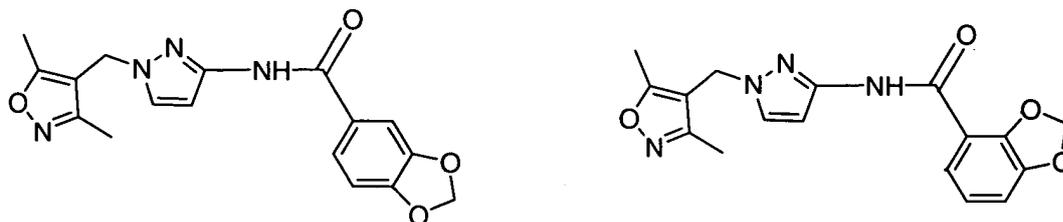
(VI)

или соль, гидрат, сольват или N-оксид указанного соединения, где

R^{30} выбран из группы, включающей арилалкенил, гетероарилалкенил, арилалкил, гетероарилалкил, арил, гетероарил, алкил, алкокси-алкил, алкенил, циклоалкил, циклоалкенил и замещенные производные;

R^{35} выбран из группы, включающей водород, алкил и замещенный алкил.

Согласно дополнительному варианту реализации, в изобретении предложены соединения, имеющие структуру, представленную ниже:



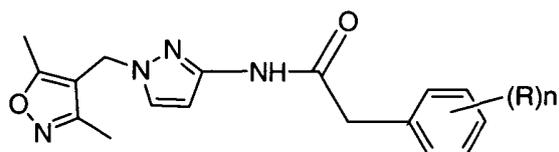
или соль, гидрат, сольват или N-оксид указанных соединений,

где каждый R независимо представляет собой Cl, MeO, CN, EtO, OH, Me, $-SO_2Me$, F

или H, и

n равен 0, 1, 2, 3 или 4.

Согласно другим вариантам реализации, в изобретении предложены соединения, имеющие структуру, представленную ниже:

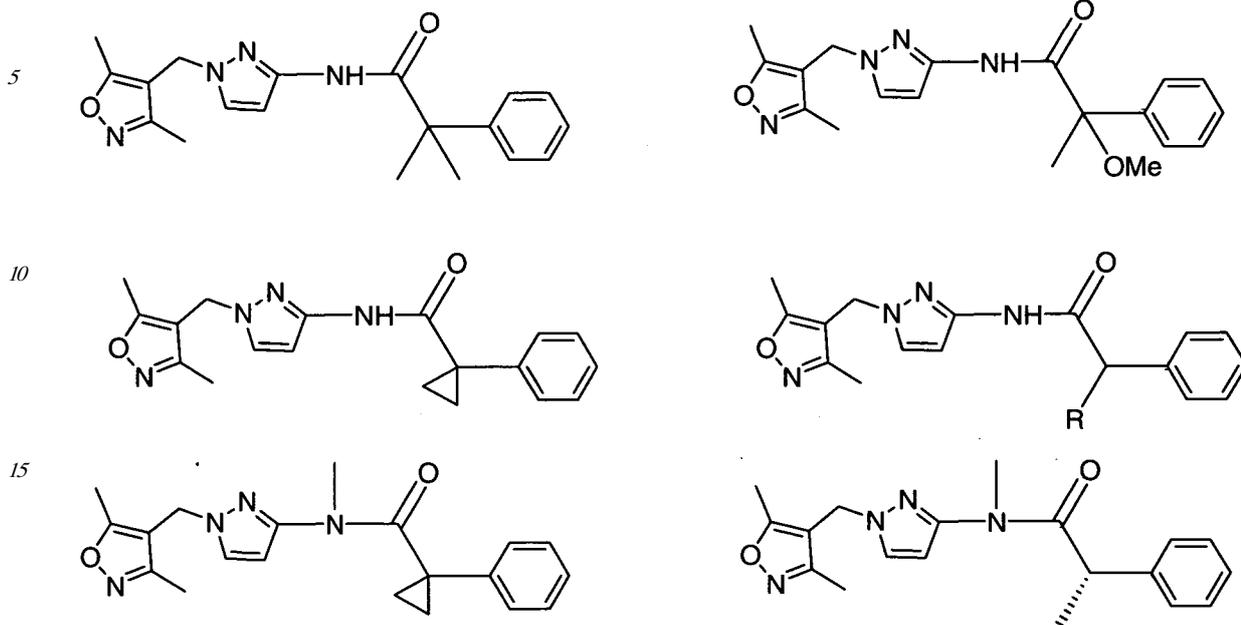


или соль, гидрат, сольват или N-оксид указанных соединений,

где каждый R независимо представляет собой MeO или OH, и

n равен 0, 1, 2, 3 или 4.

Согласно другим вариантам реализации, в изобретении предложены соединения, имеющие структуру, представленную ниже:



или соль, гидрат, сольват или N-оксид указанных соединений, где R представляет собой H, Me, Et, OCOMe, CH₂OH, OMe или Ph.

Согласно следующим вариантам реализации, в изобретении предложены соединения, имеющие структуру, представленную ниже:

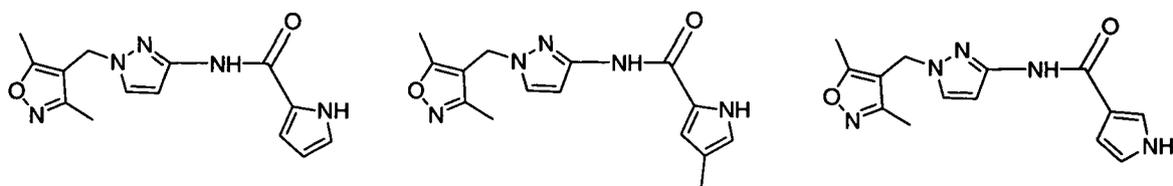
25

30

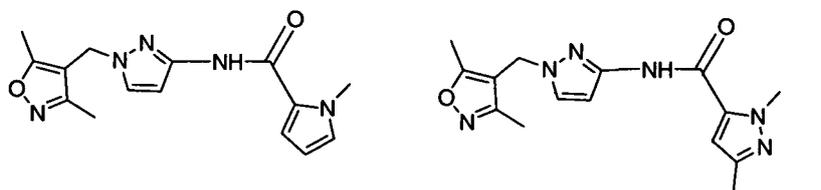
35

40

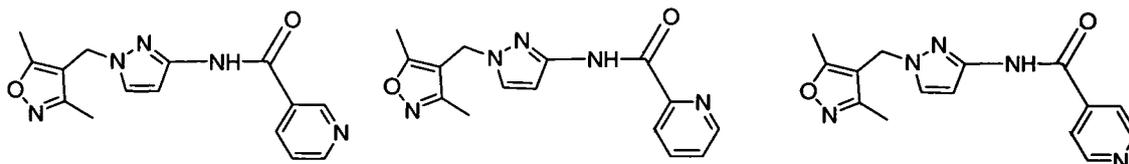
45



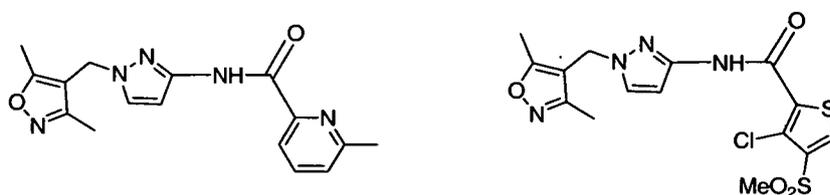
5



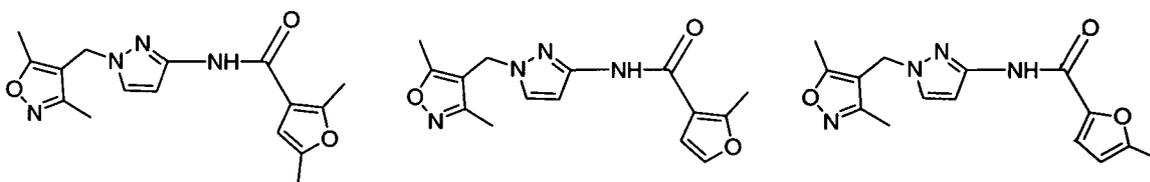
10



15



20

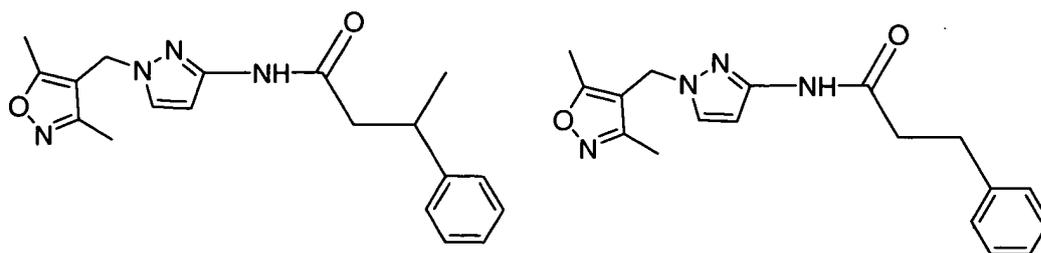


25

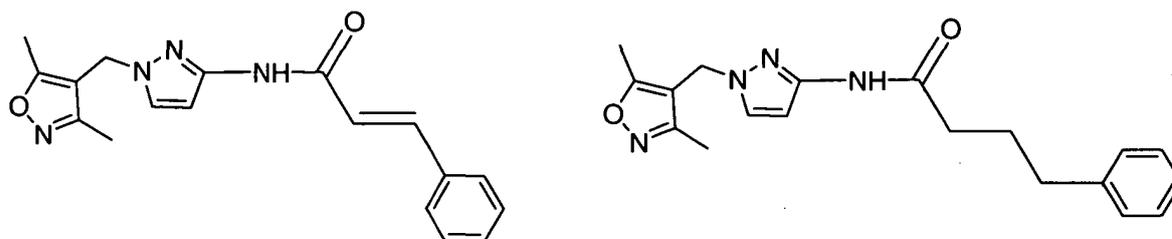
или соль, гидрат, сольват или N-оксид указанных соединений.

30 Согласно другим вариантам реализации, в изобретении предложены соединения, имеющие структуру, представленную ниже:

30

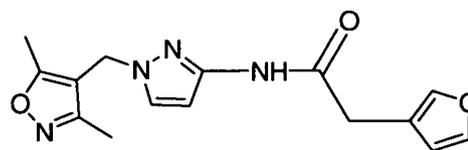
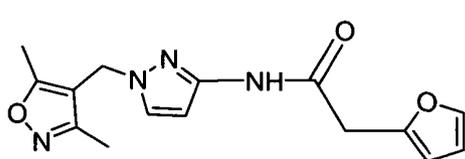


35



40

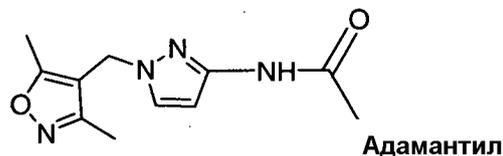
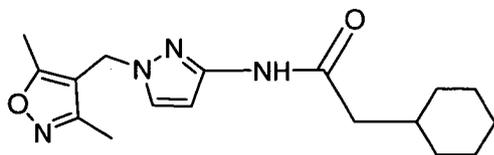
45



5

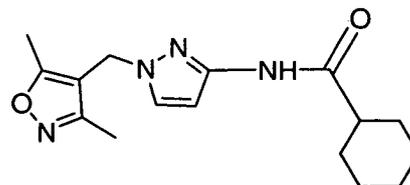
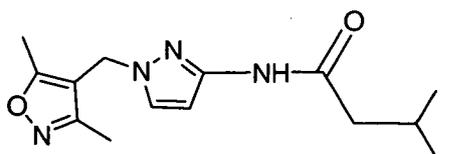
или соль, гидрат, сольват или N-оксид указанных соединений.

Согласно другим вариантам реализации, в изобретении предложены соединения, имеющие структуру, представленную ниже:



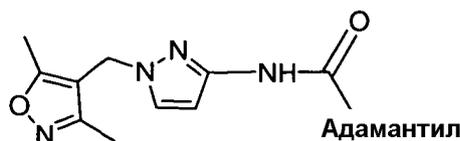
10

Адамантил



15

20

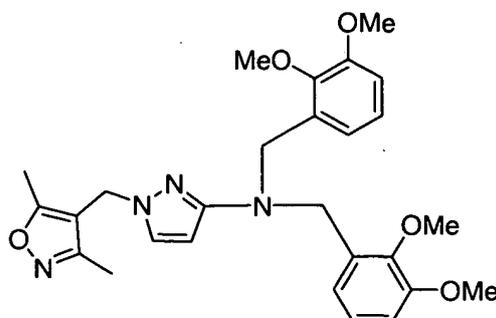
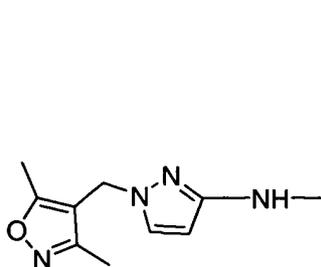


Адамантил

25

или соль, гидрат, сольват или N-оксид указанных соединений.

Согласно следующим вариантам реализации, в изобретении предложены соединения, имеющие структуру, представленную ниже:

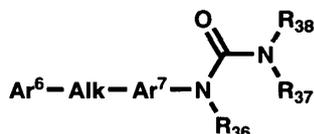


30

35

или соль, гидрат, сольват или N-оксид указанных соединений.

Согласно одному аспекту, настоящее изобретение относится к соединению формулы:



40

или соли, гидрату, сольвату, N-оксиду или пролекарству указанного соединения, где Ar^6 и Ar^7 , которые могут быть одинаковыми или различными независимо друг от друга, представляют собой пяти- или шестичленную арильную группу или пяти- или шестичленную гетероарильную группу;

45

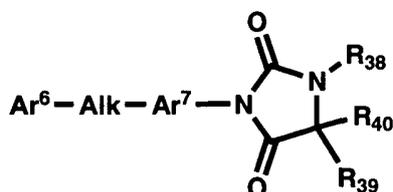
Alk представляет собой алкильную группу, необязательно содержащую гетероатом; R_{36} и R_{37} , которые могут быть одинаковыми или различными независимо друг от

друга, представляют собой Н, алкил, или R₃₆ и R₃₇ совместно с атомами, к которым они присоединены, образуют необязательно замещенный пяти- или шестичленный гетероцикл; и

R₃₈ представляет собой Н, замещенный или незамещенный алкил, замещенный или незамещенный циклоалкилалкил, замещенный или незамещенный гетероциклоалкилалкил, замещенный или незамещенный арил, замещенный или незамещенный ариламидоалкил, замещенный или незамещенный гетероариламидоалкил, замещенный или незамещенный арилалкил, замещенный или незамещенный арилалкокси, замещенный или незамещенный гетероарил, замещенный или незамещенный гетероарилалкил или галогеналкил.

Согласно одному аспекту, соединения согласно изобретению содержат пятичленный гетероцикл. Согласно одному варианту реализации, пятичленный гетероцикл представляет собой гидантоин или замещенную или незамещенную циклическую мочевины.

Согласно одному варианту реализации, гидантоин представляет собой гидантоин формулы:



или соль, гидрат, сольват, N-оксид или пролекарство указанного соединения,

где Ar⁶ и Ar⁷, которые могут быть одинаковыми или различными независимо друг от друга, представляют собой пяти- или шестичленную арильную группу или пяти- или шестичленную гетероарильную группу;

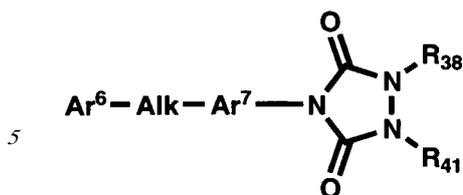
Alk представляет собой алкильную группу, необязательно содержащую гетероатом;

R₃₈ представляет собой Н, замещенный или незамещенный алкил, замещенный или незамещенный циклоалкилалкил, замещенный или незамещенный гетероциклоалкилалкил, замещенный или незамещенный арил, замещенный или незамещенный ариламидоалкил, замещенный или незамещенный гетероариламидоалкил, замещенный или незамещенный арилалкил, замещенный или незамещенный арилалкокси, замещенный или незамещенный гетероарил, замещенный или незамещенный гетероарилалкил или галогеналкил; и

R₃₉ и R₄₀, которые могут быть одинаковыми или различными независимо друг от друга, представляют собой Н, замещенный или незамещенный алкил, замещенный или незамещенный циклоалкилалкил, замещенный или незамещенный гетероциклоалкилалкил, замещенный или незамещенный арил, замещенный или незамещенный ариламидоалкил, замещенный или незамещенный арилалкиламидоалкил, замещенный или незамещенный гетероариламидоалкил, замещенный или незамещенный гетероарилалкиламидоалкил, замещенный или незамещенный арилалкил, замещенный или незамещенный арилалкокси, замещенный или незамещенный гетероарил, замещенный или незамещенный гетероарилалкил, галогеналкил, или R₃₉ и R₄₀ совместно с атомом углерода, к которому они присоединены, образуют C=O группу или замещенную или незамещенную алкенильную группу.

Согласно еще одному аспекту, соединения согласно изобретению содержат пятичленный гетероцикл, который представляет собой уразол. Согласно одному

варианту реализации, уразол представляет собой уразол формулы:



или соль, гидрат, сольват, N-оксид или пролекарство указанного соединения,

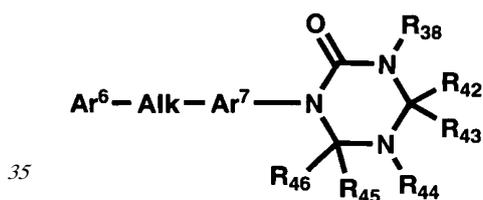
где Ar^6 и Ar^7 , которые могут быть одинаковыми или различными независимо друг от друга, представляют собой пяти- или шестичленную арильную группу или пяти- или шестичленную гетероарильную группу;

Alk представляет собой алкильную группу, необязательно содержащую гетероатом;

R_{38} представляет собой H, замещенный или незамещенный алкил, замещенный или незамещенный циклоалкилалкил, замещенный или незамещенный гетероциклоалкилалкил, замещенный или незамещенный арил, замещенный или незамещенный ариламидаалкил, замещенный или незамещенный гетероариламидаалкил, замещенный или незамещенный арилалкил, замещенный или незамещенный арилалкоксо, замещенный или незамещенный гетероарил, замещенный или незамещенный гетероарилалкил или галогеналкил; и

R_{41} представляет собой H, замещенный или незамещенный алкил, замещенный или незамещенный циклоалкилалкил, замещенный или незамещенный гетероциклоалкилалкил, замещенный или незамещенный арил, замещенный или незамещенный ариламидаалкил, замещенный или незамещенный арилалкиламидаалкил, замещенный или незамещенный гетероариламидаалкил, замещенный или незамещенный гетероарилалкиламидаалкил, замещенный или незамещенный арилалкил, замещенный или незамещенный арилалкоксо, замещенный или незамещенный гетероарил, замещенный или незамещенный гетероарилалкил или галогеналкил.

Согласно еще одному аспекту, соединения согласно изобретению содержат шестичленный гетероцикл. Согласно одному варианту реализации, шестичленный гетероцикл представляет собой шестичленный гетероцикл формулы:



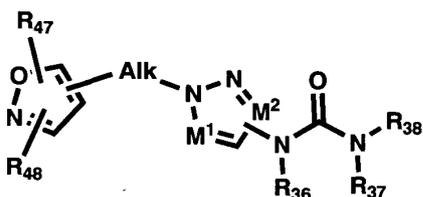
или соль, гидрат, сольват, N-оксид или пролекарство указанного соединения,

где R_{38} представляет собой H, замещенный или незамещенный алкил, замещенный или незамещенный циклоалкилалкил, замещенный или незамещенный гетероциклоалкилалкил, замещенный или незамещенный арил, замещенный или незамещенный ариламидаалкил, замещенный или незамещенный гетероариламидаалкил, замещенный или незамещенный арилалкил, замещенный или незамещенный арилалкоксо, замещенный или незамещенный гетероарил, замещенный или незамещенный гетероарилалкил или галогеналкил; и

R_{42} , R_{43} , R_{44} , R_{45} и R_{46} , которые могут быть одинаковыми или различными независимо друг от друга, представляют собой H, замещенный или незамещенный алкил, замещенный или незамещенный циклоалкилалкил, замещенный или незамещенный арилалкил, замещенный или незамещенный арилалкоксо, замещенный или

незамещенный гетероарил, замещенный или незамещенный гетероарилалкил, или R₄₂ и R₄₃ или R₄₅ и R₄₆ совместно с атомами углерода, к которым они оба присоединены, образуют C=O группу.

Согласно еще одному аспекту, изобретение относится к соединению формулы:



или соли, гидрату, сольвату, N-оксиду или пролекарству указанного соединения, где Alk представляет собой алкильную группу, необязательно содержащую гетероатом;

M¹ представляет собой N или CR₄₉, где R₄₉ представляет собой H или замещенный или незамещенный алкил;

M² представляет собой N или CR₅₀, где R₅₀ представляет собой H или замещенный или незамещенный алкил;

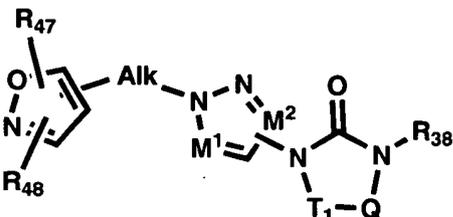
R₃₆ и R₃₇, которые могут быть одинаковыми или различными независимо друг от друга, представляют собой H, алкил, или R₃₆ и R₃₇ совместно с атомами, к которым они присоединены, образуют необязательно замещенный пяти- или шестичленный гетероцикл; и

R₃₈ представляет собой H, замещенный или незамещенный алкил, замещенный или незамещенный циклоалкил алкил, замещенный или незамещенный гетероциклоалкилалкил, замещенный или незамещенный арил, замещенный или незамещенный ариламидоалкил, замещенный или незамещенный гетероариламидоалкил, замещенный или незамещенный арилалкил, замещенный или незамещенный арилалкокси, замещенный или незамещенный гетероарил, замещенный или незамещенный гетероарилалкил или галогеналкил;

R₄₇ представляет собой H, замещенный или незамещенный алкил, замещенный или незамещенный алкокси, замещенный или незамещенный арил, замещенный или незамещенный арилалкил или галоген; и

R₄₈ представляет собой H, замещенный или незамещенный алкил, замещенный или незамещенный алкокси, замещенный или незамещенный арил, замещенный или незамещенный арилалкил или галоген.

Согласно еще одному аспекту, изобретение относится к соединению формулы:



или соли, гидрату, сольвату, N-оксиду или пролекарству указанного соединения, где Alk представляет собой алкильную группу, необязательно содержащую гетероатом;

T₁ представляет собой C=O, и Q представляет собой CR₅₁R₅₂ или NR₅₁, где R₅₁ и R₅₂, которые могут быть одинаковыми или различными независимо друг от друга,

представляют собой Н, замещенный или незамещенный алкил, замещенный или незамещенный циклоалкилалкил, замещенный или незамещенный гетероциклоалкилалкил, замещенный или незамещенный арил, замещенный или незамещенный ариламидоалкил, замещенный или незамещенный арилалкиламидоалкил, замещенный или незамещенный гетероариламидоалкил, замещенный или незамещенный гетероарилалкиламидоалкил, замещенный или незамещенный арилалкил, замещенный или незамещенный арилалкоксокси, замещенный или незамещенный гетероарил, замещенный или незамещенный гетероарилалкил, галогеналкил, или R₅₁ и R₅₂ совместно с атомом углерода, к которому они присоединены, образуют С=О группу или замещенную или незамещенную алкенильную группу;

M¹ представляет собой N или CR₄₉, где R₄₉ представляет собой Н или замещенный или незамещенный алкил;

M² представляет собой N или CR₅₀, где R₅₀ представляет собой Н или замещенный или незамещенный алкил;

R₃₈ представляет собой Н, замещенный или незамещенный алкил, замещенный или незамещенный циклоалкилалкил, замещенный или незамещенный гетероциклоалкилалкил, замещенный или незамещенный арил, замещенный или незамещенный ариламидоалкил, замещенный или незамещенный гетероариламидоалкил, замещенный или незамещенный арилалкил, замещенный или незамещенный арилалкоксокси, замещенный или незамещенный гетероарил, замещенный или незамещенный гетероарилалкил или галогеналкил;

R₄₇ представляет собой Н, замещенный или незамещенный алкил, замещенный или незамещенный алкоксокси, замещенный или незамещенный арил, замещенный или незамещенный арилалкил или галоген; и

R₄₈ представляет собой Н, замещенный или незамещенный алкил, замещенный или незамещенный алкоксокси, замещенный или незамещенный арил, замещенный или незамещенный арилалкил или галоген.

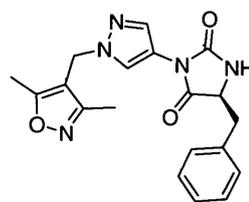
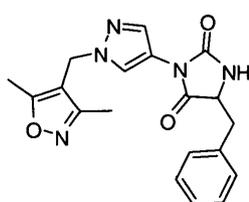
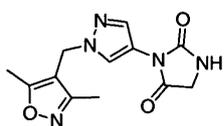
Согласно еще одному варианту реализации, изобретение относится к соединению формулы:

35

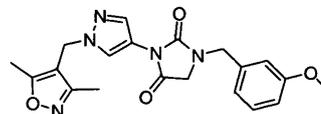
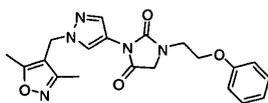
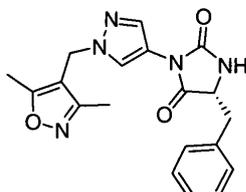
40

45

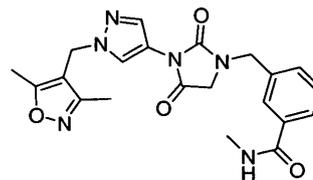
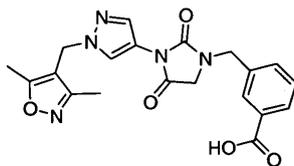
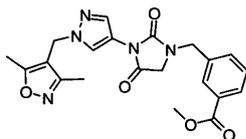
5



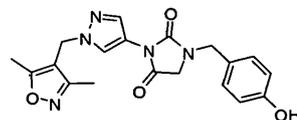
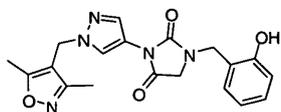
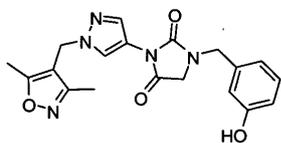
10



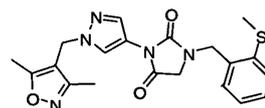
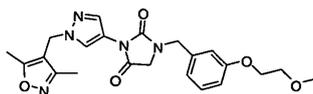
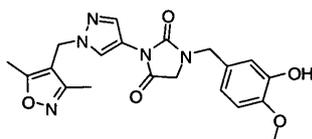
15



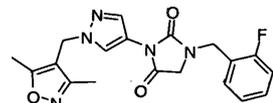
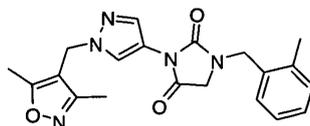
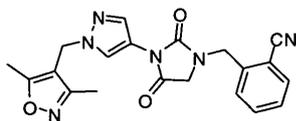
20



25



30

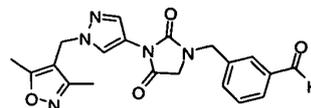
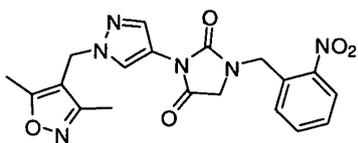
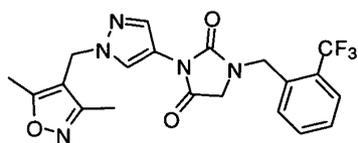


35

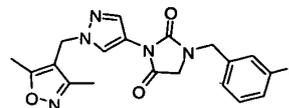
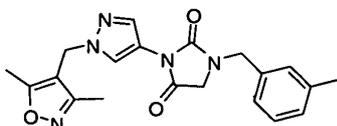
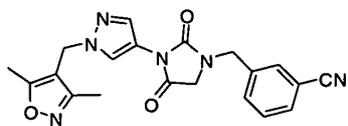
40

45

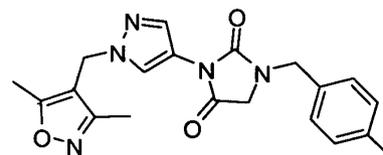
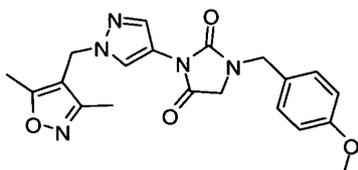
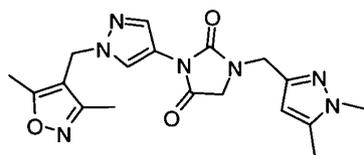
5



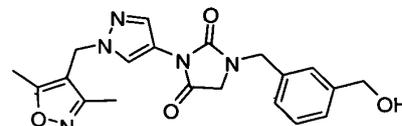
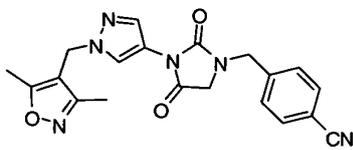
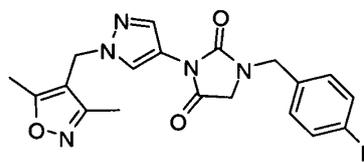
10



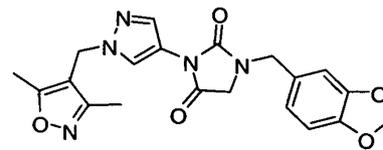
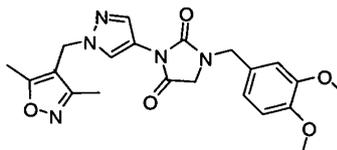
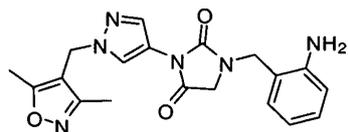
15



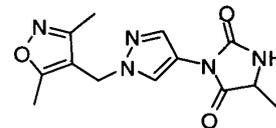
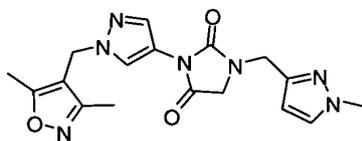
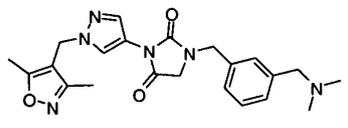
20



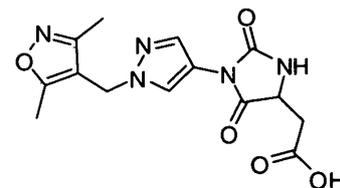
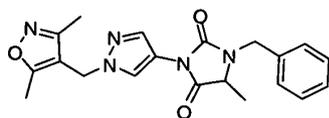
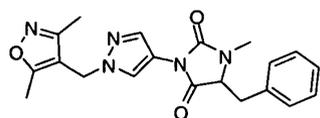
25



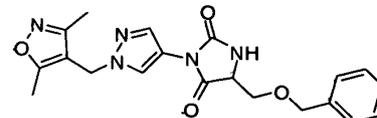
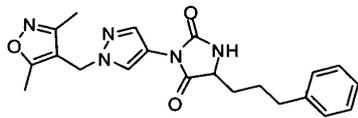
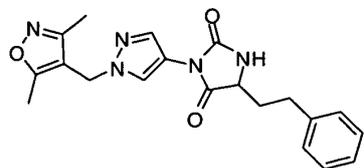
30



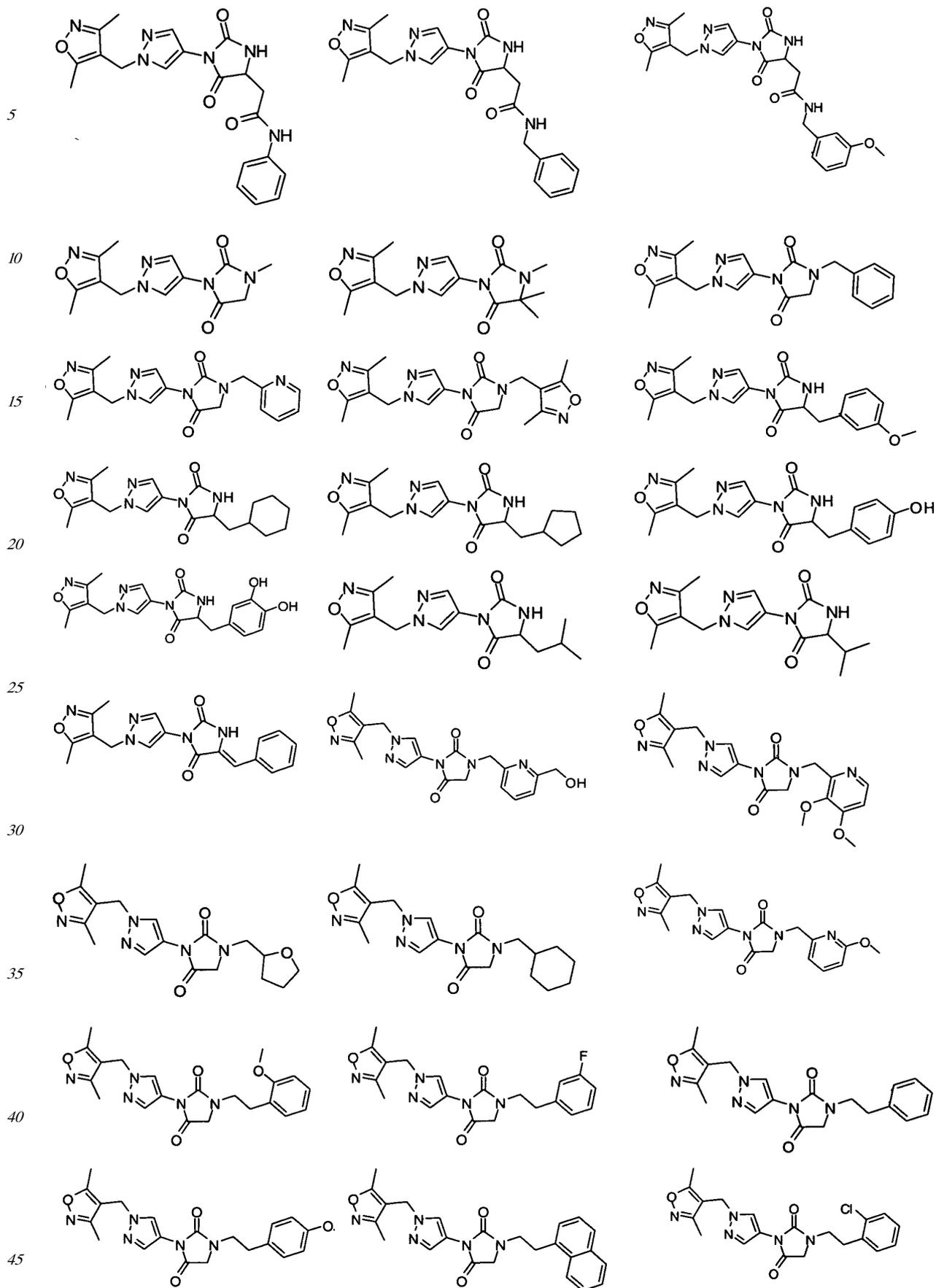
35



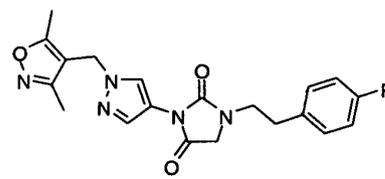
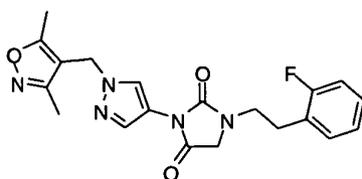
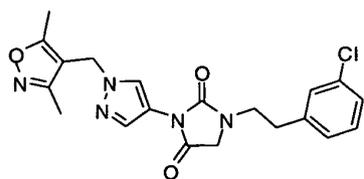
40



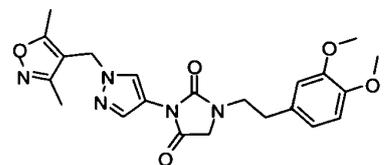
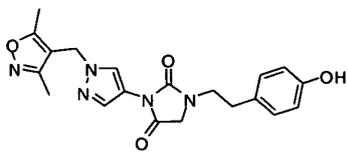
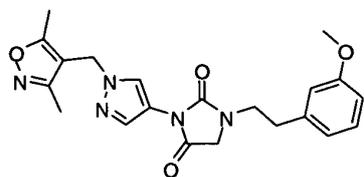
45



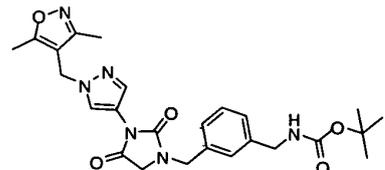
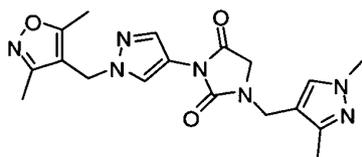
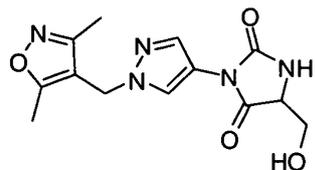
5



10

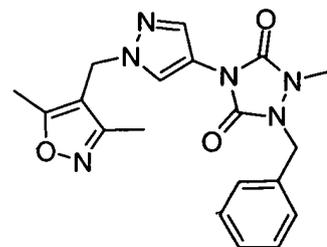
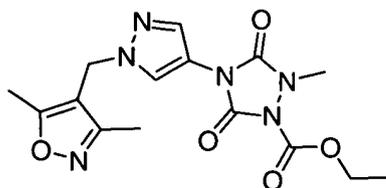
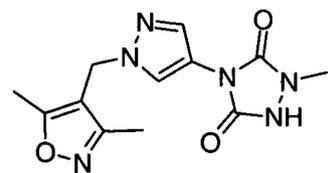


15

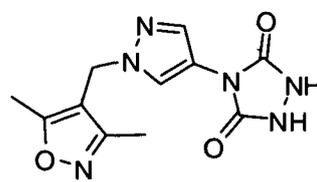
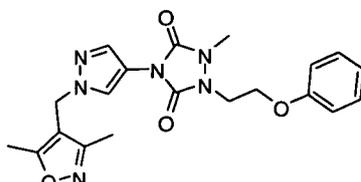
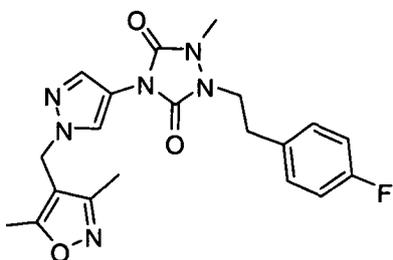


или соли, гидрату, сольвату, N-оксиду или пролекарству указанного соединения.
Согласно еще одному аспекту, изобретение относится к соединению формулы:

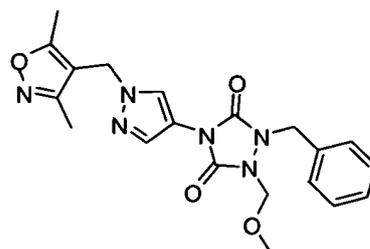
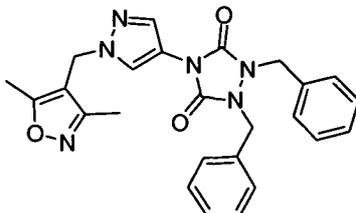
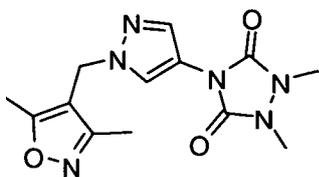
20



25



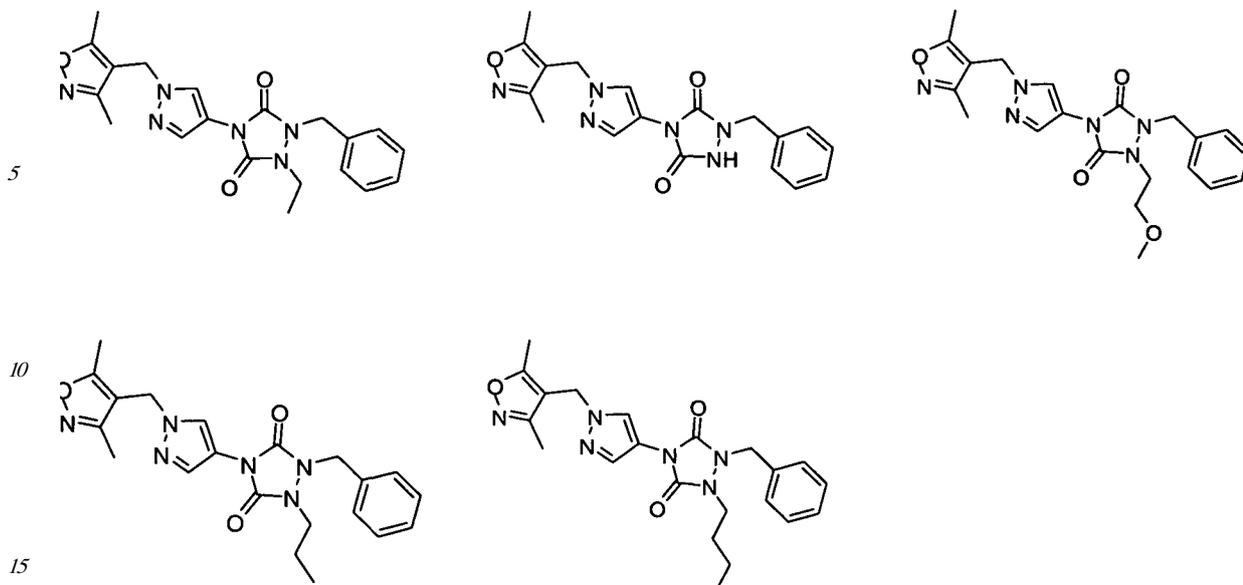
30



35

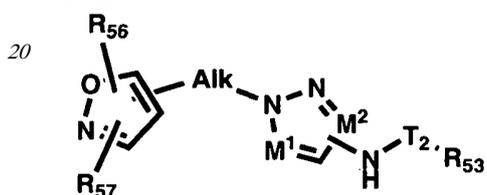
40

45



или соли, гидрату, сольвату, N-оксиду или пролекарству указанного соединения.

Согласно еще одному аспекту, изобретение относится к способу получения соединения формулы:



или соли, гидрата, сольвата, N-оксида или пролекарства указанного соединения, где Alk представляет собой алкильную группу, необязательно содержащую гетероатом;

T₂ представляет собой C=S, C=O или S(O)₂;

R₅₃ представляет собой замещенный или незамещенный алкил, замещенный или незамещенный циклоалкил, замещенный или незамещенный гетероарил, замещенный или незамещенный арил или замещенный или незамещенный арилалкил;

M¹ представляет собой N или CR₅₄, где R₅₄ представляет собой H или замещенный или незамещенный алкил;

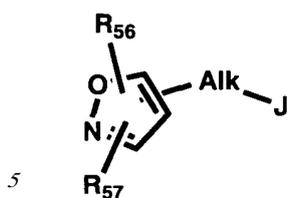
M² представляет собой N или CR₅₅, где R₅₅ представляет собой H или замещенный или незамещенный алкил;

R₅₆ представляет собой H, замещенный или незамещенный алкил, замещенный или незамещенный алкокси, замещенный или незамещенный арил, замещенный или незамещенный арилалкил или галоген; и

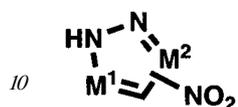
R₅₇ представляет собой H, замещенный или незамещенный алкил, замещенный или незамещенный алкокси, замещенный или незамещенный арил, замещенный или незамещенный арилалкил или галоген;

при этом указанный способ включает взаимодействие соединения формулы:

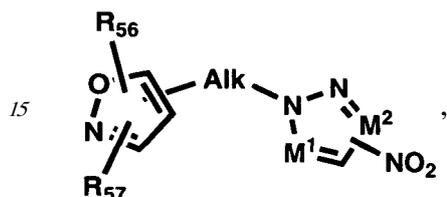
45



где R_{56} , R_{57} и Alk определены выше, и J представляет собой уходящую группу;
с соединением формулы:

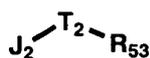


где M^1 и M^2 определены выше, с получением соединения формулы



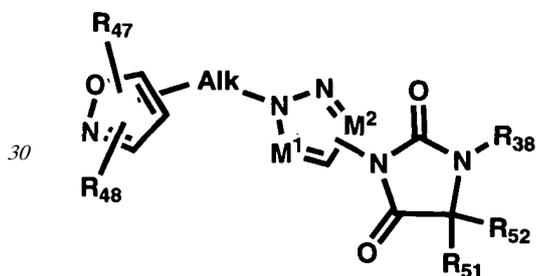
содержащего NO_2 группу;

восстановление NO_2 группы с получением соединения, содержащего NH_2 группу; и
20 взаимодействие соединения, содержащего NH_2 группу, с соединением формулы



где J_2 представляет собой уходящую группу, и T_2 и R_{53} определены выше.

Согласно еще одному аспекту, изобретение относится к способу получения соединения
формулы:



35 или соли, гидрата, сольвата, N-оксида или пролекарства указанного соединения,
где Alk представляет собой алкильную группу, необязательно содержащую
гетероатом;

R_{51} и R_{52} , которые могут быть одинаковыми или различными независимо друг от
друга, представляют собой H, замещенный или незамещенный алкил, замещенный или
40 незамещенный циклоалкилалкил, замещенный или незамещенный
гетероциклоалкилалкил, замещенный или незамещенный арил, замещенный или
незамещенный ариламиноалкил, замещенный или незамещенный арилалкиламиноалкил,
замещенный или незамещенный гетероариламиноалкил, замещенный или незамещенный
гетероарилалкиламиноалкил, замещенный или незамещенный арилалкил, замещенный
45 или незамещенный арилалкокси, замещенный или незамещенный гетероарил,
замещенный или незамещенный гетероарилалкил, галогеналкил, или R_{51} и R_{52} совместно
с атомом углерода, к которому они присоединены, образуют замещенную или
незамещенную алкильную группу;

M^1 представляет собой N или CR_{49} , где R_{49} представляет собой H или замещенный или незамещенный алкил;

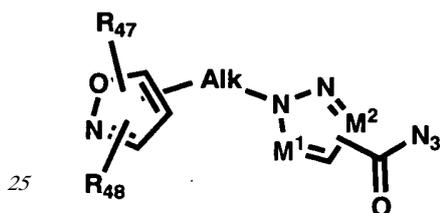
M^2 представляет собой N или CR_{50} , где R_{50} представляет собой H или замещенный или незамещенный алкил;

R_{38} представляет собой H, замещенный или незамещенный алкил, замещенный или незамещенный циклоалкилалкил, замещенный или незамещенный гетероциклоалкилалкил, замещенный или незамещенный арил, замещенный или незамещенный ариламиноалкил, замещенный или незамещенный гетероариламиноалкил, замещенный или незамещенный арилалкил, замещенный или незамещенный арилалкокси, замещенный или незамещенный гетероарил, замещенный или незамещенный гетероарилалкил или галогеналкил;

R_{47} представляет собой H, замещенный или незамещенный алкил, замещенный или незамещенный алкокси, замещенный или незамещенный арил, замещенный или незамещенный арилалкил или галоген; и

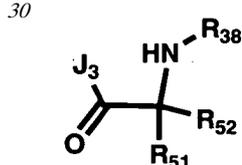
R_{48} представляет собой H, замещенный или незамещенный алкил, замещенный или незамещенный алкокси, замещенный или незамещенный арил, замещенный или незамещенный арилалкил или галоген;

при этом указанный способ включает нагревание соединения формулы:



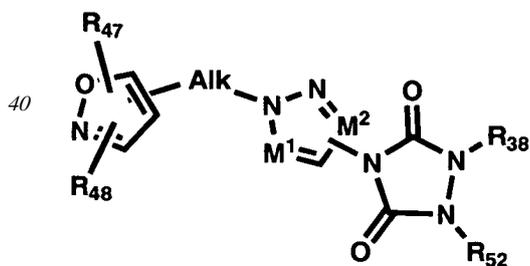
где R_{47} , R_{48} , Alk, M^1 и M^2 определены выше;

для превращения $-CON_3$ группы в $-N=C=O$ группу, и последующее взаимодействие с соединением формулы:



где J_3 представляет собой уходящую группу, и R_{38} , R_{51} и R_{52} определены выше.

Согласно еще одному аспекту, изобретение относится к способу получения соединения формулы:



или соли, гидрата, сольвата, N-оксида или пролекарства указанного соединения, где Alk представляет собой алкильную группу, необязательно содержащую гетероатом;

R_{52} представляет собой H, замещенный или незамещенный алкил, замещенный или

незамещенный циклоалкилалкил, замещенный или незамещенный
 гетероциклоалкилалкил, замещенный или незамещенный арил, замещенный или
 незамещенный ариламидоалкил, замещенный или незамещенный арилалкиламидоалкил,
 замещенный или незамещенный гетероариламидоалкил, замещенный или незамещенный
 5 гетероарилалкиламидоалкил, замещенный или незамещенный арилалкил, замещенный
 или незамещенный арилалкокси, замещенный или незамещенный гетероарил,
 замещенный или незамещенный гетероарилалкил, галогеналкил;

M^1 представляет собой N или CR_{49} , где R_{49} представляет собой H или замещенный
 10 или незамещенный алкил;

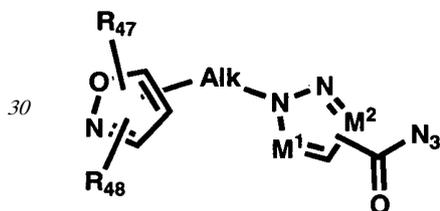
M^2 представляет собой N или CR_{50} , где R_{50} представляет собой H или замещенный
 или незамещенный алкил;

R_{38} представляет собой H, замещенный или незамещенный алкил, замещенный или
 15 незамещенный циклоалкилалкил, замещенный или незамещенный
 гетероциклоалкилалкил, замещенный или незамещенный арил, замещенный или
 незамещенный ариламидоалкил, замещенный или незамещенный гетероариламидоалкил,
 замещенный или незамещенный арилалкил, замещенный или незамещенный
 арилалкокси, замещенный или незамещенный гетероарил, замещенный или
 незамещенный гетероарилалкил или галогеналкил;

R_{47} представляет собой H, замещенный или незамещенный алкил, замещенный или
 20 незамещенный алкокси, замещенный или незамещенный арил, замещенный или
 незамещенный арилалкил или галоген; и

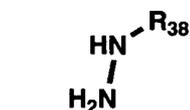
R_{48} представляет собой H, замещенный или незамещенный алкил, замещенный или
 25 незамещенный алкокси, замещенный или незамещенный арил, замещенный или
 незамещенный арилалкил или галоген;

при этом указанный способ включает нагревание соединения формулы:



где R_{47} , R_{48} , Alk, M^1 и M^2 определены выше;

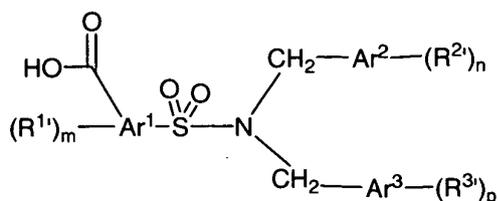
35 для превращения $-CON_3$ группы в $-N=C=O$ группу, и последующее взаимодействие
 с гидразином формулы:



где R_{38} определен выше.

Согласно еще одному аспекту, изобретение относится к способу получения соединения
 формулы:

45



(III)

или соли, гидрата, сольвата или N-оксида указанного соединения, где

Ar^1 , Ar^2 и Ar^3 независимо представляют собой пяти- или шестичленное арильное,

гетероарильное или циклоалкильное кольцо, при этом Ar^2 и Ar^3 могут отсутствовать;
 m равен 0, 1, 2 или 3;

n и p независимо равны 0, 1, 2, 3 или 4;

каждый $\text{R}^{1'}$ независимо выбран из группы, включающей водород, галоген, алкил, замещенный алкил, арил, замещенный арил, арилалкил, замещенный арилалкил, ацил, замещенный ацил, гетероалкил, замещенный гетероалкил, гетероарил, замещенный

гетероарил, гетероарилалкил, замещенный гетероарилалкил, CN , NO_2 , OR^6 , $\text{S}(\text{O})_b\text{R}^6$, NR^6R^7 , CONR^6R^7 , CO_2R^6 , $\text{NR}^6\text{CO}_2\text{R}^7$, $\text{NR}^6\text{CONR}^7\text{R}^8$, $\text{NR}^6\text{CSNR}^7\text{R}^8$, $\text{NR}^6\text{C}(=\text{NH})\text{NR}^7\text{R}^8$,

$\text{SO}_2\text{NR}^5\text{R}^6$, $\text{NR}^5\text{SO}_2\text{R}^6$, $\text{NR}^5\text{SO}_2\text{NR}^6\text{R}^7$, $\text{B}(\text{OR}^5)(\text{OR}^6)$, $\text{P}(\text{O})(\text{OR}^5)(\text{OR}^6)$ и $\text{P}(\text{O})(\text{R}^5)(\text{OR}^6)$;

каждый $\text{R}^{2'}$ независимо выбран из группы, включающей водород, галоген, алкил, замещенный алкил, арил, замещенный арил, арилалкил, замещенный арилалкил, ацил, замещенный ацил, гетероалкил, замещенный гетероалкил, гетероарил, замещенный

гетероарил, гетероарилалкил, замещенный гетероарилалкил, CN , NO_2 , OR^6 , $\text{S}(\text{O})_b\text{R}^6$, NR^6R^7 , CONR^6R^7 , CO_2R^6 , $\text{NR}^6\text{CO}_2\text{R}^7$, $\text{NR}^6\text{CONR}^7\text{R}^8$, $\text{NR}^6\text{CSNR}^7\text{R}^8$, $\text{NR}^6\text{C}(=\text{NH})\text{NR}^7\text{R}^8$,

$\text{SO}_2\text{NR}^5\text{R}^6$, $\text{NR}^5\text{SO}_2\text{R}^6$, $\text{NR}^5\text{SO}_2\text{NR}^6\text{R}^7$, $\text{B}(\text{OR}^5)(\text{OR}^6)$, $\text{P}(\text{O})(\text{OR}^5)(\text{OR}^6)$ и $\text{P}(\text{O})(\text{R}^5)(\text{OR}^6)$;

каждый $\text{R}^{3'}$ независимо выбран из группы, включающей водород, галоген, алкил, замещенный алкил, арил, замещенный арил, арилалкил, замещенный арилалкил, ацил, замещенный ацил, гетероалкил, замещенный гетероалкил, гетероарил, замещенный

гетероарил, гетероарилалкил, замещенный гетероарилалкил, CN , NO_2 , OR^6 , $\text{S}(\text{O})_b\text{R}^6$, NR^6R^7 , CONR^6R^7 , CO_2R^6 , $\text{NR}^6\text{CO}_2\text{R}^7$, $\text{NR}^6\text{CONR}^7\text{R}^8$, $\text{NR}^6\text{CSNR}^7\text{R}^8$, $\text{NR}^6\text{C}(=\text{NH})\text{NR}^7\text{R}^8$,

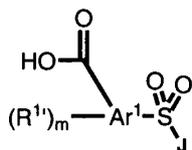
$\text{SO}_2\text{NR}^5\text{R}^6$, $\text{NR}^5\text{SO}_2\text{R}^6$, $\text{NR}^5\text{SO}_2\text{NR}^6\text{R}^7$, $\text{B}(\text{OR}^5)(\text{OR}^6)$, $\text{P}(\text{O})(\text{OR}^5)(\text{OR}^6)$ и $\text{P}(\text{O})(\text{R}^5)(\text{OR}^6)$;

R^5 - R^8 независимо представляют собой водород, алкил, замещенный алкил, арил, замещенный арил, арилалкил, замещенный арилалкил, гетероалкил, замещенный гетероалкил, гетероарил, замещенный гетероарил, гетероарилалкил или замещенный

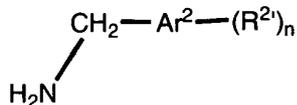
гетероарилалкил или, альтернативным образом, R^6 и R^7 , R^7 и R^8 совместно с атомами, с которыми они связаны, образуют циклогетероалкильное или замещенное циклогетероалкильное кольцо;

b равен 0, 1 или 2;

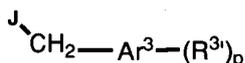
при этом указанный способ включает взаимодействие соединения формулы:



5 где J представляет собой уходящую группу;
с соединением формулы:



10 с получением продукта; и
взаимодействие указанного продукта с соединением формулы:



где J представляет собой уходящую группу.

15 Согласно еще одному аспекту изобретения предложено применять вещества, идентифицированные при помощи анализов, описанных в настоящем описании, в качестве добавок или модуляторов вкуса в композициях с целью ингибирования или блокирования горького вкуса, вызванного веществами, которые специфически активизируют указанные в настоящем описании вкусовые рецепторы. Предпочтительным
20 объектом изобретения является применение вещества, которое ингибирует активацию, по меньшей мере, одного из указанных выше рецепторов T2R человека с целью блокирования горького вкуса веществ, присутствующих в кофе и продуктах, напитках и лекарственных средствах с добавлением кофе.

Другим объектом изобретения является применение веществ согласно настоящему
25 изобретению в качестве ингибиторов горького вкуса широкого спектра действия с целью ингибирования или блокирования горького вкуса, вызванного веществами, которые специфически активизируют вкусовые рецепторы hT2R8, лигандами, активизирующими множественные вкусовые рецепторы, горькими веществами с
30 неизвестной специфичностью к рецепторам, или композициями, содержащими неизвестные горькие соединения, или многочисленные горькие соединения. Согласно одному варианту осуществления, вещества согласно настоящему изобретению применяют для ингибирования активации, по меньшей мере, одного из указанных выше рецепторов T2R человека и, таким образом, блокирования горького вкуса веществ, присутствующих в кофе и продуктах, напитках и лекарственных средствах со вкусом
35 кофе. Другим объектом изобретения является подтверждение того, что вещества, идентифицированные согласно настоящему изобретению, модулируют, предпочтительно ингибируют или блокируют горький вкус, вызванный, например, кофе и продуктами, напитками и лекарственным средствами со вкусом кофе, при помощи вкусовых проб человека или животных, предпочтительно - при помощи вкусовых проб человека.

40 Другим объектом изобретения является применение веществ, идентифицированных при помощи анализов, описанных в настоящем тексте, в качестве добавок или модуляторов вкуса в композициях с целью ингибирования или блокирования горького вкуса, вызванного веществами, которые специфически активизируют указанные в настоящем описании вкусовые рецепторы. Предпочтительным объектом изобретения
45 является применение вещества, которое ингибирует активацию, по меньшей мере, одного из указанных выше рецепторов T2R человека с целью блокирования горького вкуса веществ, присутствующих в кофе и продуктах, напитках и лекарственных средствах с добавлением кофе.

В наиболее предпочтительном варианте осуществления, Вещество С и его аналоги применяют в качестве ингибиторов горького вкуса широкого спектра действия для ингибирования или блокирования горького вкуса, вызываемого веществами, которые специфически активируют вкусовые рецепторы hT2R3, 7, 10, 14, 16, 44, 51, 55, 61, 63, 64, 65, 71 и/или hT2R5, 9, 13, 54, 67 и 75, лигандами, активирующими множественные вкусовые рецепторы, горькими веществами с неизвестной специфичностью к рецепторам, или композициями, содержащими неизвестные горькие соединения, или многочисленные горькие соединения. С учетом антагонистических свойств Вещества С, оно должно, по существу, смягчать горький вкус большинства горьких веществ и содержащих такие вещества композиций. Предпочтительным объектом изобретения является применение вещества, которое ингибирует активацию, по меньшей мере, одного из указанных выше рецепторов T2R человека, такого, как Вещество С, или его аналог, с целью блокирования горького вкуса веществ, присутствующих в кофе и продуктах, напитках и лекарственных средствах с добавлением кофе.

15 ПОДРОБНОЕ ОПИСАНИЕ ФИГУР

ФИГ.1 относится к экспериментам, в которых применяли частично очищенную горькую фракцию кофе для скрининга 25 T2R человека во временно трансфицированных клетках НЕК, как описано в предыдущих заявках на патент, включенных в настоящее описание посредством ссылки. Как показано на ФИГ.1, фракция кофе активировала клетки НЕК293, временно трансфицированные hT2R8 и hT2R14 в анализе, использующем методику кальциевого изображения. Для снижения уровня флуоресценции фракции кофе, который мог помешать анализу, применяли синий краситель FD&C.

На ФИГ.2 представлена кривая зависимости $\Delta F/F$ от логарифма фракции кофе, демонстрирующая зависимость ответа hT2R8 от дозы фракции с горьким вкусом, полученной из кофе. Анализ проводили с использованием клеточных линий, стабильно экспрессирующих hT2R8 и hT2R14, и автоматического детектора флуоресценции FLIPR.

На ФИГ.3 представлена кривая ингибирования активности hT2R8 в процентах в зависимости от логарифма концентрации вещества, демонстрирующая зависимости ингибирования от дозы для Веществ А и В в клеточной линии, стабильно экспрессирующей hT2R8.

На ФИГ.4 представлена кривая зависимости ингибирования активности hT2R14 в процентах от логарифма концентрации Вещества С, демонстрирующая зависимости ингибирования от дозы для веществ С в клеточной линии, стабильно экспрессирующей hT2R8.

ФИГ.5 демонстрирует ингибирующую активность Вещества С для различных (2) вкусовых рецепторов человека.

На ФИГ.6 представлена кривая зависимости рецепторной активности от логарифма концентрации сахараина. На ФИГ.6 показаны соотношение доза-отклик; и влияние сахараина на активность рецепторов в трансфицированных клетках, экспрессирующих варианты hT2R43, hT2R44 и hT2R8. Ответ hT2R8 на сахарин более слабый в анализах *in vitro*, чем в аллелях «дегустаторов» hT2R43-W35 и hT2R44-W35, но он сильнее, чем в аллелях «недегустаторов» hT2R43-S35 и hT2R44-R35.

ПОДРОБНОЕ ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ

В соответствии с настоящим изобретением, соединения согласно настоящему изобретению могут быть использованы для смягчения или уменьшения горького вкуса композиций, например, композиции для приема внутрь. В настоящем описании термин «композиция для приема внутрь» включает любое вещество, предназначенное для перорального употребления либо отдельно, либо вместе с другим веществом.

Композиция для приема внутрь включает как «продукты питания или напитки», так и «непищевые продукты». Под термином «продукты питания или напитки» понимают любой пищевой продукт, предназначенный для потребления людьми или животными, включая твердые вещества, полутвердые вещества или жидкости (например, напитки).

5 Термин «непищевые продукты» или «непищевая композиция» включает добавки, нутрицевтики, функциональные продукты питания (например, любые свежие или подвергшиеся технологической обработке продукты, заявляемые как обладающие свойствами, способствующими укреплению здоровья и/или свойствами предупреждать заболевания помимо основной питательной функции снабжать питательными
10 веществами), фармацевтические и отпускаемые без рецепта лекарственные средства, продукты для ухода за полостью рта, такие как средства для чистки зубов и жидкости для полоскания рта, косметические продукты, такие как бальзамы для губ, и другие средства личной гигиены.

Композиция для приема внутрь также включает фармацевтическую, лекарственную
15 или пищевую композицию или, в качестве альтернативы, состав, например, фармацевтический или лекарственный состав, или продукт питания или напитков или состав.

Соединения согласно настоящему изобретению могут быть также предложены отдельно или в комбинации с любой известной или позже открытой композицией для
20 приема внутрь. Например, композиция для приема внутрь может представлять собой пищевую или непищевую композицию. Под термином «пищевая композиция» понимают любую композицию, которая может быть употреблена в качестве пищи людьми или животными, включая твердые вещества, гель, пасту, пенистое вещество, полутвердые вещества, жидкости или смеси указанных веществ. Под термином «непищевая
25 композиция» понимают любую композицию, которая предназначена для употребления или использования людьми или животными не в качестве пищи, включая твердые вещества, гель, пасту, пенистое вещество, полутвердые вещества, жидкости или смеси указанных веществ. Непищевая композиция включает, без ограничения, лекарственную композицию, которая относится к непищевой композиции, предназначенной для
30 использования людьми или животными для лечебных целей. Термин «животное» включает любое животное за исключением человека, как например, сельскохозяйственные животные и домашние животные.

В одном из вариантов реализации соединения согласно настоящему изобретению могут быть добавлены к непищевой композиции или непищевому продукту, такому
35 как добавки, нутрицевтики, функциональные продукты питания (например, любые свежие или подвергшиеся технологической обработке продукты, заявляемые как обладающие свойствами, способствующими укреплению здоровья и/или свойствами предупреждать заболевания помимо основной питательной функции снабжать питательными веществами), фармацевтические и отпускаемые без рецепта лекарственные
40 средства, продукты для ухода за полостью рта, такие как средства для чистки зубов и жидкости для полоскания рта, косметические продукты, такие как бальзамы для губ, и другие средства личной гигиены.

В целом, отпускаемый без рецепта (ОТС) продукт и продукт для гигиены полости рта, как правило, относятся к продукту для домашнего и/или личного использования, который может быть продан без рецепта и/или без посещения врача. Примеры
45 отпускаемых без рецепта продуктов включают, без ограничения, витамины и пищевые добавки; местные обезболивающие средства и/или анестетик; средства от кашля, простуды и аллергии; антигистаминные средства и/или средства от аллергии; и

комбинации указанных веществ. Витамины и пищевые добавки включают, без ограничения, витамины, пищевые добавки, тонизирующие напитки/бутилированные питательные напитки, витамины для детей, пищевые добавки, любые другие продукты, обеспечивающие питательными веществами или относящиеся к ним, и комбинации указанных продуктов. Местные обезболивающие средства и/или анестетик включают любые кремы/мази/гели для местного применения, используемые для уменьшения поверхностных или глубоко расположенных болей, например, мышечной боли; гель для обезболивания при прорезывании зубов; пластыри с обезболивающим компонентом; и комбинации указанных веществ. Средства от кашля, простуды и аллергии включают, без ограничения, противоотечные средства, средства от кашля, фарингеальные лекарственные средства, лечебные кондитерские изделия, антигистаминные средства и средства от кашля, простуды и аллергии для детей; и комбинированные продукты. Антигистаминные средства и/или средства от аллергии включают, без ограничения, любые системные лекарственные средства от сенной лихорадки, видов аллергического ринита, укусов насекомых. Примеры средств для гигиены полости рта включают, без ограничения, чистящие полоски для рта, зубную пасту, зубные щетки, эликсиры для полости рта/зубные эликсиры, уход за протезами, освежители для рта, отбеливающие средства для зубов для использования в домашних условиях и зубную нить.

В другом варианте реализации соединения согласно настоящему изобретению могут быть добавлены к продуктам питания и напиткам или составам. Примеры продуктов питания и напитков или составов включают, без ограничения, покрытия, глазурь и глазировки для пищевых продуктов и любое вещество, включенное в категорию супов, категорию сухих технологически обработанных продуктов, категорию напитков, категорию готовых блюд, категорию баночных или консервированных продуктов, категорию замороженных технологически обработанных продуктов, категорию охлажденных технологически обработанных продуктов, категорию закусок, категорию хлебобулочных изделий, категорию кондитерских изделий, категорию молочных продуктов, категорию мороженого, категорию заменителей пищи, категорию макаронных изделий и лапши и категорию соусов, заправок, приправ, категорию продуктов детского питания и/или категорию паст.

В целом, категория супов относится к баночному/консервированному, сухому, быстрого приготовления, охлажденному, УВТ-обработанному и замороженному супу. Для цели данного определения, «суп (супы)» означает продукт питания, приготовленный из мяса, мяса птицы, рыбы, овощей, зерновых культур, фруктов и других ингредиентов, приготовленный в жидкости, которая может содержать видимые куски некоторых или всех указанных ингредиентов. Он может быть прозрачным (как бульон) или густым (как густая похлебка), однородным, пюреобразным или содержать кусочки, готовым к употреблению, полусгущенным или сгущенным и может быть подан в горячем или холодном виде, в качестве первого блюда или основного блюда или в качестве промежуточной закуски (выпиваемой как напиток). Суп может быть использован как ингредиент для приготовления других компонентов пищи и может варьироваться от бульонов (консоме) до соусов (сливочные или сырны супы).

Термин «категория обезвоженных продуктов кулинарии» обычно означает (i) вспомогательные продукты для приготовления, такие как порошки, гранулы, пасты, концентрированные жидкие продукты, включая концентрированный бульон, бульон и бульоноподобные продукты в прессованных кубиках, таблетках или порошкообразной или гранулированной форме, которые продаются по отдельности в виде готового продукта или ингредиента в продукте, соусах и рецептурных смесях (вне зависимости

от технологии); (ii) растворимые продукты питания, такие как сухие супы и супы сублимационной сушки, включая сухие суповые смеси, сухие супы быстрого приготовления, сухие супы - полуфабрикаты, сухие или не замороженные составы готовых к употреблению блюд, блюда и закуски на одну порцию, включая макаронные изделия, картофельные и рисовые блюда; и (iii) продукты для украшения блюд, такие как приправы, маринады, заправки к салатам, топпинги к салатам, соусы для макания, панировочная хлебная крошка, взбитые белковые смеси для панировки, долгохранящиеся пасты, соусы для барбекю, жидкие рецептурные смеси, концентраты, соусы или смеси соусов, включая для салатов, продающиеся в виде готового продукта или ингредиента в продукте, сухие, или жидкие, или замороженные.

Категория напитков обычно означает напитки, смеси и концентраты напитков, включая, без ограничения, газированные и негазированные напитки, алкогольные и безалкогольные напитки, готовые к употреблению напитки, жидкие концентрированные составы для приготовления напитков, таких как содовая вода, и сухие порошкообразные смеси-предшественники напитков. Категория напитков также включает алкогольные напитки, безалкогольные напитки, спортивные напитки, изотонические напитки и горячие напитки. Алкогольные напитки включают, без ограничения, пиво, сидр/перри, ароматизированные алкогольные напитки (FAB), вино и спиртные напитки. Безалкогольные напитки включают, без ограничения, газированные напитки, такие как колы и газированные напитки не на основе колы; фруктовые соки, такие как соки, нектары, сокосодержащие напитки и напитки со вкусом фруктов; бутилированную воду, которая включает шипучую воду, родниковую воду и очищенную/столовую воду; функциональные напитки, которые могут быть газированными или негазированными, и включают энергетические напитки или эликсиры; концентраты, такие как жидкие и порошкообразные концентраты в готовой к употреблению дозировке. Горячие напитки включают, без ограничения, кофе, такой как свежий (например, сваренный), растворимый, комбинированный кофе, жидкие, готовые к употреблению, растворимые и сухие кофейные напитки, смеси и концентраты кофейных напитков (сиропы, в чистом виде, в составе или в порошкообразной форме; пример «порошкообразной формы» представляет собой продукт, содержащий кофе, подсластитель и осветлитель, все в порошкообразной форме); чай, такой как черный, зеленый, белый, оолонг и ароматизированный чай; и другие горячие напитки, включая ароматизированные, солодовые или растительные порошки, гранулы, кубики или таблетки, смешанные с молоком или водой.

Категория закусок в целом относится к любому продукту питания, который может представлять собой легкую неформальную еду, включая, без ограничения, сладкие и соленые закуски и батончики. Примеры закусок включают, без ограничения, фруктовые закуски, чипсы/криспы, экструдированные закуски, маисовые/кукурузные чипсы, попкорн, соленые крендельки, орехи и другие сладкие и соленые закуски. Примеры батончиков включают, без ограничения, батончики из гранолы/мюсли, батончики для завтрака, энергетические батончики, фруктовые батончики и другие батончики.

Категория хлебобулочных изделий в целом относится к любому пищевому продукту, способ приготовления которого включает подвергание нагреванию или избыточному солнечному свету. Примеры хлебобулочных изделий включают, без ограничения, хлеб, сдобные булочки, печенье, мафины, блюдо из зерновых продуктов, хлебные кондитерские изделия, кондитерские изделия, вафли, тортильи, сухое печенье, пироги, бублики, тарталетки, пироги с заварным кремом и различной начинкой, торт, любые печеные изделия и любые комбинации указанных изделий.

Категория мороженого в целом относится к замороженному десерту, содержащему сливки и сахар, и ароматизатор. Примеры мороженого включают, без ограничения, импульсное мороженое; мороженое для употребления дома; замороженный йогурт и домашнее мороженое; соевое, овсяное, бобовое (например, из красных бобов и бобов мунг) и рисовое мороженое.

Категория кондитерских изделий в целом относится к пищевому продукту, сладкому на вкус. Примеры кондитерских изделий включают, без ограничения, конфеты, желе, шоколадные кондитерские изделия, кондитерские изделия из сахара, жевательную резинку и т.п. и любые комбинированные продукты.

Категория заменителей пищи в целом относится к любому продукту питания, предназначенному для замены обычных блюд, в частности для людей, заботящихся о здоровье или внешней форме. Примеры заменителей пищи включают, без ограничения, продукты для похудения и оздоравливающие продукты.

Категория готовых блюд в целом относится к любому продукту питания, который может служить в качестве еды без длительного приготовления или обработки. Готовые блюда включают продукты, которые содержат добавленные производителем рецептурные «включения», приводящие к высокой степени готовности, завершенности и удобству. Примеры готовых блюд включают, без ограничения баночные/консервированные, замороженные, охлажденные готовые блюда; обеденные смеси; замороженную пиццу; охлажденную пиццу; и приготовленные салаты.

Категория макаронных изделий и лапши включает любые макаронные изделия и/или лапшу, включая, без ограничения, консервированные макаронные изделия, сухие и охлажденные/свежие макаронные изделия; и простую, растворимую, охлажденную, замороженную лапшу и закусочную лапшу.

Категория баночных/консервированных продуктов питания включает, без ограничения, баночное/консервированное мясо и мясные продукты, рыбу/морепродукты, овощи, томаты, бобы, фрукты, готовые блюда, суп, макаронные изделия и другие баночные/консервированные продукты питания.

Категория замороженных продуктов питания, подвергшихся технологической обработке, включает, без ограничения, замороженное технологически обработанное красное мясо, технологически обработанное мясо птицы, технологически обработанную рыбу/морепродукты, технологически обработанные овощи, заменители мяса, технологически обработанный картофель, хлебобулочные изделия, десерты, готовые блюда, пиццу, суп, лапшу и другие замороженные продукты питания.

Категория сухих продуктов питания, подвергшихся технологической обработке, включает, без ограничения, рис, десертные смеси, сухие готовые блюда, сухой суп, суп быстрого приготовления, сухие макаронные изделия, простую лапшу и лапшу быстрого приготовления.

Категория охлажденных продуктов питания, подвергшихся технологической обработке, включает, без ограничения, охлажденное технологически обработанное мясо, технологически обработанную рыбу/морепродукты, наборы для ланча, свеженарезанные фрукты, готовые блюда, пиццу, приготовленные салаты, суп, свежие макаронные изделия и лапшу.

Категория соусов, заправок и приправ включает, без ограничения, томатные пасты и пюре, бульон/бульонные кубики, травы и специи, глутамат натрия (MSG), столовые соусы, соевые соусы, соусы для макаронных изделий, влажные/кулинарные соусы, сухие соусы/порошкообразные смеси, кетчуп, майонез, горчицу, заправки к салатам, заправки с уксусом, соусы для макания, соленья и другие соусы, заправки и приправы.

Категория продуктов детского питания включает, без ограничения, молочную или соевую смесь; и приготовленные, сухие и другие продукты детского питания.

Категория паст включает, без ограничения, джемы и варенья, мед, шоколадные пасты, ореховые пасты и дрожжевые пасты.

5 Категория молочных продуктов в целом относится к пищевому продукту, изготовленному из молока млекопитающего. Примеры молочных продуктов включают, без ограничения, питьевые молочные продукты, сыр, йогурт и кисломолочные напитки и другие молочные продукты.

10 Дополнительные примеры пищевой композиции, в частности продукты питания и напитки или составы, представлены следующим образом. Типичные пищевые композиции включают одно или несколько кондитерских изделий, шоколадные кондитерские изделия, плитки, продукцию, предназначенную для потребления «на ходу», конфеты с мягкой или твердой начинкой в пакетах, ассорти в коробках, стандартные ассорти в коробках, конфеты с заделкой торцов "вперекрутку", сезонный
15 шоколад, шоколад с игрушками, альфахорес (аргентинское печенье), другие шоколадные кондитерские изделия, мятные конфеты, стандартные мятные конфеты, сильные мятные конфеты, леденцовую карамель, пастилу, жевательные резинки, желейные конфеты и жевательные конфеты, ирис, карамель и нугу, лечебные кондитерские изделия, леденцы на палочке, лакричные конфеты и другие кондитерские изделия из сахара, жевательную
20 резинку, жевательную резинку с сахаром, жевательную резинку без сахара, функциональную жевательную резинку, надувную жевательную резинку, хлеб, упакованный/заводской хлеб, неупакованный/домашний хлеб, мучные кондитерские изделия, торты, упакованные/заводские торты, неупакованные/домашние торты, печенье, глазированное шоколадом печенье, слоистое печенье, печенье с начинкой,
25 соленое печенье и крекеры, заменители хлеба, зерновые смеси для завтрака, готовые к употреблению зерновые смеси, зерновые смеси для завтрака для всей семьи, хлопья, мюсли, другие зерновые смеси, зерновые смеси для завтрака для детей, горячие зерновые смеси, мороженое, импульсное мороженое, молочное мороженое на одну порцию, мороженое на основе воды на одну порцию, молочное мороженое в мультипаке,
30 мороженое на основе воды в мультипаке, мороженое для употребления дома, молочное мороженое для употребления дома, десерты из мороженого, оптовое мороженое, молочное мороженое для употребления дома на основе воды, замороженный йогурт, домашнее мороженое, молочные продукты, молоко, свежее/пастеризованное молоко, полножирное свежее/пастеризованное молоко, полуобезжиренное свежее/
35 пастеризованное молоко, молоко с длительным сроком хранения/молоко УВТ, полножирное молоко с длительным сроком хранения/молоко УВТ, полуобезжиренное молоко с длительным сроком хранения/молоко УВТ, обезжиренное молоко с длительным сроком хранения/молоко УВТ, козье молоко, сгущенное/сгущенное стерилизованное молоко, простое сгущенное молоко/сгущенное стерилизованное
40 молоко, ароматизированное, функциональное и другое сгущенное молоко, ароматизированные молочные напитки, ароматизированные молочные напитки только на основе молока, ароматизированные молочные напитки с фруктовым соком, соевое молоко, кисломолочные напитки, сквашенные молочные напитки, осветлители кофе (например, молочные и немолочные сливки или осветлители для кофейных напитков),
45 порошковое молоко, ароматизированные порошковые молочные напитки, сливки, сыр, плавленый сыр, пастообразный плавленый сыр, непастообразный плавленый сыр, неплавленый сыр, пастообразный неплавленый сыр, твердый сыр, упакованный твердый сыр, неупакованный твердый сыр, йогурт, простой/натуральный йогурт,

ароматизированный йогурт, фруктовый йогурт, пробиотический йогурт, питьевой йогурт, обычный питьевой йогурт, пробиотический питьевой йогурт, охлажденные десерты и долгохранящиеся десерты, молочные десерты, соевые десерты, охлажденные закуска, мягкий сыр и творог низкой жирности, простой мягкий сыр и творог низкой жирности, ароматизированный мягкий сыр и творог низкой жирности, соленый мягкий сыр и творог низкой жирности, сладкие и соленые закуска, фруктовые закуска, чипсы/криспы, экструдированные закуска, маисовые/кукурузные чипсы, попкорн, крендельки, орехи, другие сладкие и соленые закуска, батончики, батончики из гранолы, батончики для завтрака, энергетические батончики, фруктовые батончики, другие батончики, заменители пищи, продукты для похудения, оздоравливающие напитки, готовые блюда, баночные готовые блюда, замороженные готовые блюда, сухие готовые блюда, охлажденные готовые блюда, обеденные смеси, замороженную пиццу, охлажденную пиццу, суп, суповые консервы, сухой суп, суп быстрого приготовления, охлажденный суп, горячий суп, замороженный суп, макаронные изделия, консервированные макаронные изделия, сухие макаронные изделия, охлажденные/свежие макаронные изделия, лапшу, простую лапшу, лапшу быстрого приготовления, лапшу быстрого приготовления в чашках/мисках, лапшу быстрого приготовления в пакетах, охлажденную лапшу, закусочную лапшу, консервы, мясо и мясные продукты, консервированную рыбу/морепродукты, консервированные овощи, консервированные томаты, консервированные бобы, консервированные фрукты, консервированные готовые блюда, суповые консервы, консервированные макаронные изделия, другие консервированные продукты, замороженные продукты, замороженное технологически обработанное красное мясо, замороженное технологически обработанное мясо птицы, замороженную технологически обработанную рыбу/морепродукты, замороженные технологически обработанные овощи, замороженные заменители мяса, замороженный картофель, запеченные картофельные чипсы, другие запеченные картофельные продукты, незапеченный замороженный картофель, замороженные хлебобулочные изделия, замороженные десерты, замороженные готовые блюда, замороженную пиццу, замороженный суп, замороженную лапшу, другие замороженные продукты, обезвоженные продукты, десертные смеси, сухие готовые блюда, сухой суп, суп быстрого приготовления, сухие макаронные изделия, простую лапшу, лапшу быстрого приготовления, лапшу быстрого приготовления в чашках/мисках, лапшу быстрого приготовления в пакетах, охлажденные продукты, охлажденное технологически обработанное мясо, охлажденную технологически обработанную рыбу/морепродукты, охлажденную технологически обработанную рыбу, охлажденную глазированную рыбу, охлажденную копченую рыбу, охлажденный набор для ланча, охлажденные готовые блюда, охлажденную пиццу, охлажденный суп, охлажденные/свежие макаронные изделия, охлажденную лапшу, масла и жиры, оливковое масло, растительное масло и масло из семян, кулинарные жиры, масло, маргарин, пастообразные масла и жиры, функциональные пастообразные масла и жиры, соусы, заправки и приправы, томатные пасты и пюре, бульон/бульонные кубики, бульонные кубики, подливу в гранулах, жидкие бульоны и основы, травы и специи, ферментированные соусы, соевые соусы, соусы для макаронных изделий, влажные соусы, сухие соусы/порошкообразные смеси, кетчуп, майонез, обычный майонез, горчицу, заправки к салатам, обычные заправки к салатам, маложирные заправки к салатам, заправки с уксусом, соусы для макания, соленья, другие соусы, заправки и приправы, продукты детского питания, молочную смесь, стандартную молочную смесь, молочную смесь для детей старше года, молочную смесь для начинающих ходить детей, гипоаллергенную молочную смесь, приготовленные

продукты детского питания, обезвоженные продукты детского питания, другие продукты детского питания, пасты, джемы и варенья, мед, шоколадные пасты, ореховые пасты и дрожжевые пасты. Типичные пищевые композиции также включают кондитерские изделия, хлебобулочные изделия, мороженое, молочные продукты, сладкие и соленые закус-
5 ки, батончики, заменители пищи, готовые блюда, супы, макаронные изделия, лапшу, консервированные продукты, замороженные продукты, обезвоженные продукты, охлажденные продукты, масла и жиры, продукты детского питания или пасты или смеси указанных продуктов. Типичные пищевые композиции также включают зерновые смеси для завтрака, сладкие напитки или твердые или жидкие концентрированные композиции для приготовления напитков. Типичные пищевые композиции также
10 включают ароматизированные кофе продукты (например, мороженое со вкусом кофе).

Как правило, количество, достаточное для смягчения или уменьшения горького вкуса, связанного с композицией, например композицией для приема внутрь, добавляют к композиции, в результате чего происходит смягчение или уменьшение горького вкуса,
15 связанного с указанной композицией по сравнению с композициями, полученными без соединений согласно настоящему изобретению, ориентируясь на людей или животных. Или, в случае проведения тестирования составов ориентируясь на большинство группы, например, восьми дегустаторов (людей), посредством процедур, общеизвестных в данной области.

Концентрация соединений согласно настоящему изобретению, эффективная для смягчения или уменьшения горького вкуса, связанного с композицией, конечно, будет зависеть от многих факторов, включая конкретный тип пищевой композиции и различных других компонентов, природную генетическую изменчивость и индивидуаль-
20 ные предпочтения и состояния здоровья различных людей, пробующих композиции, и субъективное действие определенного соединения на вкус таких хемосенсорных соединений. В некоторых вариантах реализации концентрация соединений согласно настоящему изобретению, эффективная для смягчения или уменьшения горького вкуса, связанного с композицией, составляет от примерно 0,001 млн. частей (ppm) до примерно 100 млн. частей, например, от примерно 0,1 млн. частей
25 до примерно 100 млн. частей, от примерно 1 млн. частей до примерно 25 млн. частей, от примерно 1 млн. частей до примерно 10 млн. частей, от примерно 0,1 млн. частей до примерно 10 млн. частей, от примерно 0,01 млн. частей до примерно 30 млн. частей, от примерно 0,05 млн. частей до примерно 10 млн. частей, от примерно 0,01 млн. частей до примерно 5 млн. частей, от примерно 0,02 млн. частей до примерно 2 млн. частей
30 или от примерно 0,01 млн. частей до примерно 1 млн. частей.

В некоторых вариантах реализации настоящего изобретения предусмотрено, что смесь одного или нескольких соединений согласно настоящему изобретению будет использована для смягчения или уменьшения горького вкуса, связанного с композицией. Концентрация одного или нескольких соединений может быть одинаковой или
40 концентрация каждого соединения может быть разной.

Перед дальнейшим описанием настоящего изобретения предложены следующие определения.

Термин «семейство T2R» включает полиморфные варианты, аллели, мутанты и гомологи, которые (1) обладают примерно 30-40% идентичности аминокислотных последовательностей, в частности примерно 40, 50, 60, 70, 75, 80, 85, 90, 95, 96, 97, 98
45 или 99% идентичности аминокислотных последовательностей с рецепторами T2R, описанными ниже и в заявках Zuker (Id) (2001) и Adler (Id.) (2001), включенных в настоящее описание посредством ссылки, на участке примерно в 25 аминокислот,

оптимально 50-100 аминокислот; (2) специфически связываются с антителами, выращенными к иммуногену, содержащему аминокислотную последовательность, выбранную из группы, включающей последовательности T2R, описанные ниже, и консервативно модифицированные варианты указанных последовательностей; (3) специфически гибридизуются (с размером по меньшей мере 100, необязательно, по меньшей мере около 500-1000 нуклеотидов) в жестких условиях гибридизации в последовательность, выбранную из группы, включающей последовательности ДНК T2R, описанные ниже, и консервативно модифицированные варианты указанных последовательностей; (4) содержат последовательность, по меньшей мере на 40% идентичную аминокислотной последовательности, выбранной из группы, включающей аминокислотные последовательности T2R, описанные ниже, или (5) амплифицированы праймерами, которые специфически гибридизуются в жестких условиях гибридизации в описанные последовательности T2R.

В частности, указанные рецепторы «T2R» включают GPCR вкусовых рецепторов, обозначаемые в настоящем описании hT2R8 и hT2R14, содержащие последовательности нуклеиновых кислот и аминокислотные последовательности, предложенные в настоящей заявке, и варианты, аллели, мутанты, ортологи и химеры указанных последовательностей, которые специфически связываются с горькими лигандами, идентифицированными в настоящем описании, и другими структурно родственными соединениями и горькими соединениями.

В то время как гены T2R обладают значительной дивергенцией последовательностей как на уровне белков, так и на уровне ДНК, было обнаружено, что все T2R, выделенные на сегодняшний день, содержат некоторые консенсусные последовательности в определенных областях, которые идентичны или обладают 70-75% идентичности последовательностей с консенсусной последовательностью T2R, ранее идентифицированной в Adler et al. (WO 01/77676 A1 (2001) и Zuker et al. WO 01/18050 A2, оба из которых полностью включены в настоящее описание посредством ссылки.

Топологически, некоторые хемосенсорные GPCR содержат «N-терминальный домен», «внеклеточные домены», «трансмембранный домен», содержащий семь трансмембранных областей и соответствующие цитоплазматические и внеклеточные петли, «цитоплазматические области» и «С-терминальную область» (см., например, Hoon et al., Cell, 96:541-51 (1999); Buck & Axel, Cell, 65:175-87 (1991)). Указанные области могут быть структурно идентифицированы с помощью способов, известных специалистам в данной области техники, таких как программы для секвенирования, которые идентифицируют гидрофобные и гидрофильные домены (см., например, Stryer, Biochemistry, (3rd ed. 1988); см. также любые из ряда Internet программ для секвенирования, такие как на сайте dot.imgen.bcm.tmc.edu). Указанные области подходят для создания химерных белков и для анализов *in vitro* согласно настоящему изобретению, например, анализов связывания лигандов. Например, химерные T2R могут быть получены путем комбинирования внеклеточной области одного T2R и трансмембранной области другого T2R одного или разных видов.

Следовательно, термин «внеклеточные области» относится к доменам полипептидов T2R, которые выступают из клеточной мембраны и обращены к внешней стороне клетки. Такие области будут включать «N-терминальный домен», который обращен к внешней стороне клетки, а также внеклеточные петли трансмембранного домена, которые обращены к внешней стороне клетки, т.е. внеклеточные петли между трансмембранными областями 2 и 3, трансмембранными областями 4 и 5 и трансмембранными областями 6 и 7. «N-терминальный домен» начинается на N-

терминале и простирается до области, близкой к началу трансмембранной области. Указанные внеклеточные области подходят для анализов связывания лигандов *in vitro*, как растворимой, такой и твердой фазы. Кроме того, трансмембранные области, описанные ниже, также могут быть включены в связывание лигандов либо в комбинации с внеклеточной областью, либо отдельно, а, следовательно, также подходят для анализов связывания лигандов *in vitro*.

В настоящем описании термин «клетка, экспрессирующая T2R» включает рекомбинантные клетки, которые экспрессируют последовательность T2R человека согласно настоящему изобретению, а также эндогенные клетки, экспрессирующие T2R. Такие клетки содержатся в лингвальной системе и желудочно-кишечном тракте и включают клетки в ротовой полости, такие как вкусовые сосочки, экспрессированные на языке, а также клетки в желудочно-кишечном тракте и смежных органах, такие как щеточные клетки в желудочно-кишечном тракте, энтероэндокринные клетки, такие как клетки STC-1. Указанные клетки также могут экспрессировать G-белок, такой как густдудин, трансдудин, G_{α15} или G_{α16}. Клетки, которые экспрессируют конкретные T2R, могут быть идентифицированы и выделены известными способами, как например, путем сепарации клеток методом FACS и/или с помощью процедур по выделению клеток с использованием магнитных микроносителей.

«Трансмембранный домен», содержащий семь трансмембранных «областей», относится к домену полипептидов T2R, который находится внутри клеточной мембраны, и может также включать соответствующие цитоплазматические (внутриклеточные) и внеклеточные петли, также называемые трансмембранными «областями». Семь трансмембранных областей и внеклеточные и цитоплазматические петли могут быть идентифицированы стандартными способами, описанными в Kyte & Doolittle, *J. Mol. Biol.*, 157:105-32 (1982)) или в Stryer, выше.

Термин «цитоплазматические домены» относится к доменам белков T2R, которые обращены к внутренней стороне клетки, например, «С-терминальный домен» и внутриклеточным петлям трансмембранного домена, например, внутриклеточным петлям между трансмембранными областями 1 и 2, трансмембранными областями 3 и 4 и трансмембранными областями 5 и 6. Термин «С-терминальный домен» относится к области, которая продолжается от конца последней трансмембранной области до С-терминала белка и которая, как правило, расположена в цитоплазме.

Термин «7-трансмембранный рецептор» означает полипептид, относящийся к суперсемейству трансмембранных белков, которые содержат семь областей, охватывающих клеточную мембрану семь раз (таким образом, семь областей называются «трансмембранными» или доменами "ТМ" ТМ I-ТМ VII). Семейства обонятельных и некоторых вкусовых рецепторов относятся к данному суперсемейству. Полипептиды 7-трансмембранного рецептора обладают схожими и характерными первичными, вторичными и третичными структурами, рассмотренными подробнее ниже.

Термин «область связывания лиганда» относится к последовательностям, полученным из хемосенсорного или вкусового рецептора, которые, по существу, включают трансмембранные домены II-VII (ТМ II-VII). Указанная область может связывать лиганд и, в частности, соединение, вызывающее вкус.

Термин «транслокационный домен клеточной мембраны» или просто «транслокационный домен» означает домен полипептида, который при включении в аминокотерминал кодирующей полипептид последовательности может с высокой эффективностью «сопровождать (быть шапероном)» или «транслоцировать» гибридный

(«химерный») белок в клеточную мембрану. Например, может быть использован конкретный «транслокационный домен», изначально полученный из аминокотерминала полипептида родопсинового рецептора человека, 7-трансмембранный рецептор. Другой
5 транслокационный домен был получен из последовательности бычьего родопсина и также подходит для облегчения транслокации. Полученные из родопсина последовательности, в частности эффективны в транслокации 7-трансмембранных гибридных белков в клеточную мембрану.

Термин «функциональная эквивалентность» означает способность и эффективность домена в транслокации новых транслированных белков в клеточную мембрану также
10 эффективно, как типичный транслокационный домен, такой как домен, полученный из родопсина в схожих условиях; относительная эффективность может быть измерена (в количественном выражении) и сравнена, как указано в настоящем описании. Домены, входящие в объем настоящего изобретения, могут быть определены путем стандартного скрининга их эффективности в транслокации новосинтезированных полипептидов в
15 клеточную мембрану в клетке (млекопитающего, Xenopus и т.п.) с той же эффективностью, что и транслокационный домен длиной в 20 аминокислот SEQ ID NO: 1.

Термин «функциональные эффекты» в контексте анализов на тестирование соединений, модулирующих передачу вкуса, опосредованную членом семейства T2R,
20 включает определение любого параметра, который опосредованно или напрямую находится под влиянием рецептора, например, функциональных, физических и химических эффектов. Он включает связывание лиганда, изменения ионного потока, мембранный потенциал, протекание тока, транскрипцию, связывание с G-белком, фосфорилирование или дефосфорилирование GPCR, передачу сигналов, взаимодействия
25 рецептор-лиганд, концентрации вторичного мессенджера (например, цАМФ, цГМФ, IP3 или внутриклеточного Ca²⁺), *in vitro*, *in vivo* и *ex vivo*, а также включает другие физиологические эффекты, такие как увеличения или уменьшения высвобождения нейромедиаторов или гормонов.

Под термином «определение функционального эффекта» понимают анализы на
30 наличие соединения, которое увеличивает или уменьшает параметр, опосредованно или напрямую находящийся под влиянием члена семейства T2R, например, функциональные, физические и химические эффекты. Такие функциональные эффекты могут быть измерены любыми способами, известными специалистам в данной области техники, например, изменения спектроскопических характеристик (например,
35 флуоресценции, поглощения, показателя преломления), гидродинамических (например, формы), хроматографических свойств или растворимости, фиксация потенциала, потенциалочувствительные красители, цельноклеточные потоки, радиоизотопный отток, индуцируемые маркеры, экспрессия гена T2R в ооцитах; экспрессия T2R клеток культуры ткани; транскрипционная активация генов T2R; анализы связывания лиганда;
40 изменения напряжения, мембранного потенциала и проводимости; анализы ионного потока; изменения внутриклеточных вторичных мессенджеров, таких как цАМФ, цГМФ и инозиттрифосфат (IP3); изменения внутриклеточных уровней кальция; высвобождение нейромедиаторов и т.п.

Термины «ингибиторы», «активаторы» и «модуляторы» белковых рецепторов T2R
45 являются взаимозаменяемыми для обозначения ингибирующих, активирующих или модулирующих молекул, идентифицированных с помощью анализов *in vitro* и *in vivo* на предмет передачи вкуса, например, лигандов, агонистов, антагонистов и их гомологов и миметиков. Ингибиторы представляют собой соединения, которые, например,

связываются, частично или полностью блокируют стимуляцию, уменьшают, предупреждают, отсрочивают активацию, инактивируют, десенсибилизируют или подавляют передачу вкуса, например, агонисты. Активаторы представляют собой соединения, которые, например, связываются, стимулируют, увеличивают, начинают, активируют, облегчают, усиливают активацию, сенсibiliзируют или активируют передачу вкуса, например, агонисты. Модуляторы включают соединения, которые, например, изменяют взаимодействие рецептора с внеклеточными белками, которые связываются с активаторами или ингибитором (например, эбнерин и другие члены семейства гидрофобных носителей); G-белки; киназы (например, гомологи родопсинкиназы и киназ бета-адренергических рецепторов, вовлеченные в дезактивацию и десенсибилизацию рецептора); и аррестины, которые также дезактивируют и десенсибилизируют рецепторы. Модуляторы включают генетически модифицированные варианты членов семейства T2R, например, с измененной активностью, а также встречающиеся в природе и синтетические лиганды, антагонисты, агонисты, небольшие химические молекулы и т.п.

Такие анализы на наличие ингибиторов и активаторов включают, например, осуществление экспрессии членов семейства T2R в клетках или клеточных мембранах, применение предполагаемых модулирующих соединений в присутствии или в отсутствие соединений, которые модулируют, например горьких соединений, а затем определение функциональных эффектов на передачу вкуса, как описано выше. Образцы или анализы, содержащие членов семейства T2R, на которые действуют потенциальным активатором, ингибитором или модулятором, сравнивают с контрольными образцами без ингибитора, активатора или модулятора, в результате чего исследуют степень модуляции. Контрольным образцам (не подвергнутым действию модуляторов) присваивают величину относительной активности T2R, равную 100%. Ингибирование T2R осуществляют, когда величина активности T2R относительно контроля составляет около 80%, необязательно 50% или 25-0%. Активацию T2R осуществляют, когда величина активности T2R относительно контроля составляет 110%, необязательно 150%, необязательно 200-500% или выше 1000-3000%.

В настоящем описании термины «очищенный», «по существу очищенный» и «выделенный» относятся к состоянию отсутствия других, отличных соединений, с которыми соединение согласно настоящему изобретению, как правило, связано в природном состоянии. Предпочтительно, термины «очищенный», «по существу очищенный» и «выделенный» означают, что композиция содержит по меньшей мере 0,5%, 1%, 5%, 10% или 20%, а наиболее предпочтительно по меньшей мере 50% или 75% массы, по массе данного образца. В одном из предпочтительных вариантов реализации указанные термины относятся к соединению согласно настоящему изобретению, содержащему по меньшей мере 95% массы, по массе данного образца. В настоящем описании, когда термины «очищенный», «по существу очищенный» и «выделенный» относятся к нуклеиновой кислоте или белку, из нуклеиновых кислот или белков, также обозначают состояние очистки или концентрацию, отличную от той, которая встречается в природе в организме млекопитающего, особенно человека. Любая степень очистки или концентрация, больше встречающейся в природе в организме млекопитающего, особенно человека, включая (1) очистку от других связанных структур или соединений или (2) связь со структурами или соединениями, с которыми оно, как правило, не связано в организме млекопитающего, особенно человека, входит в значение термина «выделенный». Нуклеиновая кислота или белок или классы нуклеиновых кислот или белков, указанные в настоящем описании, могут быть выделены или иначе связаны со

структурами или соединениями, с которыми они, как правило, не связаны в природе согласно ряду способов и процессов, известных специалистам в данной области техники.

В настоящем описании термин «выделенный» в отношении нуклеиновой кислоты или полипептида обозначает состояние очистки или концентрацию, отличную от той, которая встречается в природе в организме млекопитающего, особенно человека. Любая степень очистки или концентрация, больше встречающейся в природе в организме, включая (1) очистку от других встречающихся в природе связанных структур или соединений или (2) связь со структурами или соединениями, с которыми оно, как правило, не связано в организме, в настоящем описании входит в значение термина «выделенный». Нуклеиновые кислоты или полипептиды, указанные в настоящем описании, могут быть выделены или иначе связаны со структурами или соединениями, с которыми они, как правило, не связаны в природе согласно ряду способов и процессов, известных специалистам в данной области техники.

В настоящем описании термины «амплифицирующий» и «амплификация» относятся к использованию любого подходящего способа амплификации для получения или обнаружения рекомбинантной или экспрессированной в природе нуклеиновой кислоты, как описано подробнее ниже. Например, согласно настоящему изобретению предложены способы и реагенты (например, специфические пары олигонуклеотидных праймеров) для амплификации (например, путем полимеразной цепной реакции, ПЦР) экспрессированных в природе (например, геномных или мРНК) или рекомбинантных (например, кДНК) нуклеиновых кислот согласно настоящему изобретению (например, последовательностей согласно настоящему изобретению, связывающихся с соединением, вызывающим вкус) *in vivo* или *in vitro*.

Термин «вектор экспрессии» относится к любой системе для рекомбинантной экспрессии для экспрессии последовательности нуклеиновой кислоты согласно настоящему изобретению *in vitro* или *in vivo*, конститутивно или индуцируемо в любой клетке, включая прокариотическую, дрожжевую, грибковую, растительную клетку, клетку насекомого или млекопитающего. Указанный термин включает линейные или кольцевые системы для экспрессии. Термин включает системы для экспрессии, которые остаются в эпизомальной форме или интегрируют в геном клетки-хозяина. Системы для экспрессии могут быть или не быть способны к саморепликации, т.е. осуществлять только временную экспрессию в клетке. Термин включает рекомбинантные экспрессионные «кассеты», содержащие только минимальное количество элементов, необходимых для транскрипции рекомбинантной нуклеиновой кислоты.

Термин «библиотека» означает состав, который представляет собой смесь различных молекул нуклеиновых кислот или полипептидов, как например, библиотека рекомбинантных полученных сенсорных, в частности областей связывания лиганда вкусовых рецепторов, полученных путем амплификации нуклеиновой кислоты с парами вырожденных праймеров или выделенный набор векторов, содержащих амплифицированные области связывания лиганда, или смесь клеток, каждая произвольно трансфицированная по меньшей мере одним вектором, кодирующим вкусовой рецептор.

Термин «нуклеиновая кислота» или «последовательность нуклеиновой кислоты» относится к олигонуклеотиду, дезоксирибонуклеотиду или рибонуклеотиду, либо в одноцепочечной, либо в двухцепочечной форме. Указанный термин включает нуклеиновые кислоты, т.е. олигонуклеотиды, содержащие известные аналоги природных нуклеотидов. Термин также включает структуры, подобные нуклеиновым кислотам, с синтетическими остовами.

Если не указано иное, предусмотрено, что конкретная последовательность

нуклеиновой кислоты также включает консервативно модифицированные варианты указанной последовательности (например, замены вырожденных кодонов) и комплементарные последовательности, а также четко обозначенную последовательность. В частности, замены вырожденных кодонов могут быть
5 осуществлены путем получения, например, последовательностей, в которых третье положение одного или нескольких выбранных кодонов заменяют на смешанное основание и/или остатки дезоксиинозина (Batzer et al., *Nucleic Acid Res.*, 19:5081 (1991); Ohtsuka et al., *J. Biol. Chem.*, 260:2605-08 (1985); Rossolini et al., *Mol. Cell. Probes*, 8:91-98 (1994)). Термин «нуклеиновая кислота» является взаимозаменяемым с геном, кДНК,
10 мРНК, олигонуклеотидом и полинуклеотидом.

В настоящем описании термины «полипептид», «пептид» и «белок» являются взаимозаменяемыми и относятся к полимеру из аминокислотных остатков. Указанные термины употребляют к аминокислотным полимерам, в которых один или несколько аминокислотных остатков представляет собой искусственный химический миметик
15 соответствующей встречающейся в природе аминокислоты, а также к встречающимся в природе аминокислотным полимерам и не встречающемуся в природе аминокислотному полимеру.

В настоящем описании термин «алкил», а также другие группы с приставкой «алк», такие как например, алкокси, алканоил, алкенил, алкинил и т.п., означает углеродные
20 цепи, которые могут быть линейными или разветвленными, или комбинации указанных цепей. Примеры алкильных групп включают метил, этил, пропил, изопропил, бутил, втор- и трет-бутил, пентил, гексил, гептил и т.п. Предпочтительные алкильные группы содержат 1-4 атома углерода. Термин «алкенил» и другие подобные термины включают углеродные цепи, содержащие по меньшей мере одну ненасыщенную связь углерод-
25 углерод. Термин «алкинил» и другие подобные термины включают углеродные цепи, содержащие по меньшей мере одну тройную связь углерод-углерод.

Термин «циклоалкил» означает карбоциклы, не содержащие гетероатомов, и включает моно-, би- и трициклические насыщенные карбоциклы, а также конденсированные
30 кольцевые системы. Примеры циклоалкила включают циклопропил, циклобутил, циклопентил, циклогексил, декагидронафталин, адамантан, инданил, инденил, флуоренил, 1,2,3,4-тетрагидронафталин и т.п.

Термин «арил» означает ароматический заместитель, который представляет собой одно кольцо или множественные кольца, конденсированные друг с другом. Типичные арильные группы включают, без ограничения, фенильную, нафтильную,
35 антраценильную, пиридиновую, пиразинильную, пиримидинильную, триазинильную, тиофенильную, фуранильную, пиррольную, оксазолильную, имидазолильную, триазолильную и тетразолильную группы. Арильные группы, содержащие один или несколько гетероатомов (например, пиридинил), часто называются «гетероарильными группами». При образовании множественными кольцами по меньшей мере одно из
40 входящих в состав колец является ароматическим. В некоторых вариантах реализации по меньшей мере одно из множественных колец содержит гетероатом, таким образом образуя арильные группы, содержащие гетероатом. Арильные группы, содержащие гетероатом, включают, без ограничения, бензоксазолильную, бензимидазолильную, хиноксалинильную, бензофуранильную и 1Н-бензо[d][1,2,3]триазолильную группы.
45 Арильные группы, содержащие гетероатом, также включают, без ограничения, 2,3-дигидробензо[b][1,4]диоксинильную и бензо[d][1,3]диоксолильную группы. Арильные группы, содержащие гетероатом, также включают ароматические кольца, конденсированные с гетероциклическим кольцом, содержащим по меньшей мере один

гетероатом и по меньшей мере одну карбонильную группу. Такие группы включают, без ограничения, диоксотетрагидрохиноксалинильную и диоксотетрагидрохиназолинильную группы.

Термин «арилалкокси» означает арильную группу, связанную с алкоксигруппой.

5 Термин «ариламидоалкил» означает арил-C(O)NR-алкил или арил-NRC(O)-алкил.

Термин «арилалкиламидоалкил» означает арил-алкил-C(O)NR-алкил или арил-алкил-NRC(O)-алкил, где R представляет собой любую подходящую группу, приведенную ниже.

Термин «арилалкил» относится к арильной группе, связанной с алкильной группой.

10 Термин «галоген» или «галогено» относится к хлору, бром, фтору или йоду.

Термин «уходящая группа» относится к функциональной группе или атому, который может быть замещен на другую функциональную группу или другой атом в реакции замещения, такой как реакция нуклеофильного замещения. В качестве примера, типичные уходящие группы включают хлор, бром и йод группы; группы сульфонового эфира, такие как мезилат, тозилат, брозилат, нозилат и т.п.; и ацилоксигруппы, такие как ацетокси, трифторацетокси и т.п.

15 Термин «галогеналкил» означает алкильную группу, содержащую один или несколько атомов галогена (например, CF₃).

Термин «гетероалкил» относится к алкильной группе, содержащей гетероатом, такой как N, O, P, B, S или Si. Гетероатом может быть связан с остальной частью гетероалкильной группы посредством насыщенной или ненасыщенной связи. Таким образом, алкил, содержащий в качестве заместителей группу, такую как гетероциклоалкил, замещенный гетероциклоалкил, гетероарил, замещенный гетероарил, алкокси, арилокси, борил, фосфино, амино, силлил, тио или селено, включен в термин «гетероалкил». Примеры гетероалкилов включают, без ограничения, циано, бензоил, 2-пиридил и 2-фурил.

Термин «гетероарилалкил» означает гетероарильную группу, к которой присоединена алкильная группа.

Термин «гетероцикл» означает моноциклическое или полициклическое кольцо, содержащее атомы углерода и водорода, необязательно содержащее одну или две кратные связи; при этом атомы в кольце содержат по меньшей мере один гетероатом, в частности 1-4 гетероатома, независимо выбранные из азота, кислорода и серы.

Структуры гетероциклического кольца включают, без ограничения, моно-, би- и трициклические соединения. Конкретные гетероциклы являются моноциклическими или бициклическими. Типичные гетероциклы включают цикломочевину, морфолинил, пирролидинонил, пирролидинил, пиперидинил, пиперазинил, гидантоинил, валеролактаминил, оксиранил, оксетанил, тетрагидрофуранил, тетрагидропиранил, тетрагидропиридинил, тетрагидропримидинил, тетрагидротииофенил, тетрагидротииопиранил, тетразолил и уразолил. Гетероциклическое кольцо может быть замещенным или незамещенным, предпочтительно, гетероциклы представляют собой 5- или 6-членные гетероциклы, в частности, гидантоинил и уразолил.

Термин «гетероциклоалкил» относится к циклоалкильной группе, в которой по меньшей мере один из атомов углерода в кольце замещен на гетероатом (например, O, S или N).

45 Термин «гетероциклоалкилалкил» означает гетероциклоалкильную группу, к которой присоединена алкильная группа.

Термин «содержащий заместители», в частности, предусматривает и допускает одно или несколько замещений, принятых в данной области техники. Однако специалистам

в данной области техники очевидно, что заместители следует выбирать таким образом, чтобы не оказать отрицательного влияния на полезные характеристики соединения или не мешать его функции. Подходящие заместители могут включать, например, галогеногруппы, перфторалкильные группы, перфторалкоксигруппы, алкильные группы, алкенильные группы, алкинильные группы, гидроксигруппы, оксогруппы, меркаптогруппы, алкилтиогруппы, алкоксигруппы, арильные или гетероарильные группы, арилокси или гетероарилоксигруппы, аралкильные или гетероаралкильные группы, аралкокси или гетероаралкоксигруппы, аминокгруппы, алкил- и диалкиламиногруппы, карбамоильные группы, алкилкарбонильные группы, карбоксильные группы, алкоксикарбонильные группы, алкиламинокарбонильные группы, диалкиламинокарбонильные группы, арилкарбонильные группы, арилоксикарбонильные группы, алкилсульфонильные группы, арилсульфонильные группы, циклоалкильные группы, цианогруппы, алкилтиогруппы C₁-C₆, арилтиогруппы, нитрогруппы, кетогруппы, ацильные группы, боронатные или боронильные группы, фосфатные или фосфонильные группы, сульфамильные группы, сульфонильные группы, сульфинильные группы и комбинации указанных групп. В случае содержащих заместители комбинаций, таких как «содержащий заместители арилалкил», либо арильная, либо алкильная группа может содержать заместители, либо как арильная, так и алкильная группы могут содержать один или несколько заместителей. Кроме того, специалистам в данной области техники известно, что в некоторых случаях подходящие заместители могут комбинироваться с образованием одного или нескольких колец.

Соединения, указанные в настоящем описании, содержат одну или несколько двойных связей и таким образом могут приводить к возникновению цис/транс-изомеров, а также других конформационных изомеров. Настоящее изобретение включает все возможные изомеры такого рода, а также смеси таких изомеров.

Соединения, указанные в настоящем описании, и в частности вышеприведенные заместители, могут содержать один или несколько центров асимметрии и таким образом могут приводить к возникновению диастереомеров и оптических изомеров. В настоящее изобретение включены все возможные диастереомеры такого рода, а также их рацемические смеси, их, по существу, чистые выделенные энантиомеры, все возможные геометрические изомеры и приемлемые соли указанных изомеров. Кроме того, также включены смеси стереоизомеров, а также конкретные выделенные стереоизомеры. В процессе процедур синтеза, используемых для получения таких соединений или при использовании процедур рацемизации и эпимеризации, известных специалистам в данной области техники, продукты таких процедур могут представлять собой смесь стереоизомеров.

В настоящем описании термины «соли» и «фармацевтически приемлемые соли» относятся к производным указанных соединений, когда исходное соединение модифицируют путем получения кислых или основных солей данного соединения. Примеры фармацевтически приемлемых солей включают, без ограничения, соли неорганических или органических кислот основных групп, таких как амины; и щелочные или органические соли кислых групп, таких как карбоновые кислоты. Фармацевтически приемлемые соли включают традиционные нетоксичные соли или соли четвертичного аммония исходного соединения, образованные, например, из нетоксичных неорганических или органических кислот. Например, такие традиционные нетоксичные соли включают соли, полученные из неорганических кислот, таких как соляная, бромистоводородная, серная, сульфаминовая, фосфорная и азотная; и соли, полученные

из органических кислот, таких как уксусная, пропионовая, янтарная, гликолевая, стеариновая, молочная, яблочная, винная, лимонная, аскорбиновая, памовая, малеиновая, гидроксималеиновая, фенилуксусная, глутаминовая, бензойная, салициловая, сульфаниловая, 2-ацетоксибензойная, фумаровая, толуолсульфоновая, метансульфоновая, этандисульфоновая, щавелевая и изэтионовая и т.п.

Фармацевтически приемлемые соли согласно настоящему изобретению могут быть синтезированы из исходного соединения, содержащего основную или кислотную группу, стандартными химическими способами. В целом, такие соли могут быть получены путем осуществления взаимодействия свободных кислотных или основных форм данных соединений со стехиометрическим количеством подходящего основания или кислоты в воде или органическом растворителе или в их смеси; в целом, предпочтительными являются безводные среды подобные эфиру, этилацетату, этанолу, изопропанолу или ацетонитрилу. Перечни подходящих солей приведены в *Remington's Pharmaceutical Sciences*, 17th ed., Mack Publishing Company, Easton, Pa., 1985, p. 1418, описание которого включено в настоящее описание посредством ссылки.

Термин «сольват» означает соединение или соль указанного соединения, которая дополнительно содержит стехиометрическое или нестехиометрическое количество растворителя, нековалентно связанного силами межмолекулярного взаимодействия. В случае, когда растворитель представляет собой воду, сольват представляет собой гидрат.

Термин «пролекарство» означает производное соединения, которое может гидролизаться, окисляться или иначе реагировать в биологических условиях (*in vitro* или *in vivo*) с образованием активного соединения, в частности соединения согласно настоящему изобретению. Примеры пролекарств включают, без ограничения, производные и метаболиты соединения согласно настоящему изобретению, которые включают биогидролизуемые соединения, такие как биогидролизуемые амиды, биогидролизуемые эфиры, биогидролизуемые карбаматы, биогидролизуемые карбонаты, биогидролизуемые уреиды и биогидролизуемые аналоги фосфатов. Конкретные пролекарства соединений с карбоксильными функциональными группами представляют собой низшие алкилэфиры карбоновой кислоты. Карбоксилатные эфиры удобно получают путем осуществления этерификации любой группы карбоновой кислоты в молекуле. Как правило, пролекарства могут быть получены хорошо известными способами, такими как описаны *Burger's Medicinal Chemistry and Drug Discovery* 6th ed. (Donald J. Abraham ed., 2001, Wiley) и *Design and Application of Prodrugs* (H. Bundgaard ed., 1985, Harwood Academic Publishers Gmhf).

В настоящем описании, если не указано иное, термины «биогидролизуемый амид», «биогидролизуемый эфир», «биогидролизуемый карбамат», «биогидролизуемый карбонат», «биогидролизуемый уреид», «биогидролизуемый фосфат» означают амид, эфир, карбамат, карбонат, уреид или фосфат, соответственно, соединения, который либо 1) не мешает биологической активности соединения, но может придать данному соединению полезные свойства *in vivo*, такие как усвоение, продолжительность действия или начало действия; либо 2) является биологически неактивным, но превращается *in vivo* в биологически активное соединение. Примеры биогидролизуемых эфиров включают, без ограничения, низшие алкилэфиры, алкоксиацилоксиэфиры, алкилациламиноалкилэфиры и холиновые эфиры. Примеры биогидролизуемых амидов включают, без ограничения, низшие алкиламиды, амиды альфа-аминокислот, алкоксициламиды и алкиламиноалкилкарбониламиды. Примеры биогидролизуемых карбаматов включают, без ограничения, низшие алкиламины, содержащие заместители

этилендиамины, аминокислоты, гидроксикаламины, гетероциклические и гетероароматические амины и полиэфирамины.

В настоящем описании термин «аналог указанного соединения» в контексте соединений, указанных в настоящем описании, включает диастереомеры, гидраты, сольваты, соли, пролекарства и N-оксиды соединений.

«Транслокационный домен», «область связывания лиганда» и композиции химерных рецепторов, указанные в настоящем описании, также включают «аналоги» или «консервативные варианты» и «миметики» («пептидомиметики»), обладающие структурами и активностью, которая по существу соответствует типичным последовательностям. Таким образом, в настоящем описании термины «консервативный вариант» или «аналог», или «миметик» относятся к полипептиду, содержащему модифицированную аминокислотную последовательность, такую, что изменение (изменения) по существу не изменяют структуру и/или активность полипептида (консервативного варианта). Указанные термины включают консервативно модифицированные вариации аминокислотной последовательности, т.е. замещения, добавления аминокислот или делеции тех остатков, которые не имеют критического значения для активности белка, или замещение аминокислот остатками, обладающими схожими свойствами (например, кислые, основные, положительно или отрицательно заряженные, полярные или неполярные и т.д.), таким образом, что замещения даже ключевых аминокислот по существу не изменяют структуру и/или активность.

Более конкретно, термин «консервативно модифицированные варианты» применим как к аминокислотным последовательностям, так и к последовательностям нуклеиновых кислот. В отношении конкретных последовательностей нуклеиновых кислот термин «консервативно модифицированные варианты» означает те нуклеиновые кислоты, которые кодируют идентичные или по существу идентичные аминокислотные последовательности, или в случае, когда нуклеиновая кислота не кодирует аминокислотную последовательность, означает по существу идентичные последовательности. Из-за вырожденности генетического кода большое число функционально идентичных нуклеиновых кислот кодируют какой-либо конкретный белок.

Например, кодоны GCA, GCC, GCG и GCU, все, кодируют аминокислоту аланин. Таким образом, в каждом положении, где аланин определен кодоном, кодон может быть заменен на любой из соответствующих описанных кодонов без изменения кодированного полипептида.

Такие вариации нуклеиновых кислот представляют собой «молчащие вариации», которые являются одним из видов консервативно модифицированных вариаций. В настоящем описании каждая последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующая полипептид, также характеризует каждую возможную молчащую вариацию нуклеиновой кислоты. Специалисту очевидно, что каждый кодон в нуклеиновой кислоте (за исключением AUG, который, как правило, представляет собой единственный кодон для метионина, и TGG, который, как правило, представляет собой единственный кодон для триптофана) может быть модифицирован с получением функционально идентичной молекулы. Следовательно, каждая молчащая вариация нуклеиновой кислоты, кодирующая полипептид, подразумевается в каждой описанной последовательности.

Таблицы консервативного замещения, в которых приведены функционально схожие аминокислоты, хорошо известны в данной области техники. Например, один из типичных принципов выбора консервативных замещений включает (исходный остаток, за которым следует типичное замещение): ala/gly или ser; arg/lys; asn/gln или his; asp/glu;

cys/ser; gin/asn; gly/asp; gly/ala или pro; his/asn или gln; ile/leu или val; leu/ile или val; lys/arg или gln, или glu; met/leu или tyr, или ile; phe/met или leu, или tyr; ser/thr; thr/ser; trp/tyr; tyr/trp или phe; val/ile или leu. Согласно альтернативному типичному принципу используют следующие шесть групп, каждая из которых содержит аминокислоты, которые

5 представляют собой консервативные замещения одной на другую: 1) Аланин (A), Серин (S), Треонин (T); 2) Аспарагиновая кислота (D), Глутаминовая кислота (E); 3) Аспарагин (N), Глутамин (Q); 4) Аргинин (R), Лизин (I); 5) Изолейцин (I), Лейцин (L), Метионин (M), Валин (V); и 6) Фенилаланин (F), Тирозин (Y), Триптофан (W); (см. также, например, Creighton, Proteins, W. H. Freeman and Company (1984); Schultz and Schimer, Principles of

10 Protein Structure, Springer-Verlag (1979)). Специалисту в данной области техники очевидно, что вышеопределенные замещения представляют собой не единственно возможные консервативные замещения. Например, для некоторых целей можно считать все заряженные аминокислоты консервативными замещениями одной на другую, положительные они или отрицательные. Кроме того, индивидуальные замещения,

15 делеции или добавления, которые меняют, добавляют или удаляют одну аминокислоту или небольшой процент аминокислот в кодированной последовательности также можно рассматривать как «консервативно модифицированные вариации».

Термины «миметик» и «пептидомиметик» относятся к синтетическому химическому соединению, обладающему по существу теми же структурными и/или функциональными

20 характеристиками полипептидов, например, транслокационными доменами, областями связывания лиганда или химерными рецепторами согласно настоящему изобретению. Миметик может либо полностью состоять из синтетических, неприродных аналогов аминокислот, либо может представлять собой химерную молекулу частично природных пептидных аминокислот и частично неприродных аналогов аминокислот. Миметик

25 может также содержать любое число консервативных замещений природных аминокислот, при условии, что такие замещения также по существу не изменяют структуру и/или активность миметика.

Как и в случае полипептидов согласно настоящему изобретению, которые представляют собой консервативные варианты, стандартное исследование определит

30 входит ли миметик в объем настоящего изобретения, т.е. что его структура и/или функция по существу не изменена. Композиции миметиков полипептида могут содержать любую комбинацию неприродных структурных компонентов, которые, как правило, входят в состав трех структурных групп: а) группы сцепления остатков, отличные от природных амидных связей («пептидных связей»); б) неприродные остатки вместо встречающихся

35 в природе аминокислотных остатков; или с) остатки, которые индуцируют мимикрию вторичной структуры, т.е. индуцируют или стабилизируют вторичную структуру, например, бета-поворот, гамма-поворот, бета-слой, конформацию альфа-спирали и т.п. Полипептид может быть охарактеризован как миметик, когда все или несколько его остатков соединены химическим путем, а не природными пептидными связями.

40 Отдельные пептидомиметические остатки могут быть соединены пептидными связями, другими химическими связями или путем сопряжения, как например, глутаральдегид, N-гидроксисукцинимидные эфиры, бифункциональные малеимиды, N,N'-дициклогексилкарбодиимид (DCC) или N,N'-диизопропилкарбодиимид (DIC). Связывающие группы, которые могут быть альтернативой традиционным амидным

45 связям («пептидной связи») включают, например, кетометилен (например, --C(=O)--CH₂ для --C(=O)--NH--), аминометилен (CH₂NH), этилен, олефин (CH₂двойная связь.CH), эфир (CH₂O), тиоэфир (CH₂--S), тетразол (CN₄), тиазол, ретроамид, тиоамид или эфир (см., например, Spatola, Chemistry and Biochemistry of Amino Acids, Peptides and Proteins,

Vol. 7, 267-357, Marcell Dekker, Peptide Backbone Modifications, NY (1983)). Полипептид может быть также охарактеризован как миметик, если содержит все или несколько неприродных остатков вместо встречающихся в природе аминокислотных остатков; неприродные остатки хорошо описаны в научной и патентной литературе.

5 «Метка» или «контрастное вещество» представляет собой композицию, обнаруживаемую спектроскопическими, фотохимическими, биохимическими, иммунохимическими или химическими способами. Например, подходящие метки включают ^{32}P , флуоресцентные красители, электронно-плотные реагенты, ферменты (например, обычно используемые в ИФА (ELISA)), биотин, дигоксигенин или гаптены
10 и белки, которые можно сделать обнаруживаемыми, например, путем введения радиоактивной метки в пептид, или которые могут быть использованы для обнаружения антител, специфически реагирующих с пептидом.

«Меченый зонд нуклеиновой кислоты или олигонуклеотид» представляет собой зонд, который связывают либо ковалентно посредством линкера или химической связи,
15 либо не ковалентно посредством ионных, ван-дер-ваальсовых, электростатических или водородных связей с меткой таким образом, что присутствие зонда может быть обнаружено путем обнаружения присутствия метки, связанной с зондом.

В настоящем описании термин «зонд нуклеиновой кислоты или олигонуклеотид» определен как нуклеиновая кислота, способная связываться с целевой нуклеиновой
20 кислотой комплементарной последовательности посредством одного или нескольких видов химических связей, как правило, посредством спаривания комплементарных оснований, обычно путем образования водородных связей. В настоящем описании зонд может включать природные (т.е. А, G, C или T) или модифицированные основания (7-деазагуанозин, инозин и т.п.). Кроме того, основания в зонде могут быть соединены
25 связью, отличной от фосфодиэфирной связи, при условии, что она не мешает гибридизации. Таким образом, зонды могут представлять собой пептид-нуклеиновые кислоты, в которых составляющие основания соединены пептидными связями, а не фосфодиэфирными связями. Специалисту в данной области техники очевидно, что зонды могут связываться с целевыми последовательностями, лишенными полной
30 комплементарности с последовательностью зонда, в зависимости от строгости условий гибридизации. Зонды могут быть напрямую мечены как в случае с изотопами, хромофорами, люминофорами, хромогенами, или опосредованно мечены как в случае с биотином, с которым стрептавидиновый комплекс может связаться позже. Путем проведения анализа на предмет присутствия или отсутствия зонда можно обнаружить
35 присутствие или отсутствие выбранной последовательности или подпоследовательности.

Термин «гетерологичный» при употреблении в отношении к частям нуклеиновой кислоты, означает, что нуклеиновая кислота содержит две или более
подпоследовательности, которые в природе находятся в разном соотношении друг с другом. Например, нуклеиновую кислоту, как правило, получают рекомбинантным
40 способом, и она содержит две или более последовательности из несвязанных генов, расположенные таким образом, чтобы создать новую функциональную нуклеиновую кислоту, например, промотор из одного источника, а кодирующая область из другого источника. Аналогичным образом термин «гетерологичный белок» означает, что белок содержит две или более последовательности, которые в природе находятся в разном
45 соотношении друг с другом (например, гибридный белок).

Термин «промотор» определен как набор последовательностей нуклеиновых кислот, которые направляют транскрипцию нуклеиновой кислоты. В настоящем описании промотор включает необходимые последовательности нуклеиновых кислот рядом с

сайтом инициации транскрипции, такие как в случае промотора полимеразы II типа, элемент ТАТА. Промотор также необязательно включает элементы дистального энхансера (усилителя) или репрессора, которые могут быть расположены на расстоянии до нескольких тысяч пар оснований от сайта инициации транскрипции. «Конститутивный промотор» представляет собой промотор, который активен в большинстве условий окружающей среды и экспериментальных условий. «Индуцируемый промотор» представляет собой промотор, который активен при регулировании окружающей среды и экспериментальном регулировании. Термин «функционально связанный» относится к функциональной связи между последовательностью нуклеиновой кислоты, контролирующей экспрессию (такой как промотор или набор центров (сайтов) связывания факторов транскрипции), и второй последовательностью нуклеиновой кислоты, когда контролирующая экспрессию последовательность направляет транскрипцию нуклеиновой кислоты, соответствующей второй последовательности.

В настоящем описании термин «рекомбинантный» относится к полинуклеотиду, синтезированному или на который иначе воздействовали *in vitro* (например, «рекомбинантный полинуклеотид»), способам применения рекомбинантных полинуклеотидов для получения генных продуктов в клетках или других биологических системах, или к полипептиду («рекомбинантный белок»), кодированному рекомбинантным полинуклеотидом. Термин «рекомбинантные способы» также включает лигирование нуклеиновых кислот, содержащих различные кодирующие области или домены или последовательности промоторов из различных источников в экспрессионную кассету или вектор для экспрессии, например, индуцируемой или конститутивной экспрессии гибридного белка, содержащего транслокационный домен согласно настоящему изобретению и последовательность нуклеиновой кислоты, амплифицированную с помощью праймера согласно настоящему изобретению.

Термин «селективно (или специфично) гибридизуется» относится к связыванию, образованию дуплекса или гибридизации молекулы только в конкретную нуклеотидную последовательность в жестких условиях гибридизации, когда эта последовательность присутствует в комплексной смеси (например, суммарная клеточная или библиотечная ДНК или РНК).

Термин «жесткие условия гибридизации» относится к условиям, в которых зонд будет гибридизоваться в целевую последовательность, как правило, в комплексной смеси нуклеиновой кислоты, но не в другие последовательности. Жесткие условия зависят от последовательности и будут отличаться при различных обстоятельствах. Более длинные последовательности, в частности, гибридизуются при более высоких температурах. Подробное руководство по гибридизации нуклеиновых кислот приведено в Tijssen, *Techniques in Biochemistry and Molecular Biology--Hybridization with Nucleic Probes, "Overview of principles of hybridization and the strategy of nucleic acid assays"* (1993). В целом, жесткие условия подбирают таким образом, чтобы они были примерно на 5-10°C. ниже температуры плавления (T_m) для конкретной последовательности при определенной ионной силе рН. T_p представляет собой температуру (при определенной ионной силе, рН, и концентрации нуклеиновой кислоты), при которой 50% зондов, комплементарных мишени, гибридизуются в целевую последовательность в состоянии равновесия (так как целевые последовательности присутствуют в избытке, при T_m 50% зондов находятся в равновесии). Жесткими условиями будут условия, при которых концентрация соли меньше примерно 1,0 М концентрации иона натрия, как правило, примерно 0,01-1,0 М концентрации иона натрия (или других солей) при рН 7,0-8,3, а температура составляет по меньшей мере около 30°C для коротких зондов (например, 10-50 нуклеотидов) и по

меньшей мере около 60°C для длинных зондов (например, более 50 нуклеотидов). Жесткие условия можно также получить добавлением дестабилизирующих агентов, таких как формамид. Для селективной или специфической гибридизации положительный сигнал представляет собой по меньшей мере двукратную, необязательно десятикратную фоновую гибридизацию. Типичные жесткие условия гибридизации могут быть следующими: 50% формамид, 5×SSC и 1% ДСН, осуществление инкубации при 42°C или 5×SSC, 1% ДСН, осуществление инкубации при 65°C с промыванием в 0,2×SSC и 0,1% ДСН при 65°C. Такие стадии гибридизации и промывания можно осуществлять, например, в течение 1, 2, 5, 10, 15, 30, 60 или более минут.

Нуклеиновые кислоты, которые не гибридизуются друг в друга в жестких условиях, тем не менее, по существу являются родственными, если полипептиды, которые они кодируют, по существу являются родственными. Это происходит, например, когда копию нуклеиновой кислоты создают с использованием максимальной вырожденности кодона, разрешенной генетическим кодом. В таких случаях нуклеиновые кислоты, как правило, гибридизуются в умеренно жестких условиях гибридизации. Типичные «умеренно жесткие условия гибридизации» включают гибридизацию в буфере 40% формамида, 1 М NaCl, 1% ДСН при 37°C и промывание в 1×ДСН при 45°C. Такие стадии гибридизации и промывания можно осуществлять, например, в течение 1, 2, 5, 10, 15, 30, 60 или более минут. Положительная гибридизация представляет собой по меньшей мере двукратную фоновую. Любому специалисту совершенно очевидно, что альтернативные условия гибридизации и промывания могут быть использованы для получения условий схожей жесткости.

Термин «антитело» относится к полипептиду, содержащему каркасный участок из иммуноглобулинового гена или его фрагментов, который специфически связывается и распознает антиген. Распознанные иммуноглобулиновые гены включают каппа-, лямбда-, альфа-, гамма-, дельта-, эпсилон- и мю-гены константной области, а также бесчисленное множество иммуноглобулиновых генов варибельной области. Легкие цепи классифицируют на каппу или лямбду. Тяжелые цепи классифицируют на гамму, мю, альфу, дельту или эпсилон, которые в свою очередь определяют классы иммуноглобулинов, IgG, IgM, IgA, IgD и IgE, соответственно.

Структурная единица типичного иммуноглобулина (антитела) содержит тетрамер. Каждый тетрамер состоит из двух идентичных пар полипептидных цепей, каждая из которых содержит одну «легкую» (около 25 кДа) и одну «тяжелую» цепь (около 50-70 кДа). N-терминал каждой цепи определяет варибельную область примерно 100-110 или более аминокислот, главным образом ответственную за распознавание антигена. Термины «варибельная легкая цепь» (V_L) и «варибельная тяжелая цепь» (V_H) относятся к указанной легкой и тяжелой цепи соответственно.

«Химерное антитело» представляет собой молекулу антитела, в которой (a) константная область или ее часть изменена, замещена или заменена таким образом, что антигенсвязывающий центр (варибельная область) связан с константной областью другого или измененного класса, эффекторной функции и/или вида или совершенно другой молекулы, которая придает новые свойства химерному антителу, например, фермента, токсина, гормона, фактора роста, лекарственного средства и т.д.; или (b) варибельная область или ее часть изменена, замещена или заменена на варибельную область, обладающую другой или измененной специфичностью по отношению к антигену.

Антитело «анти-T2R» представляет собой антитело или фрагмент антитела, который специфично связывается с полипептидом, кодированным геном T2R, кДНК или ее

подпоследовательностью.

Термин «иммунологический анализ» представляет собой анализ с использованием антитела для специфического связывания с антигеном. Иммунологический анализ характеризуется использованием свойств специфического связывания конкретного антитела для изолирования, нацеливания и/или для количественного определения антигена.

Термин «специфично (или селективно) связывается» с антителом или «специфично (или селективно) иммунореактивный по отношению к» при употреблении к белку или пептиду означает реакцию связывания, которая определяет присутствие белка в гетерогенной популяции белков и других биологических форм. Таким образом, в обозначенных условиях иммунологического анализа определенные антитела связываются с конкретным белком по меньшей мере в два раза больше и по существу не связываются в значительном количестве с другими белками, присутствующими в образце. Для специфического связывания с антителом в таких условиях может быть необходимо антитело, которое выбирают исходя из его специфичности по отношению к конкретному белку.

Например, поликлональные антитела, выращенные к члену семейства T2R конкретных видов, таких как крыса, мышь или человек, могут быть выбраны для получения только тех поликлональных антител, которые являются специфично иммунореактивными по отношению к полипептиду T2R или к его иммуногенной части, а не к другим белкам за исключением ортологов или полиморфных вариантов и аллелей полипептида T2R. Данный выбор может быть осуществлен путем удаления антител, которые дают перекрестную реакцию с молекулами T2R других видов или другими молекулами T2R. Также могут быть выбраны только те антитела, которые распознают GPCR только семейства T2R, а не GPCR других семейств. Может быть использован ряд форматов иммунологического анализа для выбора антител, специфично иммунореактивных по отношению к конкретному белку. Например, твердофазные иммунологические анализы ИФА (ELISA) обычно используют для выбора антител, специфично иммунореактивных по отношению к белку (см., например, Harlow & Lane, *Antibodies, A Laboratory Manual*, (1988) для описания форматов и условий иммунологического анализа, которые могут быть использованы для определения специфичной иммунореактивности). Как правило, специфическая или селективная реакция будет представлять собой по меньшей мере двукратный фоновый сигнал или шум, а в основном больше, чем 10-100-кратный фоновый сигнал или шум.

Термин «селективно ассоциируется с» относится к способности нуклеиновой кислоты «селективно гибридизоваться» с другой нуклеиновой кислотой, как определено выше, или к способности антитела «селективно (или специфично) связываться» с белком, как определено выше.

Термин «вектор экспрессии» относится к любой системе для рекомбинантной экспрессии для экспрессии последовательности нуклеиновой кислоты согласно настоящему изобретению *in vitro* или *in vivo*, конститутивно или индуцируемо в любой клетке, включая прокариотическую, дрожжевую, грибковую, растительную клетку, клетку насекомого или млекопитающего. Указанный термин включает линейные или кольцевые системы для экспрессии. Термин включает системы для экспрессии, которые остаются в эписомальной форме или интегрируют в геном клетки-хозяина. Системы для экспрессии могут быть или не быть способны к саморепликации, т.е. осуществлять только временную экспрессию в клетке. Термин включает рекомбинантные экспрессионные «кассеты», содержащие только минимальное количество элементов,

необходимых для транскрипции рекомбинантной нуклеиновой кислоты.

Под термином «клетка-хозяин» понимают клетку, которая содержит вектор экспрессии и способствует репликации или экспрессии вектора экспрессии. Клетки-хозяева могут представлять собой прокариотические клетки, такие как *E. coli*, или эукариотические клетки, такие как клетки дрожжей, насекомых, земноводных или млекопитающих, такие как CHO, HeLa, HEK-293 и т.п., например, культивируемые клетки, эксплантаты и клетки *in vivo*.

Исходя из вышеизложенного, согласно настоящему изобретению предложены анализы для идентификации соединений, которые модулируют, предпочтительно блокируют, конкретную активацию ранее идентифицированного рецептора горького вкуса человека с помощью горьких соединений, например, горьких соединений, присутствующих в кофе и полученных из него экстрактах, и структурно родственных и других горьких соединений. В частности, согласно настоящему изобретению предложены анализы на основе клеток для осуществления идентификации соединений, которые модулируют (например, блокируют) активацию hT2R8 и hT2R14. Данные соединения будут модулировать горький вкус, связанный с этими вкусовыми рецепторами у людей. Это будет подтверждено тестами на вкус.

Согласно настоящему изобретению также идентифицирован и предложен антагонист с разнообразными антагонистическими свойствами, который может быть использован в продуктах питания, напитках, лекарственных средствах и других веществах для приема внутрь человеком или животным, содержащих известные и неизвестные горькие соединения, в которых горький вкус подходящим образом сведен к минимуму или устранен.

Тот факт, что вышеуказанные вкусовые рецепторы в частности реагируют на горькое соединение (соединения), присутствующее в кофе, и на конкретные горькие соединения, которые взаимодействуют с одним, многочисленными или неизвестными рецепторами горького вкуса, был определен по существу с помощью системы для экспрессии HEK293 и кальциевых способов визуализации, описанных в других публикациях, а также патентных заявках, поданных настоящим правопреемником, например, США за сер. № 10/191058 и 09/825882, обе из которых полностью включены в настоящее описание посредством ссылки. Более конкретно, настоящие изобретатели трансфицировали клетки HEK293 определенным hT2R, меченным родопсиновой меткой в 35 аминокислот (SEQ ID NO:1), совместно с химерным G-белком (G16gust44), который содержит последовательность G-белка G_{α16}, модифицированную путем замещения карбокси-44 аминокислотных остатков на остатки густдущина, и фиксировали реакции данных клеток на конкретные горькие лиганды с помощью кальциевых способов визуализации.

В частности, изобретатели использовали анализ на основе клеток млекопитающего для наблюдения за активностью hT2R. Для кальциевых визуализирующих анализов клетки высевали в 48-луночные планшеты для тканевой культуры. Через 24 часа клетки временно трансфицировали экспрессионной плазмидой (pEAK10), содержащей последовательность нуклеиновой кислоты hT2R, и плазмидой (pEAK10), содержащей химерный G-белок (G16gust44). Еще через 24 часа клетки инкубировали с флуоресцентным красителем, специфичным в отношении кальция (Fluo-4; Molecular Probes). Нагруженные клетки подвергают воздействию различных горьких молекул, и активация hT2R приводит к активации G16gust44, которая в свою очередь приводит к мобилизации кальция внутри клеток. Такое увеличение концентрации кальция изменяет флуоресцентные свойства кальциевого красителя внутри клеток. Данные изменения контролируют с помощью флуоресцентной микроскопии.

Изобретатели также использовали автоматизированную флуориметрическую прицельную систему FLIPR с применением немного отличающегося протокола. Линию клеток HEK293, стабильно экспрессирующую G16gust44, трансфицировали экспрессионной плазмидой hT2R, через 24 часа клетки нагружали и анализировали на FLIPR.

После идентификации лиганда на предмет конкретного hT2R получают линию клеток HEK293, стабильно экспрессирующую как hT2R, так и G16gust44, облегчая последующие скрининговые анализы для идентификации других лигандов, которые активируют конкретный hT2R или которые модулируют (блокируют или усиливают) активацию hT2R с помощью другого горького лиганда, такого как горькое соединение, содержащееся в кофе. Это позволяет избежать временной трансфекции.

Как показано на фигурах, в результате таких экспериментов было выявлено, что hT2R8 и hT2R14 реагируют на присутствующие в кофе горькие соединения, и идентифицированы соединения, которые ингибируют или блокируют горький вкус кофе. Также в результате экспериментов на Фиг.5 и в Примере 3 ниже выявляют основные антагонистические свойства Соединения С, в частности.

Эти результаты показывают, что клетки, которые идентифицировали вкусовые рецепторы hT2R, могут быть использованы в анализах для идентификации лигандов, модулирующих горький вкус, связанный по меньшей мере с одним из указанных конкретных hT2R, а также в анализах для обнаружения соединений, ответственных за горький вкус.

Предпочтительно, в этих анализах будет использована тестируемая клетка, которая экспрессирует ДНК, кодирующую hT2R, содержащий одну из аминокислотных последовательностей, идентифицированных ниже. Однако ожидается, что фрагменты, ортологи, варианты или химеры полипептидов этих рецепторов, которые сохраняют функциональные свойства этих рецепторов горького вкуса, т.е. реагируют на некоторые горькие соединения, также будут пригодными в этих анализах. Примеры таких вариантов включают сплайс-варианты, однонуклеотидные полиморфизмы, аллельные варианты и мутации, полученные рекомбинантными или химическими способами или встречающиеся в природе. Способы выделения и экспрессии рецепторов T2R, которые используют в анализах согласно настоящему изобретению и анализах, которые предусмотрены для использования в настоящем изобретении для идентификации соединений, ингибирующих активацию этих рецепторов, приведены ниже.

Выделение и экспрессия T2R

Выделение и экспрессию T2R или их фрагментов или вариантов согласно настоящему изобретению можно осуществлять при помощи обычных методик клонирования с использованием проб или праймеров, сконструированных на основе последовательностей нуклеиновых кислот T2R, представленных в настоящей заявке. Последовательности, родственные T2R, также можно идентифицировать по базам данных генома человека и других видов при помощи последовательностей, представленных в настоящем описании и известных компьютерных поисковых технологий, например, программы поиска последовательностей BLAST. В одном варианте осуществления, псевдогены, описанные в настоящей заявке, можно применять для идентификации функциональных аллелей или родственных генов.

Векторы экспрессии далее можно применять для инфицирования или трансфицирования в клетку-хозяина для функциональной экспрессии целевых последовательностей. Эти гены и векторы можно создавать и экспрессировать *in vitro* или *in vivo*. Специалисту в данной области будет понятно, что фенотипы, подходящие

для изменения и контроля за экспрессией нуклеиновых кислот можно получить путем модуляции экспрессии или активности генов и нуклеиновых кислот (например, при помощи промоторов, энхансеров, и т.д.) в составе векторов согласно настоящему изобретению. Можно применять любой из известных описанных методов снижения или повышения экспрессии или активности. Настоящее изобретение можно применять в комбинации с любым из способов или протоколов, известных в данной области, и подробно описанных в научной и патентной литературе.

Также нуклеиновые кислоты можно синтезировать *in vitro* при помощи хорошо известных методик химического синтеза, как описано в, например, 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); патент США № 4458066. Двухцепочечные фрагменты ДНК можно получить как путем синтеза комплементарной цепи и отжигом цепей в соответствующих условиях, так и путем добавления комплементарной цепи с использованием ДНК-полимеразы с подходящей последовательностью праймера.

Методики манипуляций с нуклеиновыми кислотами, например, для получения мутаций в последовательностях, субклонирования, внесения метки в пробы, секвенирования, гибридизации, и им подобных, подробно описаны в научной и патентной литературе. См., например, 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).

Нуклеиновые кислоты, векторы, капсиды, полипептиды, им подобные можно анализировать и количественно оценивать любым из многих обычных методов, хорошо известных специалистам в данной области. Такие методы включают, например, методы аналитической биохимии, такие как ЯМР, спектрофотометрия, радиография, электрофорез, капиллярный электрофорез, высокоэффективная жидкостная хроматография (ВЭЖХ), тонкослойная хроматография (ТСХ), и гипердиффузионная хроматография; различные иммунологические методы, например, реакция преципитации в геле или жидкости, иммунодиффузия, иммуноэлектрофорез, радиоиммуноанализ (РИА), твердофазный иммуноферментный анализ (ELISA), иммунофлуоресцентный анализ, Саузерн-блот, Нозерн-блот, дот-блот, гель-электрофорез (например, электрофорез в полиакриламидном геле с додецилсульфатом натрия), ПЦР в режиме реального времени, количественная ПЦР, другие методы амплификации нуклеиновых кислот, нацеливания или усиления сигнала, внесения радиоактивной метки, подсчета импульсов и аффинной хроматографии.

Для амплификации нуклеиновых кислот, кодирующих участок связывания лиганда T2R, можно применять олигонуклеотидные праймеры. Нуклеиновые кислоты, описанные в настоящей заявке, также можно клонировать и определять их количество при помощи методик амплификации. Методики амплификации также хорошо известны в данной области и включают, например, полимеразную цепную реакцию (ПЦР) (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)); лигазную цепную реакцию (ЛЦР) (Wu, Genomics, 4:560 (1989); Landegren, Science, 241:1077 (1988); Barringer, Gene, 89:117 (1990)); транскрипционную амплификацию (Kwoh, PNAS, 86:1173 (1989));

самоподдерживающуюся репликацию последовательностей (Guatelli, PNAS, 87:1874 (1990)); Q β репликазную амплификацию (Smith, J. Clin. Microbiol., 35:1477-91 (1997)); автоматизированный амплификационный анализ с репликазой Q β (Burg, Mol. Cell. Probes, 10:257-71 (1996)); и другие методики с использованием РНК-полимеразы (например, NASBA, Cangene, Mississauga, Ontario). См. также, Berger, Methods Enzymol., 152:307-16 (1987); Sambrook; Ausubel; U.S. Pat. Nos. 4,683,195 и 4,683,202; Sooknanan, Biotechnology, 13:563-64 (1995).

Аmplифицированные нуклеиновые кислоты, как по отдельности, так и в виде библиотек, если это потребуется, можно клонировать в соответствии с методами, известными в данной области, в любой из множества векторов при помощи обычных методов молекулярной биологии; методы клонирования амплифицированных нуклеиновых кислот *in vitro* описаны, например, в патенте США № 5426039. Для облегчения клонирования амплифицированных последовательностей, в пару праймеров для ПЦР можно встроить сайты ферментативной рестрикции. Например, в пару праймеров согласно настоящему изобретению встраивали сайты Pst I и Bsp E1. Эти особые сайты рестрикции содержат последовательность, так что, если их подвергнуть лигированию, они будут находиться внутри рамки считывания с «донорной» кодирующей последовательностью рецептора, состоящего из 7 трансмембранных доменов, внутрь которой их сплайсируют (кодирующая последовательность участка связывания лиганда находится внутри относительно полипептида, состоящего из 7 трансмембранных полипептидов, таким образом, если требуется, чтобы конструкция транслировалась в прямом направлении от сплайсированного сайта рестрикции ферментом, продукты вне рамки считывания являются нежелательными; это может быть обязательным, если включаемая область лиганда в основном представляет собой VII трансмембранный домен). Для сохранения исходной последовательности донорного рецептора, состоящего из 7 трансмембранных доменов, можно создать праймеры. В качестве альтернативы, праймеры могут кодировать аминокислотные остатки, представляющие собой консервативные замены (например, гидрофобные для гидрофобного остатка, см. приведенные выше данные), или функционально полезные последовательности (например, не ограничивающие сборку плазматической мембраны, вызывающие расщепление пептидазами, вызывающие неправильную складку рецептора, и т.п.).

Можно создавать пары праймеров для селективной амплификации участков связывания лиганда белков семейства T2R. Эти участки связывания лиганда могут отличаться своими лигандами; следовательно, участок, который может служить минимальным участком связывания для одного лиганда, может оказаться слишком ограниченным для второго потенциального лиганда. Следовательно, можно амплифицировать участки связывания T2R (имеющего 7 трансмембранных доменов) разного размера, состоящие из различных доменов; например, из трансмембранных (ТМ) доменов со II по VII, с III по VII, с III по VI или со II по VI, или их вариантов (например, только подпоследовательность определенного домена, последовательность с измененным порядком доменов, и т.п.) или T2R, включающего 7 трансмембранных доменов.

Поскольку доменная структура и последовательность многих белков семейства T2R, имеющих в своем составе 7 трансмембранных доменов, известны, специалист в данной области способен выбрать фланкирующие и внутренние доменные последовательности в качестве модельных последовательностей для создания вырожденных пар праймеров для амплификации. Например, последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующую

со II по VII домены, можно создать методом амплификации при помощи реакции ПЦР с использованием пары праймеров. Для амплификации нуклеиновой кислоты, несущей последовательность I трансмембранного домена (TM I), можно создать вырожденный праймер из нуклеиновой кислоты, кодирующей 1 консенсусную последовательность семейства T2R, описанную выше. Такой вырожденный праймер можно использовать для создания участка связывания, включающей TM с I по III, TM с I по IV, TM с I по V, TM с I по VI или TM с I по VII). Базируясь на консенсусных последовательностях белков семейства T2R, представленных в настоящей заявке, можно создавать и другие вырожденные праймеры. Такой вырожденный праймер можно использовать для создания участка связывания, включающей TM с III по IV, TM с III по V, TM с III по VI или TM с III по VII.

Схемы создания пар вырожденных праймеров хорошо известны в данной области. Например, компьютерная программа COnsensus-DEgenerate Hybrid Oligonucleotide Primer (CODEHOP) доступна по адресу <http://blocks.fhcr.org/codehop.html>, и напрямую связана с сайтом BlockMaker, осуществляющим выравнивание множественных последовательностей для определения гибридных праймеров, начиная с ряда родственных белковых последовательностей, таких как известные участки связывания лиганда вкусового рецептора (см., например, Rose, *Nucleic Acids Res.*, 26:1628-35 (1998); Singh, *Biotechniques*, 24:318-19 (1998)).

Средства синтеза пар олигонуклеотидных праймеров хорошо известны в данной области. Можно использовать "природные" пары оснований или синтетические пары оснований. Например, использование искусственных нуклеотидных оснований предоставляет необязательность разностороннего подхода к манипуляциям с последовательностью праймера и созданию более сложной смеси продуктов амплификации. Различные семейства искусственных нуклеотидных оснований способны приобретать множественные направления водородных связей, путем сдвигов внутренних связей для получения необязательностей вырожденного молекулярного распознавания. Внесение таких аналогов в одном положении праймера для ПЦР позволяет создавать сложную библиотеку продуктов амплификации. См., например, Hoops, *Nucleic Acids Res.*, 25:4866-71 (1997). Для получения структурных аналогов природных оснований в составе ДНК также можно использовать и неполярные молекулы. Структурный аналог без водородных связей аденина может успешно и селективно реплицироваться против неполярного структурного аналога тимина (см., например, Morales, *Nat. Struct. Biol.*, 5: 950-54 (1998)). Например, два вырожденных основания могут быть пиримидиновым основанием 6Н, 8Н-3,4-дигидропиримидо[4,5-с][1,2]оксазин-7-оном или пуриновым основанием N6-метокси-2,6-диаминопурином (см., например, Hill, *PNAS*, 95:4258-63 (1998)). Примеры вырожденных праймеров согласно настоящему изобретению включают аналог нуклеотидного основания 5'-диметокситритил-N-бензоил-2'-дезокситидин, 3'-[(2-цианоэтил)-(N,N-диизопропил)]фосфорамидит (термин "P" в последовательностях, см. выше). Этот аналог пиримидина образует водородные связи с пуринами, включая остатки А и G.

Полиморфные варианты, аллели, и межвидовые гомологи, по существу идентичные рецептору, описанному в настоящей заявке, можно выделять при помощи проб нуклеиновых кислот, описанных выше. В другом варианте, для клонирования полипептидов и полиморфных вариантов, аллелей и межвидовых гомологов T2R можно использовать библиотеки экспрессируемых последовательностей, определяя экспрессируемые гомологи иммунологическим методом с использованием антисыворотки или очищенных антител к полипептиду T2R, которые также распознают

и селективно связывают гомолог T2R.

Нуклеиновые кислоты, кодирующие участки связывания лигандов вкусовых рецепторов, можно получать путем амплификации (например, при помощи ПЦР) соответствующих последовательностей нуклеиновых кислот, используя соответствующие
5 (идеальные или вырожденные) пары праймеров. Нуклеиновая кислота, которую будут амплифицировать, может представлять собой ДНК любой клетки или ткани, или мРНК или кДНК, полученную из клеток, экспрессирующих вкусовой рецептор.

В одном варианте осуществления, конструируют гибридные последовательности, кодирующие белки, включающие нуклеиновые кислоты, кодирующие T2R, слитые с
10 последовательностями, отвечающими за транслокацию. Также предложены гибридные T2R, включающие участки транслокации и участки связывания соединений, вызывающих ощущение вкуса, других семейств хемосенсорных рецепторов, в частности, вкусовых рецепторов. Эти последовательности нуклеиновых кислот можно функционально связать с контрольными элементами транскрипции или трансляции, например, с
15 последовательностями инициации транскрипции и трансляции, промоторами и энхансерами, терминаторами транскрипции и трансляции, последовательностями полиаденилирования, и другими последовательностями, участвующими в процессе транскрипции ДНК в РНК. В конструировании полигенных экспрессируемых кластеров, векторов и трансгенов, для того чтобы добиться точной экспрессии целевой нуклеиновой
20 кислоты во всех целевых клетках или тканях, можно использовать фрагмент-промотор.

В другом варианте осуществления, в белки слияния можно включать С-терминальные или N-терминальные последовательности транслокации. Дополнительно, белки слияния могут содержать дополнительные элементы, например, для детекции белков, их очистки, или для других целей. Детектирование и очистка таких вспомогательных доменов
25 включает, например, использование пептидов, образующих комплексы с металлами, таких как полигистидиновые каналы, гистидин-триптофановые элементы, или другие домены, позволяющие проводить очистку на иммобилизованных металлах; мальтоза-связывающий белок; домены белка А, позволяющие проводить очистку на иммобилизованном иммуноглобулине; или домен, используемый в системе очистки,
30 основанной на использовании метки FLAG и аффинности (Immunex Corp, Seattle Wash.).

Включение расщепляемых линкерных последовательностей, таких, как Фактор Ха (см., например, Ottavi, Biochimie, 80:289-93 (1998)), мотив узнавания субтилизиновой протеазы (см., например, Polyak, Protein Eng., 10:615-19 (1997)); энтерокиназ (Invitrogen, San Diego, Calif.), и им подобных, между доменом транслокации (для достаточной
35 экспрессии плазматической мембраны) и остальной частью транслируемого пептида, может быть полезно в целях облегчения очистки. Например, одна структура может включать полипептид, кодирующий последовательность нуклеиновой кислоты, связанный с шестью остатками гистидина, за которыми следует тиоредоксин, сайт расщепления (рестрикции) для энтерокиназы (см., например, Williams, Biochemistry, 34:
40 1787-97 (1995)), и С-терминальный домен транслокации. Остатки гистидина способствуют обнаружению и очистке, в то время, как сайт расщепления (рестрикции) для энтерокиназы предоставляет необязательности очистки целевого(ых) белка(ов) от оставшегося белка слияния. Технологии, касающиеся векторов, кодирующих белки слияния, и способы применения белков слияния, подробно описаны в научной и
45 патентной литературе (см., например, Kroll, DNA Cell. Biol., 12:441-53 (1993)).

Векторы экспрессии, как отдельные векторы экспрессии, так и их библиотеки, содержащие последовательности, кодирующие участок связывания лиганда, можно включить в геном, или в цитоплазму, или в ядро клетки, и экспрессировать при помощи

множества общепринятых методик, подробно описанных в научной и патентной литературе. См., например, Roberts, *Nature*, 328:731 (1987); Berger *supra*; Schneider, *Protein Expr. Purif.*, 6435:10 (1995); Sambrook; Tijssen; Ausubel. Технические описания, предоставляемые производителями биологических реагентов, также содержат
5 информацию, касающуюся известных биологических методов. Векторы можно выделять из природных источников, получить из таких источников, как АТСС или библиотеки GenBank, или получить при помощи синтетических или рекомбинантных методов.

Нуклеиновые кислоты можно экспрессировать в полигенных кластерах экспрессии, векторах или вирусах, постоянно или временно экспрессирующихся в клетках (например,
10 эписомные системы экспрессии). Для придания клеткам и последовательностям, подвергаемым трансформации, фенотипа, обеспечивающего необязательность селекции, в полигенные кластеры и векторы экспрессии можно включать маркеры селекции. Например, маркеры селекции могут кодировать информацию о поддержании эписомальной репликации, что устраняет необходимость интеграции в геном клетки-
15 хозяина. Например, маркер может кодировать устойчивость к антибиотикам (например, к хлорамфениколу, канамицину, G418, блеомицину, гидромицину) или устойчивость к гербицидам (например, к хлорсульфурону или Basta) для селекции клеток, которые подвергли трансформации целевыми последовательностями ДНК (см., например, Blondelet-Rouault, *Gene*, 190:315-17 (1997); Aubrecht, *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, 281:992-97
20 (1997)). Поскольку гены маркеров селекции, придающих устойчивость к таким субстратам, как неомицин или гидромицин, можно применять только в культуре ткани, в качестве маркеров селекции *in vitro* и *in vivo* также используют гены хеморезистентности.

Химерная последовательность нуклеиновой кислоты может кодировать участок
25 связывания лиганда T2R в пределах любого полипептида, состоящего из 7 трансмембранных доменов. По причине того, что полипептидные рецепторы, состоящего из 7 трансмембранных доменов, имеют одинаковые первичные последовательности и вторичную и третичную структуру, структурные домены (например, внеклеточный домен, трансмембранные домены, цитоплазматический домен,
30 и т.д.) можно идентифицировать путем анализа последовательности. Например, при помощи гомологического моделирования, анализа Фурье и определения периодичности спирали можно идентифицировать и охарактеризовать семь доменов с последовательностью, соответствующей рецепторам, состоящим из 7 трансмембранных доменов. Для оценки преобладающих периодов, характеризующих профили
35 гидрофобности и вариабельности анализируемых последовательностей, можно применять алгоритмы быстрого преобразования Фурье (FFT). Улучшение методов определения периодичности и коэффициента периодичности альфа-спирали могут обеспечить, например, методы по Donnelly, *Protein Sci.*, 2:55-70 (1993). Другие алгоритмы выравнивания и моделирования хорошо известны в данной области (см., например,
40 Peitsch, *Receptors Channels*, 4:161-64 (1996); Kyte & Doolittle, *J. Md. Biol.*, 157:105-32 (1982); и Cronet, *Protein Eng.*, 6:59-64 (1993).

Настоящее изобретение включает не только молекулы нуклеиновых кислот и полипептидов, имеющие определенные последовательности нуклеиновых кислот и аминокислот, но также их фрагменты, в частности, фрагменты, состоящие из, например,
45 40, 60, 80, 100, 150, 200 или 250 нуклеотидов, или более, а также фрагменты полипептидов, состоящие из, например, 10, 20, 30, 50, 70, 100 или 150 аминокислот, или более. Фрагменты нуклеиновых кислот необязательно кодируют антигенный полипептид, способный связываться с антителом к рецептору семейства T2R. Далее, фрагмент белка

согласно настоящему изобретению может быть антигенным фрагментом, способным связываться с антителом к рецептору семейства T2R.

Также предложены химерные белки, состоящие из по меньшей мере 10, 20, 30, 50, 70, 100, или 150 аминокислот, или более, по меньшей мере, одного из полипептидов T2R, описанных в настоящей заявке, попарно связанные с добавочными аминокислотами, представляющими другой GPCR или его часть, предпочтительно, являющийся членом суперсемейства белков, содержащих 7 трансмембранных доменов. Описанные химеры можно получить из рецепторов согласно настоящему изобретению и другого GPCR, или их можно создать, соединив два или более из представленных рецепторов. В одном варианте осуществления, одна часть химерного белка соответствует, или ее получают из трансмембранного домена полипептида T2R согласно настоящему изобретению. В другом варианте осуществления, одна часть химерного белка соответствует, или ее получают из одного или более трансмембранных фрагментов полипептида T2R, описанного в настоящей заявке, а остальная часть или части могут быть получены из другого GPCR. Химерные рецепторы хорошо известны в данной области, и также хорошо известны методики для их создания и селекции, а также границы доменов или фрагментов рецепторов, сопряженных с G-белком (GPCR). Таким образом, специалист в данной области может применить эти знания для создания таких химерных рецепторов. Использование таких химерных рецепторов может обеспечить необязательность, например, охарактеризовать вкусовую специфичность одного из рецепторов, описанных в настоящей заявке, а также охарактеризовать передачу сигнала через другой рецептор, такой как хорошо известный рецептор, используемый в способах анализа согласно известному уровню техники.

Например, такой участок, как участок связывания лиганда, внеклеточный домен, трансмембранный домен, цитоплазматический домен, N-терминальный домен, C-терминальный домен, или любую их комбинацию, может быть ковалентно связан с гетерологичным белком. Например, трансмембранная область T2R может быть связана с трансмембранной областью гетерологичного GPCR, или внеклеточный домен гетерологичного GPCR может быть связан с трансмембранной областью T2R. Другие гетерологичные белки, среди которых можно делать выбор, включают, например, зеленый флуоресцентный белок, полипептиды бета-галактозидазы, глутаматный рецептор, и полипептиды родопсина, например, N-терминальные фрагменты родопсина, например, родопсина быка.

Также настоящее изобретение охватывает применение различных клеток-хозяев для экспрессии T2R, их фрагментов или вариантов согласно настоящему изобретению. Для достижения высоких уровней экспрессии клонируемого гена или нуклеиновой кислоты, такой как молекулы кДНК, кодирующие T2R, их фрагменты или варианты согласно настоящему изобретению, специалист в данной области в обычном случае проведет субклонирование целевой последовательности нуклеиновых кислот в вектор экспрессии, содержащий сильный промотор для направления транскрипции, терминатор транскрипции/трансляции, и, для нуклеиновой кислоты, кодирующей белок, сайт связывания рибосомы для инициации трансляции. Подходящие бактериальные промоторы хорошо известны в данной области и описаны, например, в Sambrook et al. Предпочтительно, для экспрессии рецептора hT2R, используют системы экспрессии в эукариотических клетках.

Для введения чужеродных последовательностей нуклеотидов в клетку-хозяина можно применять любой из хорошо известных методов. Указанные методы включают применение кальций-фосфатной трансфекции, полибрена, слияния протопластов,

электропорации, липосом, микроинъекций, плазматических векторов, вирусных векторов, и другие хорошо известные методы внесения клонированной геномной ДНК, кДНК, синтетической ДНК, или другого чужеродного генетического материала в клетку-хозяина (см., например, Sambrook et al.). Единственным необходимым условием является то, чтобы конкретный процесс генетического конструирования позволял успешно внести, по меньшей мере, одну молекулу нуклеиновой кислоты в клетку-хозяина, способную экспрессировать T2R, его фрагмент или целевой вариант.

После введения вектора экспрессии в клетки, трансфицированные клетки культивируют в условиях, благоприятствующих экспрессии рецептора, фрагмента, или целевого варианта, который затем выделяют из культуры при помощи стандартных методик. Примеры таких методик хорошо известны в данной области. См., например, WO 00/06593, помещенную в настоящее описание посредством ссылки в соответствующем открытии виде.

Способы анализа для детектирования соединений, модулирующих активность hT2R согласно настоящему изобретению

Ниже описаны способы и композиции для определения того, связывается ли специфичным образом тестируемое соединение с полипептидом T2R согласно настоящему изобретению *in vitro* или *in vivo*. Для измерения влияния связывания лиганда химерными T2R относительно природных можно контролировать многие аспекты физиологии клеток. Указанные способы анализа можно осуществлять с использованием интактных клеток, экспрессирующих полипептид T2R, клеток с пермеабиллизованной мембраной, или на мембранных фракциях, полученных стандартными методами.

Вкусные рецепторы связывают соединения, вызывающие ощущения вкуса, и инициируют преобразование химического стимула в электрические сигналы. Активированный или ингибированный G-белок будет, соответственно, изменять свойства ферментов-мишеней, каналов и других белков-эффекторов. Некоторыми примерами являются активация цГМФ фосфодиэстеразы трансдуцином в зрительной системе, аденилатциклазы стимулирующим G-белком, фосфолипазы C Gq и другими G-белками, и модуляция различных каналов Gi и другими G-белками. Также можно оценивать последствия, такие как продукция диацилглицерола и IP3 фосфолипазой C, и, далее, мобилизацию кальция IP3.

Белки hT2R, являющиеся объектами исследования, обычно выбирают из полипептидов, имеющих последовательность, приведенную в списке последовательностей в настоящем описании перед формулой, или ее фрагменты или варианты, полученные в результате консервативных модификаций.

В качестве альтернативы, белки или полипептиды T2R для анализа можно получить из эукариотической клетки-хозяина, и они могут содержать последовательность аминокислот, имеющую определенный процент идентичности к приведенным полипептидам hT2R, или их консервативно модифицированным вариантам. Обычно, идентичность последовательностей аминокислот составляет по меньшей мере 30%, предпочтительно 30-40%, более предпочтительно 50-60, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, или 99%. Белки или полипептиды T2R для анализа необязательно содержат какой-либо участок полипептида T2R, такой как внеклеточный домен, трансмембранный домен, цитоплазматический домен, участок связывания лиганда, и т.п. Необязательно, приведенный в настоящем описании в качестве примера полипептид T2R или его часть, может быть ковалентно связан(а) с гетерологичным белком с образованием химерного белка, используемого в способах анализа, описанных в настоящей заявке.

Модуляторы активности T2R можно анализировать с использованием белков или полипептидов T2R, описанных выше, как рекомбинантных, так и природных. Белки или полипептиды T2R можно выделять, экспрессировать в клетках, экспрессировать на мембране, выделенной из клеток, экспрессировать в культуре ткани или в организме животного, как рекомбинантной, так и природной. Например, можно использовать срезы языка, клетки, выделенные из языка, трансформированные клетки, или мембраны. Модуляцию можно анализировать одним из способов анализа *in vitro* или *in vivo*, описанных в настоящей заявке.

Детектирование модуляторов

Композиции и способы для определения *in vitro* и *in vivo* того, связывает ли исследуемое соединение специфичным образом рецептор T2R согласно настоящему изобретению, описаны ниже. Для измерения связывания лиганда с полипептидом T2R согласно настоящему изобретению можно контролировать многие физиологические параметры клетки. Описанные способы анализа можно осуществлять на интактных клетках, экспрессирующих хемосенсорные рецепторы, клетках с пермеабелизованной мембраной, или на мембранных фракциях, полученных стандартными методами, или *in vitro*, используя белки, синтезированные *de novo*.

In vivo, вкусовые рецепторы связываются с соединениями, модулирующими вкус, и иницируют трансдукцию химических стимулов в электрические сигналы.

Активированный или ингибированный G-белок будет, соответственно, изменять свойства ферментов-мишеней, каналов и других эффекторных белков. Некоторыми примерами являются активация цГМФ фосфодиэстеразы трансдукцином в зрительной системе, аденилатциклазы стимулирующим G-белком, фосфолипазы C Gq и другими G-белками, и модуляция различных каналов Gi и другими G-белками. Также можно анализировать дальнейшие последствия по таким параметрам, как продукция диацилглицерола и IP3 фосфолипазой C, и, далее, мобилизация кальция IP3.

В качестве альтернативы, белки или полипептиды T2R, применяемые в анализе, можно получать из эукариотических клеток-хозяев, и они могут включать последовательность аминокислот, обладающую идентичностью по аминокислотам с полипептидами T2R, описанными в настоящей заявке или с их фрагментами, или вариантами, полученными путем консервативной модификации. Обычно идентичность последовательностей аминокислот составляет по меньшей мере от 35 до 50%, или необязательно, 75%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99%. Необязательно, белки или полипептиды T2R, применяемые в способах анализа, могут состоять из домена белка T2R, такого как внеклеточный домен, трансмембранный домен, трансмембранная область, цитоплазматический домен, участок связывания лиганда, и им подобных. Далее, как описано выше, белок T2R или его домен могут ковалентно связываться с гетерологичным белком с образованием химерного белка, применяемого в способах анализа, описанных в настоящей заявке.

Модуляторы активности рецептора T2R исследуют, применяя белки или полипептиды T2R, как описано выше, как рекомбинантные, так и природного происхождения. Белки или полипептиды T2R можно выделять, экспрессировать в клетке, экспрессировать на мембране, выделенной из клетки, экспрессировать в ткани или организме животного, как рекомбинантной, так и природного происхождения. Например, можно использовать срезы языка, клетки, выделенные из языка, трансформированные клетки, или мембраны. Модуляцию можно исследовать, применяя один из описанных в настоящей заявке методов *in vitro* или *in vivo*.

Анализы связывания *in vitro*

Трансдукцию вкуса также можно исследовать *in vitro* в реакциях в твердой или жидкой фазе, используя полипептиды T2R согласно настоящему изобретению. В одном варианте осуществления, участок связывания лиганда T2R можно использовать в реакциях *in vitro* в жидкой или твердой фазе для анализа связывания лиганда.

5 Не обязательно получение участка связывания лиганда из N-терминальной области с дополнительными частями внеклеточного домена, такими как внеклеточные петли трансмембранного домена.

Также осуществляли анализ связывания *in vitro* с другими GPCR, такими как метаболитные глутаматные рецепторы (см., например, Han and Hampson, J. Biol. Chem. 10 274:10008-10013 (1999)). Такие анализы могут включать внесение лиганда с радиоактивной или флуоресцентной меткой, измерение изменений в характеристической флуоресценции, или изменений в протеолитической чувствительности, и т.д.

Связывание лиганда с полипептидом T2R согласно настоящему изобретению можно исследовать в растворе, на двухслойной мембране, необязательно, иммобилизованной 15 на твердой фазе, в липидном монослое, или в липосомах. Связывание модулятора можно исследовать путем измерения например, изменение спектроскопических (например, флуоресценции, абсорбции, показателя преломления), гидродинамических (например, форма), хроматографических характеристики, или свойств растворимости.

В предпочтительном варианте осуществления изобретения, применяют анализ 20 связывания $^{[35S]}$ GTP γ S. Как описано выше, в отношении активации GPCR, субъединица G α G-белка стимулируется с преобразованием ГДФ в ГТФ. Стимуляцию обменной активности G-белка, опосредованную лигандом, можно измерять при помощи биохимических методов анализа, путем оценки связывания $^{[35S]}$ GTP γ S с радиоактивной 25 меткой и G-белка в присутствии предположительного лиганда. Обычно мембраны, содержащие целевой хемосенсорный рецептор, смешивают с G-белком. Потенциальные ингибиторы и/или активаторы и $^{[35S]}$ GTP γ S добавляют в реакционную смесь, и оценивают связывание $^{[35S]}$ GTP γ S с G-белком. Связывание можно оценивать подсчетом 30 сцинтилляции жидкости, или любыми другими способами, известными в данной области, включая сцинтилляционный анализ сближения (SPA). В других способах анализа можно использовать GTP γ S с меткой.

Флуоресцентный поляризационный анализ

В другом варианте осуществления, для детектирования и контроля связывания 35 лиганда можно применять методы анализа, основанные на флуоресцентной поляризации («ФП»). Флуоресцентная поляризация является универсальной лабораторной методикой для измерения равновесного связывания, гибридизации нуклеиновых кислот и ферментативной активности. Флуоресцентный поляризационный анализ является гомогенным, так как не требует этапа разделения, такого как центрифугирование, 40 фильтрация, хроматография, преципитация или электрофорез. Этот анализ проводят в реальном времени, непосредственно в растворе и без стадии иммобилизации. Значения поляризации можно оценивать повторно после добавления реагентов, так как измерение поляризации происходит быстро и не разрушает образец. В общем, эти методики можно 45 применять для измерения значений поляризации флуорофоров в диапазоне от низких пикомолярных до микромолярных уровней. В данном разделе необязательное применение флуоресцентную поляризацию в простом и количественном анализе образца для оценки связывания лигандов с полипептидами T2R согласно настоящему изобретению.

При возбуждении молекулы с флуоресцентной меткой при помощи линейно

плоскополяризованного света она излучает свет, степень поляризации которого обратно пропорциональна ее молекулярному вращению. Крупные молекулы с флуоресцентной меткой остаются относительно стационарными в ходе стадии возбуждения (в случае флуоресцеина, равной 4 наносекундам), и поляризация света остается относительно постоянной при переходе от возбуждения к излучению (эмиссии). Небольшие молекулы с флуоресцентной меткой медленно вращаются в ходе стадии возбуждения, и поляризация значительно меняется при переходе от возбуждения и излучению. Таким образом, небольшие молекулы имеют маленькие значения поляризации, а крупные молекулы имеют большие значения поляризации. Например, одноцепочечный олигонуклеотид с введенной в него флуоресцентной меткой имеет относительно низкое значение поляризации, но при гибридизации с комплементарной цепью значение его поляризации увеличивается. При применении ФП для детектирования и контроля связывания соединений, вызывающих вкусовые ощущения, способных активировать или ингибировать хемосенсорные рецепторы согласно настоящему изобретению, можно использовать соединения, вызывающие вкусовые ощущения, с флуоресцентной меткой, или аутофлуоресцентные соединения, вызывающие вкусовые ощущения.

Флуоресцентную поляризацию (P) определяют следующим образом:

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

где Int_{par} представляет собой интенсивность света, излучаемого параллельно плоскости возбуждающего света, и Int_{perp} представляет собой интенсивность света, излучаемого перпендикулярно плоскости возбуждающего света. P, являющаяся отношением интенсивностей света, представляет собой безразмерную величину. В комбинации с данным анализом можно применять, например, Veacon™ и Veacon 2000™. Такие системы обычно выражают поляризацию в единицах миллиполяризации (1 единица поляризации=1000 mP единиц).

Отношение между молекулярным вращением и размером описывается уравнением Перрена, см. статью Jolley, M. E. (1991) в Journal of Analytical Toxicology, pp. 236-240, включенную в настоящее описание посредством ссылки, в которой приведено описание данного уравнения. Вкратце, согласно уравнению Перрена, степень поляризация прямо пропорциональна величине периода релаксации, времени, требующемуся молекуле для вращения на угол примерно в $68,5^\circ$. Период релаксации вращения связан с вязкостью (η), абсолютной температурой (T), молекулярным объемом (V) и газовой постоянной (R) следующим уравнением: 2 (период релаксации вращения)= $3 V RT$.

Период релаксации вращения имеет маленькие значения (~ наносекунда) для небольших молекул (например, для флуоресцеина) и большие (~100 наносекунд) для крупных молекул (например, иммуноглобулины). Если вязкость и температуру поддерживают постоянными, период релаксации вращения и, соответственно, поляризация прямо пропорциональны размеру молекулы. Изменения молекулярного объема могут происходить из-за взаимодействий с другими молекулами, диссоциации, полимеризации, распада, гибридизации или конформационных изменений молекулы с флуоресцентной меткой. Например, флуоресцентную поляризацию применяли для оценки ферментативного расщепления протеазами, ДНКазами и РНКазами крупных полимеров с флуоресцентной меткой. Также его применяли для оценки равновесного связывания при белок-белковых взаимодействиях, взаимодействиях антиген-антитело, и взаимодействиях белок-ДНК.

Высокопроизводительные способы анализа в жидкой и в твердой фазе

В еще одном варианте осуществления предложен анализ в жидкой фазе с применением полипептида T2R, или клетки, или ткани, экспрессирующих полипептид T2R. В другом варианте осуществления согласно настоящему изобретению предложен высокопроизводительный анализ *in vitro* в твердой фазе, в котором полипептид T2R, или клетку или ткань, экспрессирующую полипептид T2R, закрепляют на твердофазном субстрате или соединении, стимулирующем вкус, и приводят в контакт с рецептором T2R, связывание определяют при помощи соответствующей метки или антитела к рецептору T2R.

Высокопроизводительные способы анализа согласно настоящему изобретению обеспечивают необязательность осуществлять скрининг до нескольких тысяч различных модуляторов или лигандов в течение одного дня. В частности, каждую лунку микротитрационного планшета можно использовать для проведения отдельных анализов с выбранным потенциальным модулятором, или, если исследуют влияние концентрации или времени инкубации, можно исследовать один модулятор в каждом 5-10 лунках. Таким образом, в одном стандартном микротитрационном планшете можно осуществлять анализ примерно 100 (например, 96) модуляторов. Если используют планшеты с 1536 лунками, в одном планшете можно с легкостью анализировать от приблизительно 1000 до приблизительно 1500 различных соединений. Также необязательно успешно осуществлять анализ нескольких соединений в каждой лунке планшета. Необязательно осуществлять анализ нескольких планшетов в день; применение интегрированных систем согласно настоящему изобретению обеспечивает необязательность осуществления скрининга до приблизительно 6000-20000 различных соединений. Позднее были разработаны микрожидкостные подходы для манипуляций с реагентами.

Целевую молекулу можно присоединить к твердофазному компоненту непосредственно или опосредованно, при помощи ковалентной или нековалентной связи, например, при помощи метки. Меткой может служить любой из множества компонентов. В общем, молекулу, связывающую метку, закрепляют на твердой основе, и целевая молекула (например, целевая молекула трансдукции вкуса) с введенной в нее меткой связывается с твердым субстратом посредством взаимодействия метки и молекулы, связывающей метку.

Можно применять ряд меток и молекул, связывающих метку, основываясь на молекулярных взаимодействиях, хорошо описанных в литературе. Например, в случае, если для метки существует связывающая молекула природного происхождения, например, биотин, белок А, или G-белок, ее можно использовать совместно с соответствующими молекулами, связывающими метку (авидин, стрептавидин, нейтравидин, Fc-фрагмент иммуноглобулина, и т.д.). Антитела к таким молекулам, имеющим природные связывающие молекулы, такие как биотин, также широко доступны, как и соответствующие молекулы, связывающие метку (см., SIGMA Immunochemicals 1998 catalogue SIGMA, St. Louis Mo.).

Также, для получения пары метка/связывающее метку соединение можно использовать любое соединение гаптенной или антигенной природы в комбинации с соответствующим антителом. Тысячи специфичных антител коммерчески доступны, и многие другие антитела описаны в литературе. Например, в одной из обычных конфигураций, метка является первым антителом, а связывающее метку соединение представляет собой второе антитело, распознающее первое антитело. В дополнение к взаимодействиям антиген-антитело, взаимодействия рецептор-лиганд также подходят в качестве пар метка/связывающее метку соединение. Примером являются агонисты и

антагонисты рецепторов мембраны клетки (например, такие взаимодействия клеточный рецептор-лиганд, как трансферрин, c-kit, лиганды вирусных рецепторов, цитокиновые рецепторы, рецепторы хемокинов, рецепторы интерлейкинов, рецепторы иммуноглобулинов и антитела, семейство кадгеринов, семейство интегринов, семейство селектинов, и т.п.; см., например, Pigott & Power, *The Adhesion Molecule Facts Book I* (1993)). Аналогично, с различными рецепторами клеток могут взаимодействовать токсины и яды, вирусные эпитопы, гормоны (например, опиаты, стероиды, и т.д.), внутриклеточные рецепторы (например, являющиеся медиаторами действия различных небольших лигандов, включая стероиды, тироидный гормон, ретиноиды и витамин D; пептиды), наркотики, лектины, сахара, нуклеиновые кислоты (как в линейной, так и в циклической полимерной конфигурациях), олигосахариды, белки, фосфолипиды и антитела.

Соответствующие метки или связывающие метку соединения также могут быть получены из синтетических полимеров, таких как полиуретаны, полиэстеры, поликарбонаты, полимочевины, полиамиды, полиэтиленимины, полиариленсульфиды, полисилоксаны, полиимиды и полиацетаты. Многие другие пары метка/связывающее метку соединения также применимы в системах анализа, описанных в настоящей заявке, как будет понятно специалисту в данной области из обзора настоящего открытия.

Также в качестве мишеней можно применять обычные линкеры, такие как пептиды, простые полиэферы, и т.п., включая полипептидные последовательности, такие как полиглициновые последовательности длиной от приблизительно 5 до приблизительно 200 аминокислот. Такие гибкие линкеры известны специалистам в данной области. Например, поли(этиленгликолевые) линкеры доступны в Shearwater Polymers, Inc. Huntsville, Ala. Такие линкеры могут содержать амидные связи, сульфгидрильные связи, или гетерофункциональные связи.

Связывающие метку соединения иммобилизуют на твердых субстратах при помощи любого из множества доступных на данный момент методов. Твердые субстраты обычно получают или функционализируют путем осуществления взаимодействия субстрата целиком или его части с химическим реагентом, фиксирующим химическую группу на поверхности, реагирующей с частью связывающего метку соединения. Примеры групп, подходящих для фиксации к длинной цепи, включают аминные, гидроксильные, тиольные и карбоксильные группы. Для функционалирования различных поверхностей, таких как поверхность стекла, можно применять аминоалкилсиланы и гидроксиалкилсиланы. Получение таких твердофазных биополимерных структур хорошо описано в литературе. См., например, Merrifield, *J. Am. Chem. Soc.*, 85:2149-2154 (1963) (описывающий твердофазный синтез, например, пептидов); Geysen et al., *J. Immun. Meth.*, 102:259-274 (1987) (описывающий синтез твердофазных компонентов на шпильках); Frank & Doring, *Tetrahedron*, 44:60316040 (1988) (описывающий синтез различных последовательностей пептидов на целлюлозных дисках); Fodor et al., *Science*, 251:767-777 (1991); Sheldon et al., *Clinical Chemistry*, 39(4): 718-719 (1993); и Kozal et al., *Nature Medicine*, 2(7):753759 (1996) (все перечисленные выше материалы описывают синтез биополимеров, прикрепленных к твердым субстратам). Нехимические подходы к присоединению связывающих метку соединений к субстратам включают обычные методы, такие как нагревание, образование поперечных сшивок под действием УФ излучения, и т.п.

Клеточные анализы

В одном из предпочтительных вариантов осуществления белок T2R экспрессируют в эукариотической клетке как в немодифицированной форме, так и в форме химерного,

модифицированного или укороченного рецептора с или, предпочтительно, без гетерологичной последовательности шаперона, способствующей его созреванию и нацеливанию на секреторном пути. Такие полипептиды T2R можно экспрессировать в любой эукариотической клетке, такой как клетки НЕК-293. В предпочтительном случае клетки содержат функциональный G-белок, например, G. α 15, или химерный G. α 16, густдудин или трансдудин, или химерный G-белок, такой как G16gust44, способный связываться с химерным рецептором внутриклеточного сигнального пути, или с сигнальным белком, таким как фосфолипаза C. Активацию рецепторов T2R в таких клетках можно определять при помощи любого стандартного метода, такого как определения изменений в содержании внутриклеточного кальция при помощи FURA-2 - зависимой флуоресценции в клетке. Описанный анализ является основой экспериментальных результатов, представленных в настоящей заявке.

Активированные рецепторы GPCR часто являются субстратом для киназ, фосфорилирующих С-концевой фрагмент рецептора (и необязательно, также другие сайты). Таким образом, активаторы способствуют переносу 32P с меченого АТФ на рецептор, который можно измерить при помощи сцинтилляционного счетчика. Фосфорилирование С-терминального конца будет способствовать связыванию аррестин-подобных белков, и будет препятствовать связыванию G-белков. Общий обзор сигнальной трансдукции GPCR и способов анализа сигнальной трансдукции приведен, например, *Methods in Enzymology*, vols. 237 и 238 (1994) и 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).

Модуляцию T2R можно исследовать путем сравнения ответа полипептидов T2R, обработанных предполагаемым модулятором T2R, с ответом необработанного контрольного образца или образца, содержащего известный «положительный» контроль. Такие предположительные модуляторы T2R могут включать молекулы, которые либо ингибируют, либо активируют активность полипептида T2R. В одном варианте осуществления, контрольным образцам, обработанным соединением, активирующим T2R, присваивают относительное значение активности T2R, равное 100. Ингибирования полипептида T2R достигают, когда значение активности T2R относительно контрольного образца равно 90%, необязательно 50%, необязательно 25-0%. Активации полипептида T2R достигают, когда значение активности T2R относительно контроля равно 110%, необязательно 150%, 200-500% или 1000-2000%.

Изменения в ионном потоке можно измерить путем определения изменений в поляризации ионов (т.е. электрическом потенциале) клетки или мембраны, экспрессирующей полипептид T2R. Одним из способов определения изменений в клеточной поляризации является измерение изменений в силе тока (измерение изменений в поляризации) при помощи фиксации потенциала методами регистрации потенциала (вольт-кламп) и пэтч-кламп (см., например, метод «прикрепленной клетки», метод «наизнанку», и метод «целой клетки», например, Ackerman et al., *New Engl. J Med.*, 336:1575-1595 (1997)). Токи целых клеток успешно измеряют при помощи стандарта. Другие известные способы анализа включают исследования меченных радиоактивным изотопом ионных токов при помощи красителей, чувствительных к электрическому напряжению (см., например, Vestergarrd-Bogind et al., *J. Membrane Biol.*, 88:67-75 (1988); Gonzales & Tsien, *Chem. Biol.*, 4:269-277 (1997); Daniel et al., *J. Pharmacol. Meth.*, 25:185-193 (1991); Holevinsky et al., *J. Membrane Biology*, 137:59-70 (1994)).

Влияние исследуемых соединений на функции полипептидов можно определять путем оценки любого из параметров, описанных выше. Для измерения влияния исследуемого

соединения на полипептиды согласно настоящему изобретению можно измерять любое подходящее физиологическое изменение активности GPCR. При определении физиологических эффектов на интактных клетках или животных, также можно измерять такие эффекты, как секреция трансмиттера, секреция гормонов, изменения транскрипции как с известными, так и с не описанными генетическими маркерами (например, анализ методом Нозерн-блот), измерения в метаболизме клетки, такие как рост клетки и изменения рН, и изменения в содержании внутриклеточных вторичных мессенджеров, таких как Ca²⁺, IP₃, цГМФ или цАМФ.

Предпочтительные способы анализа на GPCR включают клетки, нагруженные красителями, чувствительными к ионам или электрическому напряжению, для описания активности рецепторов. В способах анализа по определению активности таких рецепторов также можно применять известные агонисты и антагонисты для других парно связанных с G-белком рецепторов в качестве контроля для измерения активности исследуемых соединений. В способах анализа для идентификации модулирующих соединений (например, агонистов, антагонистов) контролируют изменения в уровне ионов в цитоплазме или электрическом напряжении на мембране при помощи флуоресцентного индикатора, чувствительного к ионам или электрическому напряжению на мембране, соответственно. К индикаторам, чувствительных к ионам, и образцам значений электрического напряжения, которые можно использовать, относятся приведенные в Molecular Probes 1997 Catalog. Для рецепторов, парно связанных с G-белком, в выбранном способе анализа можно использовать случайные G-белки, такие как Gα15 и Gα16 (Wilkie et al., Proc. Nat'l Acad. Sci., 88:10049-10053 (1991)). В качестве альтернативы, можно использовать другие G-белки, такие как густдуцин, трансдуцин, и химерные G-белки, такие как Gα16gust44 или Galpha16t25.

Активация рецептора инициирует последующие внутриклеточные события, например, увеличение содержания вторичных мессенджеров. Активация некоторых рецепторов, сопряженных с G-белками, стимулирует образование инозитол трифосфата (IP₃) через гидролиз фосфатидинозитола, опосредуемый фосфолипазой C (Berridge & Irvine, Nature, 312:315-21 (1984)). IP₃, в свою очередь, стимулирует выход кальция из внутриклеточных хранилищ. Таким образом, изменения в уровне ионов кальция в цитоплазме или изменения уровней вторичных мессенджеров, таких как IP₃, можно использовать для оценки функций рецепторов, сопряженных с G-белками. Клетки, экспрессирующие такие рецепторы, сопряженные с G-белками, могут обнаруживать повышенные уровни цитоплазматического кальция, которые являются результатом выхода кальция из внутриклеточных депо и входа внеклеточного кальция через ионные каналы в плазматической мембране.

В предпочтительном варианте осуществления, активность полипептида T2R измеряют по экспрессии гена T2R в гетерологичной клетке с каким-либо G-белком, связывающим рецептор с путем передачи сигнала с участием фосфолипазы C (см. Offermanns & Simon, J. Biol. Chem., 270:15175-15180 (1995)). Предпочтительно, линией клеток является HEK-293 (в норме не экспрессирующие гены T2R), а G-белком является Gα15 (Offermanns & Simon, supra), или химерный G-белок, такой как Gα16gust44. Модуляцию передачи вкусовых сигналов исследуют путем измерения изменений уровней внутриклеточного Ca²⁺, которые происходят в ответ на модуляцию пути передачи сигнала T2R при введении молекулы, связывающейся с полипептидом T2R. Изменения уровней Ca²⁺ можно измерять с применением флуоресцентных красителей-индикаторов Ca²⁺ и методики получения флуоресцентного изображения.

В другом варианте осуществления, осуществляют анализ гидролиза

фосфотидилинозитола (PI) в соответствии с патентом США № 5436128, включенным в настоящее описание посредством ссылки. Вкратце, анализ включает введение в клетки метки 3H-миоинозитола на 48 или более часов. Клетки с введенной в них меткой обрабатывают исследуемым соединением в течение часа. Обработанные клетки лизируют и выделяют в водном растворе хлороформа-метанола, после чего инозитолфосфаты отделяют методом ионообменной хроматографии, и регистрируют сцинтилляцию. Кратность стимуляции определяют путем расчета отношения cpm (импульсов в минуту) в присутствии агониста, к cpm в присутствии буферного контроля. Аналогичным образом, кратность ингибирования определяют путем расчета отношения cpm в присутствии агониста, к cpm в присутствии буферного контроля (который может содержать или не содержать агонист).

Другие способы анализа рецепторов могут включать определение уровня внутриклеточных циклических нуклеотидов, например, цАМФ или цГМФ. В случаях, когда активация рецептора приводит к снижению уровней циклических нуклеотидов, может быть предпочтительным подвергать клетки воздействию агентов, увеличивающих уровни внутриклеточных циклических нуклеотидов, например, форсколина, перед добавлением соединения, активирующего рецептор, к исследуемым клеткам. В одном варианте осуществления, изменения во внутриклеточном содержании цАМФ или цГМФ можно измерять при помощи иммунологических анализов. Для определения уровня цГМФ можно применять способ, описанный в Offermanns & Simon, *J. Bio. Chem.*, 270: 15175-15180 (1995). Также, для определения уровня цГМФ можно применять метод, описанный Felley-Bosco et al., *Am. J. Resp. Cell and Mol. Biol.*, 11:159-164 (1994). Далее, набор для измерения уровней цАМФ и/или цГМФ описан в патенте США № 4115538, включенном в настоящее описание посредством ссылки.

В другом варианте осуществления, можно измерять уровни транскрипции для оценки влияния исследуемого соединения на передачу сигнала. Клетку-хозяина, содержащую целевой полипептид T2R, приводят в контакт с исследуемым соединением на время, достаточное для того, чтобы оно оказало влияние на взаимодействия, а затем измеряют уровень экспрессии гена. Время, достаточное для оказания влияния на любые взаимодействия, может быть определено эмпирически, например, путем определения временных зависимостей и измерения уровня транскрипции в зависимости от времени. Уровень транскрипции можно измерять при помощи любого метода, известного специалистам в данной области. Например, экспрессию целевого белка мРНК можно определять методом Нозерн-блот, или можно идентифицировать ее полипептидные продукты при помощи иммунологических анализов. В качестве альтернативы, можно применять анализ транскрипции с использованием репортерного гена, как описано в патенте США № 5436128, включенном в настоящее описание посредством ссылки. Репортерные гены могут представлять собой, например, гены хлорамфеникол ацетилтрансферазы, люциферазы, бета-галактозидазы, бета-лактамазы и алкалинфосфатазы. Далее, целевой белок можно применять в качестве непрямого репортера посредством прикрепления к вторичному транспортеру, такому как зеленый флуоресцентный белок (см., например, Mistili & Spector, *Nature Biotechnology*, 15:961-964 (1997)).

Затем уровень транскрипции сравнивают с уровнем транскрипции в той же клетке в отсутствие исследуемого соединения, или его можно сравнивать с уровнем транскрипции в приблизительно идентичной клетке, в которой отсутствует(ют) целевой(ые) полипептид(ы). По существу идентичную клетку можно получить из тех же клеток, из которых получают рекомбинантную клетку, но не модифицированных включением

гетерологичной ДНК. Любое различие в уровне транскрипции показывает, что исследуемое соединение в какой-то степени изменяет активность целевого полипептида T2R.

Трансгенные животные, отличные от человека, в организме которых экспрессируются хемосенсорные рецепторы

Животные (не относящиеся к виду человек), в организме которых экспрессируются одна или более последовательностей рецепторов согласно настоящему изобретению, также можно использовать для рецепторов анализа. Такую экспрессию можно применять для определения, связывается ли исследуемое соединение специфичным образом с трансмембранным комплексом вкусового рецептора млекопитающих *in vivo*, путем приведения в контакт организма животного (не являющегося человеком), стабильно или временно трансфицированного нуклеиновыми кислотами, кодирующими хемосенсорные рецепторы или участок связывания лиганда указанных рецепторов с исследуемым соединением, и определения, реагирует ли животное на исследуемое соединение специфичным связыванием с полипептидным комплексом рецептора.

Животные, трансфицированные или инфицированные векторами согласно настоящему изобретению, особенно полезны для способов анализа для идентификации и исследования вкусовых стимулов, способных связываться со специфичными сайтами рецепторов. Такие животные, инфицированные вектором, экспрессирующие последовательности вкусовых рецепторов человека, могут быть полезны в скрининге *in vivo* вкусовых стимулов и их влияния, например, на клеточную физиологию (например, на вкусовые нейроны), на ЦНС или на поведение.

Средства для инфицирования/экспрессии нуклеиновых кислот и векторов, как индивидуально, так и в составе библиотек, хорошо известны в данной области.

Множество параметров отдельных клеток, органов или целых организмов животного можно измерять разнообразными средствами. Последовательности T2R согласно настоящему изобретению можно, например, экспрессировать во вкусовых тканях животного, посредством введения при помощи инфекционного агента, например, аденовирусного экспрессионного вектора.

Гены эндогенного вкусового рецептора могут сохранять функциональную активность и активность дикого типа (природную). В других случаях, когда желательно, чтобы вся функциональная активность рецептора была сообщена ему введенным экзогенным гибридным рецептором, предпочтительно использовать линию с нокаутом. Способы создания трансгенных животных (не относящихся к виду человек), в частности трансгенных мышей, а также селекции и создания рекомбинантных конструкций для получения трансформированных клеточек, хорошо известны в данной области.

Конструирование «нокаутной» клетки и животного основано на предположении, что уровень экспрессии определенного гена в клетке млекопитающего можно снизить или полностью исключить экспрессию путем введения в геном новой последовательности ДНК, служащей для прерывания части последовательности ДНК, которую нужно подавить. «Вставка генной ловушки» также может быть использована для разрушения гена хозяина, а для получения «нокаутных» трансгенных животных можно применять стволовые клетки эмбриона мыши (ES) (см., например, Holzschu, Transgenic Res 6:97-106 (1997)). Вставку экзогена обычно осуществляют при помощи гомологичной рекомбинации между комплементарными нуклеотидными последовательностями. Экзогенная последовательность представляет собой часть гена-мишени модификации, такую как экзон, интрон или последовательности, регулирующие транскрипцию, или любая последовательность генома, способная повлиять на уровень экспрессии гена-

мишени, или их комбинация. Нацеливание на гены посредством гомологичной рекомбинации в мультипотентных стволовых клетках зародыша позволяет модифицировать целевую последовательность генома с большой точностью. Для создания, скрининга, разведения «нокаутных» животных можно применять любую методику, см., например, 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); патент США № 5616491; 5464764; 5631153; 5487992; 5627059; 5272071; WO 91/09955; WO 93/09222; WO 96/29411; WO 95/31560; WO 91/12650.

Нуклеиновые кислоты согласно настоящему изобретению также можно использовать в качестве реагентов для получения «нокаутных» клеток человека, и их прогенов. Подобным образом нуклеиновые кислоты согласно настоящему изобретению можно использовать в качестве реагентов для получения "продуктов активации" (knock-in) в мышци. Ортологи T2R в геноме мышци можно заменить на T2R человека или крысы. Таким способом получают мышци, экспрессирующую T2R человека или крысы. Затем такую мышци можно использовать для анализа функции T2R человека и крысы, и идентифицировать лиганды для таких T2R.

Модуляторы

Соединения, тестируемые в качестве модуляторов рецептора семейства T2R, могут представлять собой любое небольшое химическое соединение или биологический объект, такой как белок, сахар, нуклеиновая кислота или липид. В качестве альтернативы, модуляторы могут являться генетически модифицированными вариантами члена семейства T2R. Обычно тестируемые соединения представляют собой небольшие химические молекулы или пептиды. В принципе, в качестве потенциального модулятора или лиганда в способах анализа согласно настоящему изобретению можно использовать любое химическое соединение, хотя чаще всего используют соединения, растворенные в водных или органических (в особенности, на основе DMSO, ДМСО) растворителях. Может быть разработан анализ для скрининга обширных химических библиотек путем автоматизации этапов анализа и обеспечения соединений, полученных из любого подходящего источника, для тестов, обычно проводимых в параллелях (например, в микротитрационных форматах или микротитрационных планшетах в роботизированных анализах). Специалисту в данной области понятно, что существует много поставщиков химических соединений, включая Sigma (St. Louis, Mo.), Aldrich (St. Louis, Mo.), Sigma-Aldrich (St. Louis, Mo.), Fluka Chemika-Biochemica Analytika (Buchs, Switzerland), и т.п.

В одном варианте осуществления, способы высокопроизводительного скринингового анализа включают обеспечение комбинаторной библиотеки химических веществ или пептидов, содержащей большое количество потенциальных терапевтических соединений (потенциальные модуляторы или лиганды). Такие «комбинаторные химические библиотеки» или «библиотеки лигандов» затем подвергают скринингу в одном или более способах анализа, описанных в настоящей заявке, для идентификации членов библиотеки (отдельные виды или подклассы химических соединений), обладающих целевой активностью. Соединения, идентифицированные таким образом, могут служить обычными «ведущими соединениями» или их можно использовать в качестве потенциальных или действительных продуктов потребления.

Комбинаторная библиотека химических веществ представляет собой коллекцию различных химических соединений, полученных как при помощи химического синтеза, так и при помощи биологического синтеза, путем комбинирования ряда химических «строительных блоков», таких как химические соединения. Например, линейную

комбинаторную химическую библиотеку, такую как библиотека полипептидов, получают путем объединения ряда химических «строительных блоков» (аминокислот) любым возможным способом, с получением соединений заданной длины (т.е. числом аминокислот в полипептиде). Путем такого комбинаторного смешивания химических

5 «строительных блоков» можно синтезировать миллионы химических соединений.

Получение и скрининг комбинаторных химических библиотек широко известны специалистам в данной области. Такие комбинаторные химические библиотеки включают, но не ограничиваются, пептидные библиотеки (см., например, патент США № 5010175, Furka, *Int. J. Pept. Prot. Res.*, 37:487-93 (1991) и Houghton et al., *Nature*, 354:84-10 88 (1991)). Также для создания комбинаторных химических библиотек можно использовать другие химические соединения. Такие химические соединения включают, но не ограничиваются следующими: пептоиды (например, WO 91/19735), кодированные пептиды (например, WO 93/20242), случайные биоолигомеры (например, WO 92/00091), бензодиазепины (например, патент США № 5288514), диверсомеры, такие как 15 гидантоины, бензодиазепины и дипептиды (Hobbs et al., *PNAS.*, 90:6909-13 (1993)), винилогические полипептиды (Hagihara et al., *J. Amer. Chem. Soc.*, 114:6568 (1992)), небелковые пептидомиметики с глюкозным каркасом (Hirschmann et al., *J. Amer. Chem. Soc.*, 114:9217-18 (1992)), аналогичные органические комбинации небольших библиотек соединений (Chen et al., *J. Amer. Chem. Soc.*, 116:2661 (1994)), олигокарбаматы (Cho et 20 al., *Science*, 261:1303 (1993)), пептидилфосфонаты (Campbell et al., *J. Org. Chem.*, 59:658 (1994)), библиотеки нуклеиновых кислот (Ausubel, Berger, Sambrook, all, см. выше), библиотеки нуклеиновых кислот, кодирующих пептиды (патент США № 5539083), библиотеки антител (Vaughn et al., *Nature Biotechnology*, 14(3):309-14 (1996) и PCT/US96/10287), библиотеки карбогидратов (Liang et al., *Science*, 274:1520-22 (1996) и патент США 25 № 5593853), библиотеки небольших органических молекул (бензодиазепины, Baum, *C&EN*, Jan. 18, page 33 (1993); тиазолидиноны и метатиазолидиноны, патент США № 5549974; пирролидины, патенты США № 5525735 и 5519134; соединения на основе морфолина, патент США № 5506337; бензодиазепины, 5288514, и т.п.).

Оборудование для создания комбинаторных библиотек, коммерчески доступно (см., 30 например, 357 MPS, 390 MPS (Advanced Chem Tech, Louisville Ky.), Symphony (Rainin, Woburn, Mass.), 433A (Applied Biosystems, Foster City, Calif.), 9050 Plus (Millipore, Bedford, Mass.)). В дополнение, коммерчески доступны несколько комбинаторных библиотек (см., например, ComGenex, Princeton, N.J.; Tripos, Inc., St. Louis, Mo.; 3D Pharmaceuticals, Exton, Pa.; Martek Biosciences; Columbia, Md.; etc.).

35 Согласно одному аспекту настоящего изобретения, модуляторы T2R можно применять в любом пищевом продукте, кондитерском изделии, фармацевтической композиции или в их ингредиентах для направленного модулирования вкуса продукта, композиции или ингредиента. Например, модуляторы T2R, усиливающие ощущение горького вкуса, можно добавлять с приданием горького вкуса продукту или композиции, 40 в то время как модуляторы T2R, ингибирующие ощущение горького вкуса, можно добавлять для блокирования горького вкуса продукта или композиции. Также, согласно настоящему изобретению, предложены способы идентификации горьких соединений в пищевых продуктах, напитках и лекарственных средствах и получения продуктов, напитков и лекарственных средств с улучшенным вкусом, в которых отсутствует или 45 ослаблено это качество.

Применение соединений, идентифицированных согласно настоящему изобретению

Соединения, идентифицированные согласно настоящему изобретению, можно добавлять в пищевые продукты, напитки, косметические или медицинские композиции

для модулирования, предпочтительно блокирования, горького вкуса, вызываемого активацией, по меньшей мере, одного из hT2R8 и/или hT2R14 горьким соединением, присутствующим в кофе и родственных кофе продуктах, напитках и лекарственных средствах, или структурно близкими им соединениями, или другими горькими соединениями, например, соединениями, присутствующими в пищевых продуктах и напитках, или лекарственных средствах и косметике, вызывающих ощущение горького вкуса.

В частности, Соединение С и его аналоги, благодаря их свойствам антагониста широкого спектра действия, можно использовать как добавку в пищевых продуктах, напитках, лекарственных средствах или другом соединении, предназначенных для употребления человеком и животными, горький вкус которых желательно смягчить. Учитывая свойства данного Соединения С, указанные соединения могут содержать горькие лиганды, взаимодействующие с рецепторами горького вкуса, такими, как hT2R3, 7, 10, 14, 16, 44, 51, 55, 61, 63, 64, 65, или 71 и/или с hT2R5, 9, 13, 54, 67 и 75, или их комбинацию, или они могут содержать горькие соединения, рецепторы горького вкуса к которым не установлены. Особенно предпочтительными вариантами применения являются соединения, активирующие несколько рецепторов горького вкуса.

Кроме того, соединения согласно настоящему изобретению, включая Соединение С, можно применять в анализах конкурентного связывания и в функциональных анализах, а также в тестировании во вкусовых пробах, для идентификации горьких соединений, горький вкус которых блокирует или ингибирует Соединение С.

Как было указано выше, предпочтительно, чтобы способность соединения, идентифицированного в клеточных анализах с T2R согласно настоящему изобретению, модулировать вкус, предпочтительно блокировать горький вкус, была подтверждена посредством вкусовой пробы с участием человека или животного, предпочтительно, во вкусовой пробе с участием человека.

Наборы

Гены T2R и их гомологи являются полезными инструментами для идентификации клеток вкусовых рецепторов в криминалистике и при определении отцовства, а также для исследований вкусовой сигнализации. Реагенты, специфичные к членам семейства T2R, подвергающиеся специфичным образом гибридизации с нуклеиновыми кислотами T2R, такие как пробы и праймеры T2R, и реагенты, специфические к T2R, специфичным образом связывающиеся с белком T2R, например, антитела к T2R, применяют для исследований экспрессии вкусовых клеток и регуляции передачи вкусовых ощущений (вкусовой сигнализации).

Средства (способы) анализа нуклеиновых кислот на присутствие в образце ДНК и РНК члена семейства T2R включают многочисленные методики, известные специалистам в данной области, такие как Саузерн-анализ, Нозерн-анализ, метод дот- блоттинга, защита от РНКазы, анализ S1, методики амплификации, такие как ПЦР, и гибридизация *in situ*. В методе гибридизации *in situ*, например, нуклеиновую кислоту, являющуюся мишенью, освобождают от ее клеточного окружения таким образом, чтобы она была доступна для гибридизации внутри клетки, сохранив при этом морфологию клетки для последующих исследований и анализов. Приведенные ниже статьи содержат обзор по гибридизации *in situ*: Singer et al., *Biotechniques*, 4:230250 (1986); Haase et al., *Methods in Virology*, vol. VII, 189-226 (1984); и Names et al., eds., *Nucleic Acid Hybridization: A Practical Approach* (1987). В дополнение, рекомбинантный белок T2R можно детектировать при помощи различных методов иммунологического анализа, описанных выше.

Исследуемый образец обычно сравнивают как с положительным контролем (например,

с образцом, экспрессирующим рекомбинантный белок T2R, так и с отрицательным контролем.

Согласно настоящему изобретению также предложены наборы для скрининга модуляторов рецепторов семейства T2R. Такие наборы можно изготовить из уже доступных материалов и реагентов. Например, такие наборы могут включать любые из следующих материалов, а также другие материалы: нуклеиновые кислоты и белки T2R, пробирки для реакций, инструкции по исследованию активности T2R. Набор, необязательно, включает набор функциональный полипептид T2R. Согласно настоящему изобретению можно изготовить широкий спектр наборов и компонентов в зависимости от задач пользователя и его конкретных потребностей.

Вслед за общим описанием изобретения более полное понимание информации обеспечивают следующие примеры, включенные в настоящее описание в качестве иллюстрации, и не рассматриваемых как ограничивающие. Очевидно, что в описанные в настоящей заявке примеры вариантов осуществления изобретения можно вносить различные модификации и изменения, без отклонения от идеи и объема изобретения.

ПРИМЕРЫ

Пример 1

hT2R8 и hT2R14 активируются горькой фракцией кофе

Для скрининга 25 T2R человека во временно трансфицированных клетках НЕК применяли частично очищенную фракцию кофе, как описано в предыдущих заявках на патент. Вкратце, (более подробное описание см. в публикации заявки на патент США № 2003/0170608, включенной в настоящее описание посредством ссылки), клетки первичной почки (мезонефроса) человека, стабильно экспрессирующие большой Т-клеточный антиген и белок G15 (НЕК-G15) временно трансфицировали экспрессионной плазмидой hT2R (например, используя фосфат Ca^{2+} или системы, основанные на липидах). Дополнительно, другие линии клеток НЕК-G15 временно трансфицировали другими T2R человека. Затем применяли флуоресцентный анализ для определения изменений в концентрациях кальция во временно трансфицированных клетках. Взаимодействие тестируемого соединения (соединений) с трансфицированными клетками вызывает стимуляцию сигнального каскада, ведущего к активации PLC и последующему возрастанию концентрации внутриклеточного кальция, ведущему к возникновению флуоресценции, которую регистрировали при помощи флуоресцентного красителя, чувствительного к кальцию. Указанные изменения отслеживали, используя, например, флуоресцентную микроскопию и соответствующее программное обеспечение (такое, как Imaging Workstation, Axon).

Фракция кофе имеет высокий уровень флуоресценции, что мешало проведению анализа. Для преодоления данных помех протестировали несколько синих красителей на способность блокировать флуоресценцию фракции кофе. Как показано на Фиг.1, фракция кофе активировала hT2R8 и hT2R14 в кальций-зависимом анализе с использованием временно трансфицированных клеток. В эксперименте, который иллюстрирует Фиг.1, использовали синий краситель FD&C 1 при концентрации 1,9 мМ. Выяснили, что эта фракция кофе активирует также несколько других hT2R. При использовании различных синих красителей активировались различные комбинации hT2R (Таблица 1). Тем не менее, hT2R8 и hT2R14 считают стабильно реагирующими на фракцию кофе, и активности этих двух рецепторов зависят от количества фракции кофе (Фиг.2). В эксперименте, который иллюстрирует Фиг.2, использовали синий краситель трипановый синий.

Таблица 1		
hT2R, активированные фракцией кофе, с различными синими красителями		
Синий краситель	Идентифицированные рецепторы hT2R	
	активировались	слабо активировались
FD&C 1	8, 14	---
Трипановый	1, 8, 14	10, 75
Кумасси	14	---

При применении данного способа анализа было обнаружено, что добавление горькой фракции из кофе к клеткам, экспрессирующим hT2R8 и hT2R14, активировало внутриклеточные G-белки. При применении того же способа анализа горькая фракция кофе, напротив, не активировала клетки НЕК-G15, которые временно трансфицировали другими hT2R. Этот эксперимент подтверждает вывод о том, что вкусовые рецепторы hT2R8 и hT2R14 специфичным образом реагируют на горькое(горькие) соединение (соединения), присутствующие в кофе.

Пример 2

Идентификация антагонистов hT2R8 и hT2R14

Для идентификации антагонистов были созданы линии клеток, стабильно экспрессирующие hT2R8 и hT2R14, соответственно, вместе с промискуитетным химерным белком G16g44, как описано в предыдущих заявках на патент. Провели высокопроизводительный анализ с использованием стабильных линий клеток и устройства FLIPR (Fluorescent Imaging Plate Reader). Для активации рецепторов до 70-80% их относительной максимальной активности использовали агонист hT2R8 или hT2R14. Агонист для hT2R8 представлял собой андрографолид (200 мкМ); а агонист hT2R14 представлял собой аристолохиевую кислоту (3 мкМ). Для идентификации антагонистов добавляли соединения с различной химической структурой вместе с агонистом. Соединения, вызывавшие статистически значимое снижение активности рецептора, объединяли и подтверждали результаты при помощи кривых ингибирования, отражающих зависимость от дозы. Соединение А и Соединение В идентифицировали как антагонисты hT2R8 (Фиг.3). Соединение С идентифицировали как антагонист hT2R14 (Фиг.4).

Пример 2а

Комбинации антагонистов hT2R8 и hT2R14 ослабляют горький вкус кофе

Проводили вкусовые пробы с комбинациями антагонистов hT2R8 и hT2R14 во фракции кофе и двух видах растворимого кофе (средней степени обжарки и обжаренном до средне-темного состояния), используя метод вынужденного выбора с 2 альтернативными вариантами на панели вкусов с участием 4-5 дегустаторов. Образцы кофе с антагонистами давали дегустаторам вкуса вместе с тем же образцом без антагонистов, дегустаторов просили определить более горький образец в паре. Как показано в Таблице 2, дегустаторы каждый раз определяли образцы фракции кофе без антагонистов как более горькие, чем образцы с антагонистами, что говорит о том, что антагонисты снижали горький вкус во фракции кофе. Также, как показано в Таблице 3, антагонисты снижали горький вкус обоих видов растворимого кофе.

Как было показано при помощи вкусовой пробы из этого примера, ощущение горечи в композициях (например, в пищевых продуктах, напитках и/или лекарственных средствах), проявляющееся как горький вкус, можно смягчить или устранить путем внесения в такие композиции антагонистов hT2R8 и/или hT2R14.

Для определения вклада отдельного антагониста проводили вкусовые пробы со среднеобжаренным кофе с Соединением С. Как показано в Таблице 4, антагониста hT2R14 (Соединения С) достаточно для снижения горького вкуса кофе в этом примере.

Таблица 2

Результаты вкусовой пробы с фракцией кофе и 2 различными комбинациями антагонистов

Проба	Антагонист		Концентрация (мкМ)	Выбрано в качестве горького соединения		Р объема
	hT2R8	hT2R14		без антагониста	с антагонистом	
1	Соед.А	Соед.С	30	32	0	<0,001
2	Соед.В	Соед.С	30	15	1	0,001
3	Соед.А	Соед.С	10	16	0	<0,001

Таблица 3

Результаты вкусовой пробы с 2 видами растворимого кофе

Растворимый кофе	Антагонист		Концентрация (мкМ)	Выбрано в качестве горького соединения		Р объема
	hT2R8	hT2R14		Без антагониста	с антагонистом	
Средний	Соед.А	Соед.С	30	16	0	<0,001
Средне-темный	Соед.А	Соед.С	30	13	3	0,021

Таблица 4

Результаты вкусовой пробы со среднеобжаренным кофе и индивидуальным антагонистом

Вкусовая проба	Антагонист	Концентрация (мкМ)	Выбрано в качестве горького соединения		Р объема
			без антагониста	с антагонистом	
1	Соединение С	50	18	2	<0,001
2	Соединение С	25	19	1	<0,001

Пример 3

Соединение С является антагонистом рецептора горького вкуса широкого спектра действия

Приведенный выше Пример 2 показывает, что Соединение С является антагонистом T2R человека, как было установлено при помощи высокопроизводительного скринингового анализа с использованием hT2R14. Дополнительные эксперименты выявили, что является антагонистом широкого спектра действия для 13 T2R человека и антагонистом более узкого спектра действия для 6 других T2R человека. Более того, во вкусовой пробе это соединение блокирует интенсивность горького вкуса, вызываемую рядом различных горьких субстанций.

В частности, для оценки селективности ингибирования Соединения С, это соединение тестировали с 22-мя T2R человека, лиганды для которых были определены Senomux. Об этих рецепторах и горьких лигандах, активирующих эти T2R человека, рассказывалось в предыдущих заявках на патент, включенных в настоящее описание посредством ссылки. Этими 22 T2R человека являются hT2R1, 3, 4, 5, 7, 8, 9, 10, 13, 14, 16, 44, 51, 54, 55, 61, 63, 64, 65, 67, 71 и 75. Последовательности аминокислот и нуклеиновых кислот всех указанных T2R можно найти в более ранних заявках на патент. Эти T2R человека, каждый индивидуально, временно трансфицировали в клетки НЕК293, стабильно экспрессирующие промискуитетный G-белок G16g44, и с использованием этих рецепторов осуществляли функциональные анализы, как описано в тех же заявках на патент. В этих экспериментах каждый рецептор активировали одним из лигандов, выбранным из горьких молекул, описанных ранее, для активации конкретного T2R. Лиганды использовали при уровнях концентрации EC80. Список использованных горьких лигандов и концентрации исследованных лигандов приведен в Таблице 5 в данном примере.

Далее, для подтверждения активности соединения in vitro в анализе рецепторов изобретатели проводили парное сравнение вкусовых проб для определения влияния

соединения *in vivo*. Дегустаторов просили попробовать на вкус горькие субстанции с или без Соединения С, и определить, какой из образцов более горький. Каждый дегустатор тестировал несколько пар, что обеспечило увеличение выборки, и результаты анализировали при помощи соответствующих статистических методов. Порядок образцов с Соединением С и без него был рандомизирован и уравновешен.

Для того чтобы убедиться в широком спектре антагонистических свойств соединения, его тестировали на способность блокировать горький вкус, вызываемый различными горькими лигандами, а также горький вкус, вызванный горькими лигандами, способность которых к активации множественных рецепторов горького вкуса известна, и горькими лигандами, не демонстрировавшими способность активировать конкретные hT2R. Исследовали несколько горьких молекул, способность которых активировать рецепторы горького вкуса известна, активация для которых ингибируется Соединением С. В частности, салицин является горькой молекулой, активирующей hT2R16, и вкусовая проба показала, что Соединение С в концентрации 40 мкМ может снижать его горький вкус. Фенилтиомочевина является горькой молекулой, активирующей hT2R51, и Соединение С снижало его горький вкус в концентрации 25 мкМ.

Несколько горьких молекул, способных активировать множественные T2R, подобным же образом тестировали с Соединением С. Активацию рецепторов горького вкуса для некоторых из этих молекул частично ингибировало Соединение С. Омепразол является горькой молекулой, активирующей hT2R10, 14 и 75. Несмотря на то, что его горький вкус необязательно опосредуют множественные рецепторы горького, его горький вкус также ощутимо снижало Соединение С. Ребаудиозид А является природным подсластителем с сильным горьким вкусом, активирующим, по меньшей мере, 7 T2R человека. Его горький вкус также снижало Соединение С.

Дополнительно, Соединение С ингибировало горький вкус для некоторых соединений, рецепторы к которым неизвестны, таких как декстрометорфан и дифенилгидрамин. Исследовали влияние Соединения С на эти соединения и выяснили, что их горький вкус также снижался.

В связи с приведенными выше данными, Фигура 5 содержит результаты экспериментов, в которых Соединение С тестировали с различными соединениями-антагонистами. Активность ингибирования представлена снижением активности рецептора в присутствии Соединения С. Фигура 5 демонстрирует, что 13 различных hT2R в значительной степени (более 30%) ингибировались Соединением С. Этими 13 hT2R являются hT2R3, 7, 10, 14, 16, 44, 51, 55, 61, 63, 64, 65 и 71. Шесть других рецепторов, включая hT2R5, 9, 13, 54, 67 и 75 также ингибировались, но в меньшей степени.

hT2R	Агонист	Концентрация
1	Пикриновая кислота	0,05 мМ
3	Хлорохин рН6,5	50 мкМ
4	Хлорохин рН6,5	5 мМ
5	Пиколин	10 мМ
7	Хлорохин рН6,5	10 мМ
8	Андрографолид	0,5 мМ
9	Офлоксацин	1 мМ
10	Стрихнин	50 мкМ
13	Оксифеноний	1 мМ
14	Аristoloxиевая кислота	2 мкМ

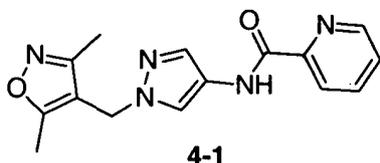
16	Салицин	1 мМ
44	Денатониум	0,5 мкМ
51	Ргор	2,5 мкМ
54	Ранитидин	5 мМ
55	Цинхонин	150 мкМ
61	Аristoloxиевая кислота	25 нМ
63	Кофеин	1 мМ
63	Андрографолид	100 мкМ
64	Аristoloxиевая кислота	1 мкМ
65	Олеуропеин	1 мМ
67	Андрографолид	5 мкМ
71	Пикриновая кислота	10 мкМ
75	Стрихнин	1 мкМ

Пример 4

Антагонисты hT2R8: Получение соединений согласно изобретению

Типичные соединения согласно изобретению синтезируют следующим образом.

Пример 4-1: N-(1-((3,5-диметилизоксазол-4-ил)метил)-1H-пиразол-4-ил)пиколинамид



1-((3,5-Диметилизоксазол-4-ил)метил)-1H-пиразол-4-амина гидрохлорид (пример 4-1a) (400 мг, 2,1 ммоль), пиколиновую кислоту (256 мг, 2,1 ммоль) и НОВt (388 мг, 2,50 ммоль) смешивали в ДХМ (7 мл). Реакционную смесь обрабатывали триэтиламино-

(670 мл, 4,8 ммоль) и перемешивали в течение 15 минут при комнатной температуре в атмосфере азота. Добавляли EDC (1-(3-диметиламинопропил)-3-этилкарбодиимид) (598 мг, 3,1 ммоль) и реакционную смесь перемешивали в течение дополнительных 4 часов. Затем реакционную смесь разбавляли дихлорметаном (5 мл) и промывали водным насыщенным раствором NaHCO₃ (5 мл, 2x) и затем водным насыщенным раствором NaCl (5 мл). Органическую фазу собирали, сушили и фильтровали. Растворители удаляли под вакуумом. Неочищенный продукт повторно суспендировали в EtOH (5 мл) и очищали методом обращенно-фазовой ВЭЖХ (с градиентом 5%-95% ацетонитрил в H₂O: 25-минутный). Чистые фракции объединяли и концентрировали с получением N-(1-((3,5-диметилизоксазол-4-ил)метил)-1H-пиразол-4-ил)пиколинамида (372 мг, 60%) в виде белого твердого вещества. ¹H ЯМР (CDCl₃, 400 МГц): δ 2,21 (с, 3H), 2,44 (с, 3H), 5,05 (с, 2H), 7,49-7,47 (м, 1H), 7,59 (с, 1H), 7,93-7,88 (дт, J=14, 2 Гц, 1H), 8,07 (с, 1H), 8,24-8,21 (д, J=8 Гц, 1H), 8,61-8,56 (м, 1H), 9,83 (ушир.с, 1H). ЖХ/МС; [M+H] рассчитано для C₁₅H₁₅N₅O₂; ожидаемое значение 297,1; экспериментально 298,3. Температура плавления: 135-137°C.

IC₅₀ для указанного соединения при ингибировании рецептора горького вкуса hT2R8 составила 0,57 мкМ.

Пример 4-1a: 1-((3,5-диметилизоксазол-4-ил)метил)-1H-пиразол-4-амина гидрохлорид

Трет-бутил-1-((3,5-диметилизоксазол-4-ил)метил)-1H-пиразол-4-илкарбамат (пример 4-1b) (592 мг, 2 ммоль) перемешивали в растворе 4N HCl в диоксане (20 мл) при температуре окружающей среды в течение 2 часов. Растворитель удаляли при пониженном давлении и остаток переносили в смеси 1/1 этилацетат/гексан (30 мл) и концентрировали (дважды). Твердое вещество растирали в порошок с гексаном и

собирали с помощью фильтрования, получая 1-((3,5-диметилизоксазол-4-ил)метил)-1H-пиразол-4-амина гидрохлорид (500 мг, 99%) в виде белого твердого вещества. ¹H ЯМР (ДМСО-d₆, 400 МГц): δ 2,11 (с, 3H), 2,38 (с, 3H), 5,16 (с, 2H), 7,51 (с, 1H), 8,03 (с, 1H), 10,27 (ушир.с, 3H).

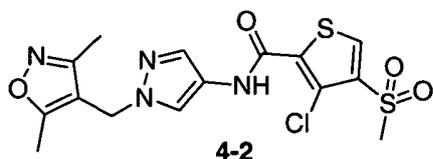
Пример 4-1b: трет-бутил-1-((3,5-диметилизоксазол-4-ил)метил)-1H-пиразол-4-илкарбамат
3,5-Диметил-4-((4-нитро-1H-пиразол-1-ил)метил)изоксазол (пример 4-1c) (14,6 г, 66 ммоль), Вос ангидрид и 10% Pd/C (3,8 г) перемешивали в MeOH (400 мл) при 1 атмосфере H₂ в течение 16 часов при температуре окружающей среды. Смесь фильтровали и раствор удаляли при пониженном давлении. Остаток очищали методом хроматографии на силикагеле (20% этилацетат в гексане) с получением трет-бутил-1-((3,5-диметилизоксазол-4-ил)метил)-1H-пиразол-4-илкарбамата (12,7 г, 66%) в виде светлорозового твердого вещества. ¹H ЯМР (CDCl₃, 400 МГц): δ 1,41 (с, 9H), 2,10 (с, 3H), 2,32 (с, 3H), 4,90 (с, 2H), 6,19 (ушир.с, 1H), 7,19 (с, 1H), 7,50 (с, 1H). MS 293 (MH⁺).

Пример 4-1c: 3,5-диметил-4-((4-нитро-1H-пиразол-1-ил)метил)изоксазол
К 4-нитро-1H-пиразолу (пример 4-1d) (3,8 г, 34 ммоль) в ДМФ (80 мл), охлажденному до 0°C с помощью бани лед/вода, добавляли *t*-BuOK (4,2 г, 38 ммоль). После добавления основания баню со льдом удаляли и смесь перемешивали в течение 30 минут с последующим добавлением 4-(хлорметил)-3,5-диметилизоксазола (5 г, 34 ммоль). Реакционную смесь кипятили с обратным холодильником в течение 16 часов, затем охлаждали до температуры окружающей среды. К реакционной смеси добавляли H₂O и образовавшийся осадок собирали с помощью фильтрования. Осадок промывали дополнительным количеством H₂O, затем сушили в глубоком вакууме с получением 3,5-диметил-4-((4-нитро-1H-пиразол-1-ил)метил)изоксазола (5,8 г, 78%) в виде светложелтого твердого вещества. ¹H ЯМР (CDCl₃, 400 МГц): δ 2,23 (с, 3H), 2,46 (с, 3H), 5,08 (с, 2H), 8,02 (с, 1H), 8,08 (с, 1H).

Пример 4-1d: 4-нитро-1H-пиразол

Пиразол (10 г, 147 ммоль) добавляли порциями к концентрированной серной кислоте (100 мл), поддерживая температуру реакционной смеси в сосуде ниже 50°C с помощью бани с ледяной водой. Затем по каплям добавляли концентрированную азотную кислоту (10 мл), поддерживая температуру реакционной смеси ниже 50°C с помощью бани с ледяной водой. Баню с ледяной водой удаляли и реакционную смесь нагревали до 60°C и перемешивали в течение 4 часов. Реакционную смесь охлаждали с помощью бани с ледяной водой и подщелачивали до ~pH 8 с помощью 18 N водного раствора NaOH (150 мл). Продукт, который осаждался в виде белого твердого вещества, собирали с помощью фильтрования, промывали H₂O и сушили в глубоком вакууме с получением 4-нитро-1H-пиразола (7 г, 42%) в виде белого твердого вещества. ¹³C ЯМР (100 МГц, CDCl₃): δ 126,4, 137,0.

Пример 4-2: 3-хлор-N-(1-((3,5-диметилизоксазол-4-ил)метил)-1H-пиразол-4-ил)-4-(метилсульфонил)тиофен-2-карбоксамид



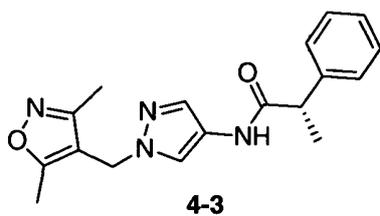
При перемешивании к смеси ((3,5-диметилизоксазол-4-ил)метил)-1H-пиразол-4-амина

гидрохлорида (пример 4-1а) (500 мг, 2 ммоль) в ДХМ (20 мл), охлажденной до 0°C с помощью бани с ледяной водой, добавляли триэтиламин (600 мг, 6 ммоль). Смесь перемешивали, пока все твердое вещество не переходило в раствор (~10 минут). 3-Хлор-4-(метилсульфонил)тиофен-2-карбонила хлорид (543 мг, 2,1 ммоль) в 2 мл CH₃CN

добавляли с помощью шприца к указанному свободному амину при 0°C. Удаляли баню со льдом и смесь перемешивали в течение 2 часов. Реакционную смесь разбавляли дихлорметаном (100 мл) и органическую фазу промывали H₂O (200 мл). Органическую фазу сушили над сульфатом натрия, фильтровали и концентрировали при пониженном давлении. Твердое вещество растирали в порошок с этилацетатом/гексаном (1/5) и получали 3-хлор-N-(1-((3,5-диметилизоксазол-4-ил)метил)-1H-пиразол-4-ил)-4-(метилсульфонил)тиофен-2-карбоксамид (375 мг, 45%) в виде белого твердого вещества. ¹H ЯМР (CDCl₃, 400 МГц): δ 2,20 (с, 3H), 2,43 (с, 4H), 3,22 (с, 3H), 5,05 (с, 2H), 7,57 (с, 1H), 7,94 (с, 1H), 8,41 (с, 1H), 8,59 (ушир.с, 1H). ЖХ/МС; [M+H] 415,5. Температура плавления: 202-204°C.

IC₅₀ для указанного соединения при ингибировании рецептора горького вкуса hT2R8 составила 2,09 мкМ.

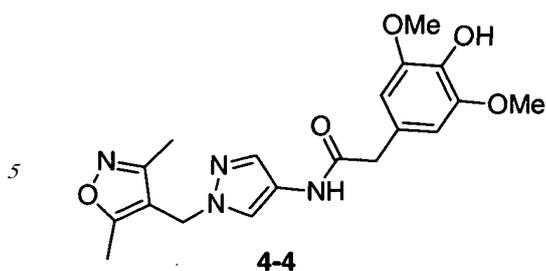
Пример 4-3: (S)-N-(1-((3,5-диметилизоксазол-4-ил)метил)-1H-пиразол-4-ил)-2-фенилпропанамида



1-((3,5-Диметилизоксазол-4-ил)метил)-1H-пиразол-4-амина гидрохлорид (пример 4-1а) (200 мг, 1 ммоль), (S)-2-фенил пропионовую кислоту (156 мг, 1 ммоль) и PyVor (650 мг, 1,3 ммоль) добавляли к ДМФ (4 мл) с последующим добавлением триэтиламина (0,3 мл, 2,1 ммоль). Реакционную смесь перемешивали в течение 4 часов при комнатной температуре в атмосфере азота, затем разбавляли этилацетатом (20 мл), промывали водным насыщенным раствором NaHCO₃ (2×15 мл), а затем водным насыщенным раствором NaCl (15 мл). Органическую фазу сушили, фильтровали и концентрировали на роторном испарителе. Неочищенный продукт повторно суспендировали в метаноле (3 мл) и очищали методом обращенно-фазовой ВЭЖХ (с градиентом 5%-95% ацетонитрил в H₂O: 25-минутный). Фракции, содержащие чистый продукт, концентрировали с получением (S)-N-(1-((3,5-диметилизоксазол-4-ил)метил)-1H-пиразол-4-ил)-2-фенилпропанамида (200 мг, 60%) в виде белого твердого вещества. ¹H ЯМР (400 МГц, DMSO-d₆) δ 1,36 (д, J=7,2, Гц, 3H), 2,09 (с, 3H), 2,36 (с, 3H), 3,71-3,66 (м, 1H), 5,05 (с, 2H), 7,33-7,17 (м, 5H), 7,37 (с, 1H), 7,90 (с, 1H), 10,05 (с, 1H). MS 325 (M+H). Температура плавления 108°C - 110°C.

IC₅₀ для указанного соединения при ингибировании рецептора горького вкуса hT2R8 составила 0,41 мкМ.

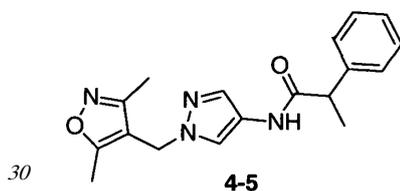
Пример 4-4: N-(1-((3,5-диметилизоксазол-4-ил)метил)-1H-пиразол-4-ил)-2-(4-гидрокси-3,5-диметоксифенил)ацетамид



10 1-((3,5-диметилизоксазол-4-ил)метил)-1Н-пиразол-4-амина гидрохлорид (пример 4-1а) (376 мг, 1,7 ммоль), 2-(4-гидрокси-3,5-диметоксифенил)уксусную кислоту (350 мг, 1,7 ммоль), Рувор (1 г, 2 ммоль) и триэтиламин (605 мг, 6 ммоль) перемешивали вместе в ДМФ (10 мл) при комнатной температуре в течение 2 часов. Реакционную смесь разбавляли водной 1N HCl (100 мл) и экстрагировали ДХМ (3х, 75 мл). Объединенные органические экстракты сушили над сульфатом натрия, фильтровали и концентрировали на роторном испарителе. Остаток очищали методом хроматографии на силикагеле (30% этилацетат в гексане) с получением N-(1-((3,5-диметилизоксазол-4-ил)метил)-1Н-пиразол-4-ил)-2-(4-гидрокси-3,5-диметоксифенил)ацетиамида (189 мг, 29%) в виде белого твердого вещества. ¹H ЯМР (CDCl₃, 400 МГц) δ 2,10 (с, 3H), 2,36 (с, 3H), 3,40 (с, 2H), 3,70 (с, 6H), 5,07 (с, 2H), 6,53 (с, 2H), 7,39 (с, 1H), 7,92 (с, 1H), 8,18 (с, 1H), 10,03 (с, 1H). ЖХ/МС; [M+H] рассчитано для C₁₉H₂₂N₄O₅; ожидаемое значение 387,16; экспериментально 387,6. Температура плавления: 187-188°C.

IC₅₀ для указанного соединения при ингибировании рецептора горького вкуса hT2R8 составила 0,46 мкМ.

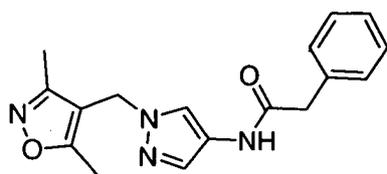
25 **Пример 4-5: N-(1-((3,5-диметилизоксазол-4-ил)метил)-1Н-пиразол-4-ил)-2-фенилпропанамида**



35 1-((3,5-Диметилизоксазол-4-ил)метил)-1Н-пиразол-4-амина гидрохлорид (пример 4-1а) (300 мг, 1,3 ммоль), 2-фенилпропановую кислоту (225 мг, 1,5 ммоль), триэтиламин (300 мг, 3 ммоль), ДМАП (4-диметиламинопиридин) (61 мг, 0,5 ммоль) и EDC (386 мг, 2 ммоль) перемешивали вместе в ДХМ (10 мл) при комнатной температуре в течение 4 часов. Реакционную смесь разбавляли водным раствором 1N HCl (100 мл) и экстрагировали ДХМ (3х, 75 мл). Объединенные органические экстракты сушили над сульфатом натрия, фильтровали и концентрировали на роторном испарителе. Остаток очищали методом хроматографии на силикагеле (30% этилацетат в гексане) с получением N-(1-((3,5-диметилизоксазол-4-ил)метил)-1Н-пиразол-4-ил)-2-фенилпропанамида (272 мг, 81%) в виде белого твердого вещества. ¹H ЯМР (CDCl₃, 400 МГц) δ 1,36 (д, 3H, J=7,2 Гц), 2,10 (с, 3H), 2,37 (с, 3H), 3,70 (м, 1H, J=6,8 Гц), 5,06 (с, 2H), 7,20 (т, 1H, J=8,4 Гц), 7,31-7,28 (м, 4H), 7,38 (с, 1H), 7,91 (с, 1H), 10,10 (с, 1H). ЖХ/МС; [M+H] рассчитано для C₁₈H₂₀N₄O₂; ожидаемое значение 325,16; экспериментально 325,5. Температура плавления: 129-130°C.

45 IC₅₀ для указанного соединения при ингибировании рецептора горького вкуса hT2R8 составила 0,32 мкМ.

Пример 4-6: N-(1-((3,5-диметилизоксазол-4-ил)метил)-1Н-пиразол-4-ил)-2-фенилацетиамид

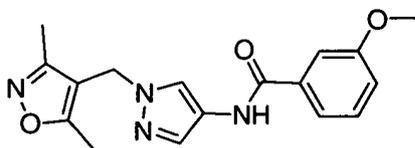


4-6

1-((3,5-Диметилизоксазол-4-ил)метил)-1Н-пиразол-4-амина гидрохлорид (пример 4-1а) (230 мг, 1 ммоль) и триэтиламин (300 мг, 3 ммоль) перемешивали в ДХМ (10 мл), охлажденном до 0°C с помощью бани лед/вода. При перемешивании к реакционной смеси по каплям добавляли 2-фенилацетила хлорид (184 мг, 1,3 ммоль). После завершения добавления баню со льдом удаляли и реакционную смесь перемешивали в течение 1 часа. Смесь разбавляли ДХМ (50 мл), промывали 1N водным HCl (100 мл), а затем 1N водным NaOH (100 мл) и потом H₂O (100 мл). Объединенные органические экстракты сушили над сульфатом натрия, фильтровали и удаляли растворитель на роторном испарителе. Образовавшийся остаток очищали методом хроматографии (50% этилацетат в гексане) с получением 210 мг твердого продукта, который растирали в порошок в этилацетате/гексане (1/9) с получением N-(1-((3,5-диметилизоксазол-4-ил)метил)-1Н-пиразол-4-ил)-2-фенилацетамида (188 мг, 68%) в виде белого твердого вещества. ¹H ЯМР (CDCl₃, 400 МГц): δ 2,15 (с, 3H), 2,38 (с, 3H), 3,69 (с, 2H), 4,97 (с, 2H), 7,15 (ушир.с, 1H), 7,40-7,27 (м, 6H), 7,84 (с, 1H). ЖХ/МС; [M+H] рассчитано для C₁₇H₁₈N₄O₂; ожидаемое значение 311,14; экспериментально 311,40. Температура плавления: 106-108°C.

IC₅₀ для указанного соединения при ингибировании рецептора горького вкуса hT2R8 составила 0,53 мкМ.

Пример 4-7: N-(1-((3,5-диметилизоксазол-4-ил)метил)-1Н-пиразол-4-ил)-3-метоксибензамид



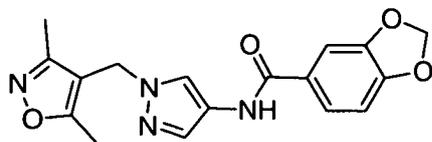
4-7

1-((3,5-Диметилизоксазол-4-ил)метил)-1Н-пиразол-4-амина гидрохлорид (пример 4-1а) (300 мг, 1,3 ммоль), 3-метоксибензойную кислоту (172 мг, 1,3 ммоль), EDC (386 мг, 2 ммоль) и триэтиламин (303 мг, 3 ммоль) перемешивали в ДХМ (5 мл) при температуре окружающей среды в течение 6 часов. Реакционную смесь разбавляли ДХМ (50 мл) и органическую фазу промывали водной 0,1N HCl (150 мл), а затем водным 1N NaOH (150 мл). Органическую фазу сушили над сульфатом натрия, фильтровали и концентрировали на роторном испарителе. Неочищенный продукт очищали методом хроматографии на силикагеле (40% этилацетат в гексане) с получением 225 мг грязно-белого твердого вещества. Твердое вещество растирали в порошок с этилацетатом/гексаном (1/9) и белое твердое вещество собирали с помощью фильтрования. Чистый продукт растворяли в абсолютном этаноле и концентрировали на роторном испарителе (4x, 25 мл) с получением N-(1-((3,5-диметилизоксазол-4-ил)метил)-1Н-пиразол-4-ил)-3-метоксибензамида (185 мг, 43%) в виде белого твердого вещества. ¹H ЯМР (CDCl₃, 400 МГц): δ 2,20 (с, 3H), 2,42 (с, 3H), 3,85 (с, 3H), 5,03 (с, 2H), 7,09-7,06 (м, 1H), 7,37-7,35 (м, 2H), 7,41 (м, 1H), 7,51 (с, 1H), 7,93 (ушир.с, 1H), 8,03 (с, 1H). ЖХ/МС; [M+H] рассчитано для C₁₇H₁₈N₄O₃; ожидаемое значение 327,14; экспериментально 327,30. Температура

плавления: 127-129°C.

IC₅₀ для указанного соединения при ингибировании рецептора горького вкуса hT2R8 составила 0,39 мкМ.

Пример 4-8: N-(1-((3,5-диметилизоксазол-4-ил)метил)-1H-пиразол-4-ил)бензо[d][1,3]диоксол-5-карбоксамид

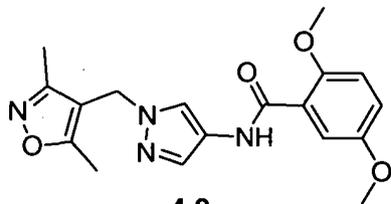


4-8

1-((3,5-Диметилизоксазол-4-ил)метил)-1H-пиразол-4-амина гидрохлорид (пример 1a) (8 мг, 35 мкмоль) и бензо[d][1,3]диоксол-5-карбоновую кислоту (7 мг, 42 мкмоль) каждый растворяли в 200 мкл диметилформамида. Смолу на основе Si-карбодиимида (70 мг, 70 мкмоль) помещали в 1,2 мл 96-луночный планшет Greiner, а затем добавляли амин и кислоту. Гидроксibenзотриазол (6 мг, 42 мкмоль) растворяли в 100 мкл диметилформамида и добавляли в реакционную лунку. Реакционную смесь встряхивали в течение ночи при комнатной температуре. Для удаления избытка карбоновой кислоты и гидроксibenзотриазола в реакционную смесь добавляли PS-трисаминовую смолу (35 мг, 70 мкмоль) и встряхивали в течение ночи при комнатной температуре. В реакционную лунку добавляли 200 мкл ацетонитрила и встряхивали в течение 1 минуты. Верхний прозрачный раствор переносили в новый планшет. Процесс экстракции повторяли более двух раз. Раствор испаряли под вакуумом с получением целевого продукта. Выход 6%. МС М+Н рассчитано 341,1, экспериментально 341,2.

IC₅₀ для указанного соединения при ингибировании рецептора горького вкуса hT2R8 составила 0,2 мкМ.

Пример 4-9: N-(1-((3,5-диметилизоксазол-4-ил)метил)-1H-пиразол-4-ил)-2,5-диметоксибензамид

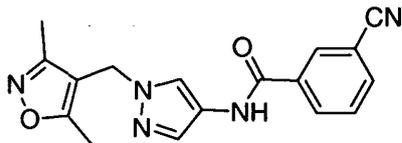


4-9

Получали как в примере 4-8 из 2,5-диметоксибензойной кислоты и 1-((3,5-диметилизоксазол-4-ил)метил)-1H-пиразол-4-амина гидрохлорида (пример 4-1a). Выход 13%. МС М+Н рассчитано 357,5, экспериментально 357,3.

IC₅₀ для указанного соединения при ингибировании рецептора горького вкуса hT2R8 составила 0,17 мкМ.

Пример 4-10: 3-циано-N-(1-((3,5-диметилизоксазол-4-ил)метил)-1H-пиразол-4-ил)бензамид

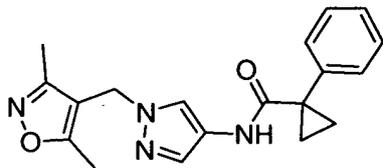


4-10

Получали как в примере 4-8 из 3-цианобензойной кислоты и 1-((3,5-диметилизоксазол-4-ил)метил)-1H-пиразол-4-амина гидрохлорида (пример 4-1a). Выход 15%. МС М+Н рассчитано 322,6, экспериментально 322,3.

IC₅₀ для указанного соединения при ингибировании рецептора горького вкуса hT2R8 составила 0,2 мкМ.

Пример 4-11: N-(1-((3,5-диметилизоксазол-4-ил)метил)-1Н-пиразол-4-ил)-1-фенилциклопропанкарбоксамид

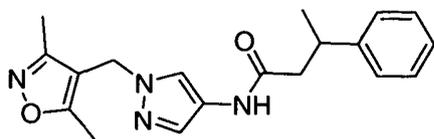


4-11

Получали как в примере 4-8 из 1-фенилциклопропанкарбоновой кислоты и 1-((3,5-диметилизоксазол-4-ил)метил)-1Н-пиразол-4-амин гидрохлорида (пример 4-1а). Выход 6%. МС М+Н рассчитано 337,6, экспериментально 337,5.

IC₅₀ для указанного соединения при ингибировании рецептора горького вкуса hT2R8 составила 0,25 мкМ.

Пример 4-12: N-(1-((3,5-диметилизоксазол-4-ил)метил)-1Н-пиразол-4-ил)-3-фенилбутанамид

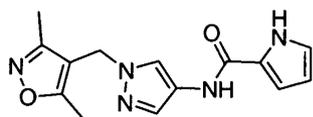


4-12

Получали как в примере 4-8 из 3-фенилбутановой кислоты и 1-((3,5-диметилизоксазол-4-ил)метил)-1Н-пиразол-4-амин гидрохлорида (пример 4-1а). Выход 6%. МС М+Н рассчитано 339,6, экспериментально 339,5.

IC₅₀ для указанного соединения при ингибировании рецептора горького вкуса hT2R8 составила 0,28 мкМ.

Пример 4-13: N-(1-((3,5-диметилизоксазол-4-ил)метил)-1Н-пиразол-4-ил)-1Н-пиррол-2-карбоксамид

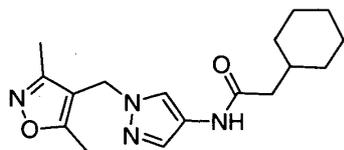


4-13

Получали как в примере 4-8 из 1Н-пиррол-2-карбоновой кислоты и 1-((3,5-диметилизоксазол-4-ил)метил)-1Н-пиразол-4-амин гидрохлорида (пример 4-1а). Выход 18%. МС М+Н рассчитано 286,6, экспериментально 286,3.

IC₅₀ для указанного соединения при ингибировании рецептора горького вкуса hT2R8 составила 0,57 мкМ.

Пример 4-14: 2-циклогексил-N-(1-((3,5-диметилизоксазол-4-ил)метил)-1Н-пиразол-4-ил)ацетамид



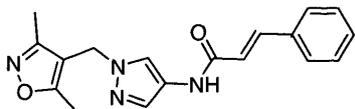
4-14

Получали как в примере 4-8 из 2-циклогексилуксусной кислоты и 1-((3,5-диметилизоксазол-4-ил)метил)-1Н-пиразол-4-амин гидрохлорида (пример 4-1а). Выход

17%. МС М+Н рассчитано 317,6, экспериментально 317,4.

IC₅₀ для указанного соединения при ингибировании рецептора горького вкуса hT2R8 составила 0,73 мкМ.

Пример 4-15: N-(1-((3,5-диметилизоксазол-4-ил)метил)-1H-пиразол-4-ил)циннамамид

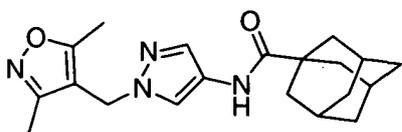


4-15

Получали как в примере 4-8 из коричной кислоты и 1-((3,5-диметилизоксазол-4-ил)метил)-1H-пиразол-4-амина гидрохлорида (пример 4-1a). Выход 4%. МС М+Н рассчитано 322,6, экспериментально 322,4.

IC₅₀ для указанного соединения при ингибировании рецептора горького вкуса hT2R8 составила 0,7 мкМ.

Пример 4-16: N-(1-((3,5-диметилизоксазол-4-ил)метил)-1H-пиразол-4-ил)адамантан



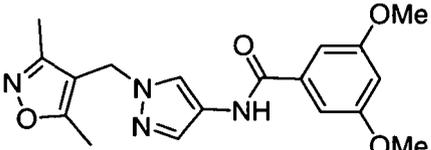
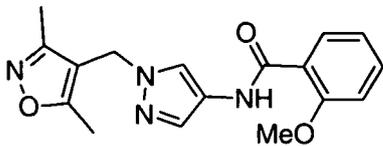
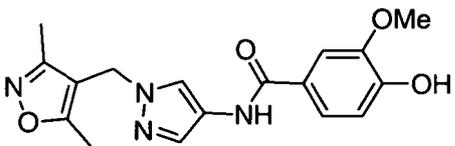
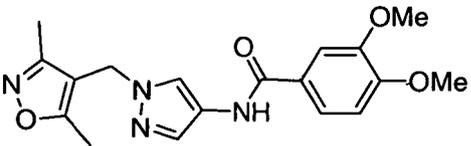
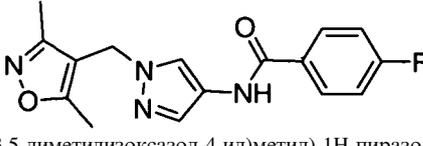
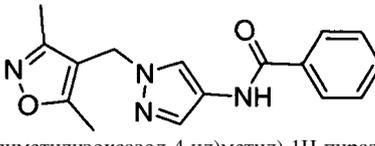
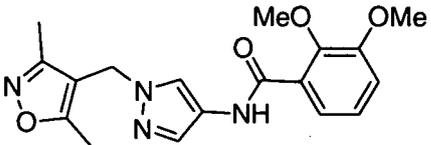
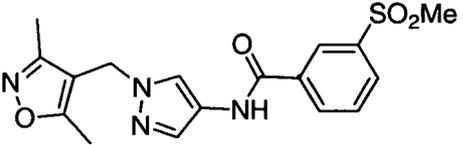
4-16

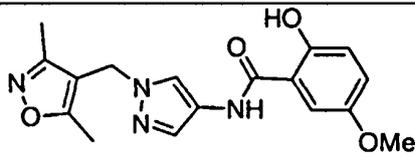
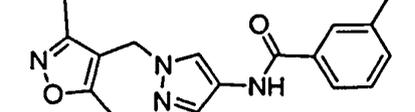
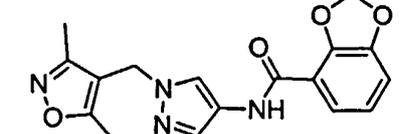
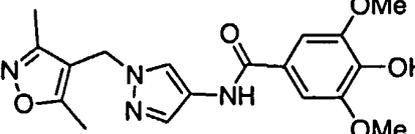
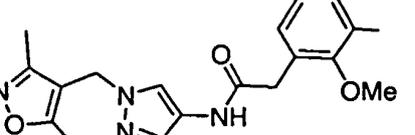
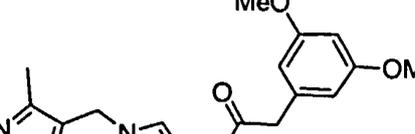
1-((3,5-Диметилизоксазол-4-ил)метил)-1H-пиразол-4-амина гидрохлорид (300 мг, 1,56 ммоль), адамантан-1-карбоновую кислоту (281 мг, 1,56 ммоль), PyВор (972 мг, 1,87 ммоль) и триэтиламин (438 мл, 3,12 ммоль) смешивали в ДМФ (5 мл). Реакционную смесь в атмосфере азота перемешивали при комнатной температуре в течение 4 часов. Реакционную смесь разбавляли этилацетатом (4 мл) и промывали насыщенным раствором NaHCO₃ (2×, 3 мл) и затем насыщенным раствором NaCl (3 мл). Органическую фазу экстрагировали, сушили и фильтровали. Растворители удаляли под вакуумом. Неочищенный продукт повторно суспендировали в метаноле (4 мл) и очищали методом ВЭЖХ. Чистый продукт повторно растворяли в этаноле и концентрировали под вакуумом (3×3 мл) с получением N-(1-((3,5-диметилизоксазол-4-ил)метил)-1H-пиразол-4-ил)адамантана в виде белого твердого вещества при 60% выходе. ¹H ЯМР (400 МГц, CDCl₃): δ 1,79-1,70 (м, 6H), 1,93-1,92 (м, 6H), 2,08 (ушир.с, 3H), 2,18 (с, 3H), 2,41 (с, 3H), 4,98 (с, 2H), 7,37 (с, 1H), 7,38 (с, 1H), 7,92 (с, 1H). MS 355 (M+N). Температура плавления 167-169°C.

IC₅₀ для указанного соединения при ингибировании рецептора горького вкуса hT2R8 составила 0,88 мкМ.

Дополнительные соединения были синтезированы согласно аналогичным методикам, описанным в примерах 4-1 - 4-16, и экспериментально исследованы. Как было обнаружено, указанные дополнительные соединения имеют сравнительно высокий уровень эффективности в качестве ингибиторов рецептора горького вкуса hT2R8. Результаты этого исследования приведены ниже в таблице А.

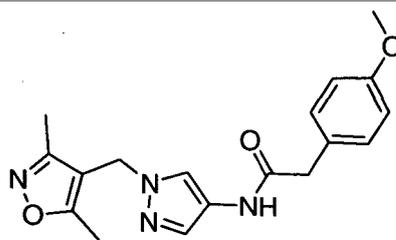
Таблица А		
№ соединения	Соединение	hT2R8 IC ₅₀ (мкМ)
4-17	<p>N-(1-((3,5-диметилизоксазол-4-ил)метил)-1H-пиразол-4-ил)-4-метоксибензамид</p>	0,26

5	4-18	 <p>N-(1-((3,5-диметилизоксазол-4-ил)метил)-1H-пиразол-4-ил)-3,5-диметоксибензамид</p>	0,28
10	4-19	 <p>N-(1-((3,5-диметилизоксазол-4-ил)метил)-1H-пиразол-4-ил)-2-метоксибензамид</p>	0,39
15	4-20	 <p>N-(1-((3,5-диметилизоксазол-4-ил)метил)-1H-пиразол-4-ил)-4-гидрокси-3-метоксибензамид</p>	0,48
20	4-21	 <p>N-(1-((3,5-диметилизоксазол-4-ил)метил)-1H-пиразол-4-ил)-3,4-диметоксибензамид</p>	0,56
25	4-23	 <p>N-(1-((3,5-диметилизоксазол-4-ил)метил)-1H-пиразол-4-ил)-4-фторбензамид</p>	1,56
30	4-24	 <p>N-(1-((3,5-диметилизоксазол-4-ил)метил)-1H-пиразол-4-ил)бензамид</p>	2,62
35	4-25	 <p>N-(1-((3,5-диметилизоксазол-4-ил)метил)-1H-пиразол-4-ил)-2,3-диметоксибензамид</p>	0,61
40	4-26	 <p>N-(1-((3,5-диметилизоксазол-4-ил)метил)-1H-пиразол-4-ил)-3-(метилсульфонил)бензамид</p>	0,72

5 10	<p>4-27</p>  <p>N-(1-((3,5- диметилизоксазол-4- ил)метил)-1H-пиразол-4-ил)- 2-гидрокси-5- метоксибензамид</p>	0,98
15	<p>4-28</p>  <p>N-(1-((3,5- диметилизоксазол-4- ил)метил)-1H-пиразол-4-ил)- 3-метилбензамид</p>	0,57
20	<p>4-29</p>  <p>N-(1-((3,5-диметилизоксазол-4- ил)метил)-1H-пиразол-4-ил)- бензо[1,3]диоксол-4-карбоксамид</p>	0,30
25 30	<p>4-30</p>  <p>N-(1-((3,5- диметилизоксазол-4- ил)метил)-1H-пиразол-4-ил)- 2-метоксибензамид</p>	0,39
35	<p>4-31</p>  <p>2-(2,3-диметоксифенил)-N- (1-((3,5-диметилизоксазол- 4-ил)метил)-1H-пиразол-4- ил)ацетамид</p>	0,80
40 45	<p>4-32</p>  <p>2-(3,5-диметоксифенил)-N- (1-((3,5-диметилизоксазол- 4-ил)метил)-1H-пиразол-4- ил)ацетамид</p>	0,96

5

4-33

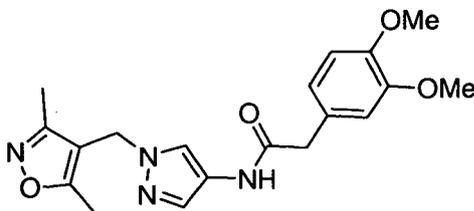


N-(1-((3,5-диметилизоксазол-4-ил)метил)-1H-пиразол-4-ил)-2-(4-метоксифенил)ацетамид

0,99

10

4-34

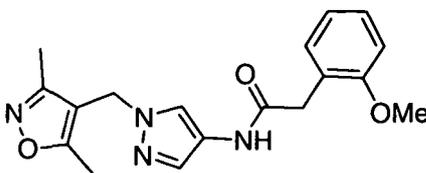


N-(1-((3,5-диметилизоксазол-4-ил)метил)-1H-пиразол-4-ил)-2-метоксибензамид

1,11

15

4-35

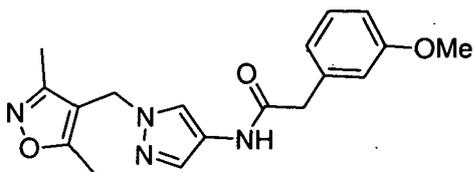


N-(1-((3,5-диметилизоксазол-4-ил)метил)-1H-пиразол-4-ил)-2-(2-метоксифенил)ацетамид

1,16

20

4-36

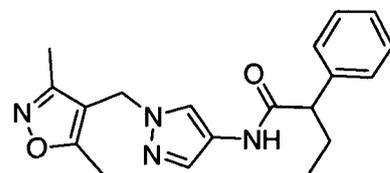


N-(1-((3,5-диметилизоксазол-4-ил)метил)-1H-пиразол-4-ил)-2-метоксибензамид

1,85

25

4-37



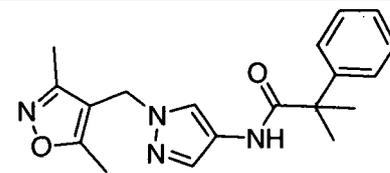
N-(1-((3,5-диметилизоксазол-4-ил)метил)-1H-пиразол-4-ил)-2-фенилбутанамид

0,50

30

35

4-38

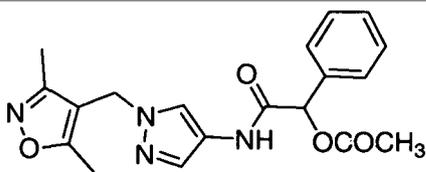


N-(1-((3,5-диметилизоксазол-4-ил)метил)-1H-пиразол-4-ил)-2-метоксибензамид

0,53

40

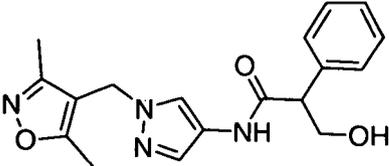
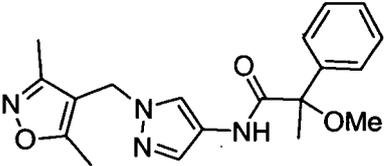
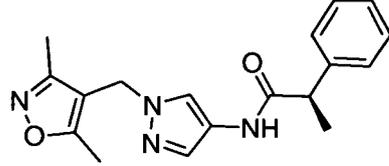
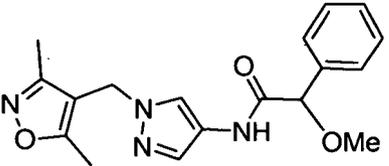
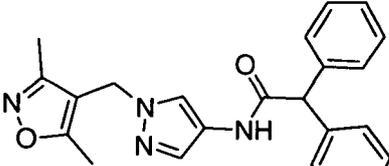
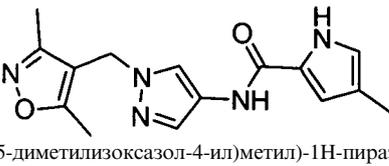
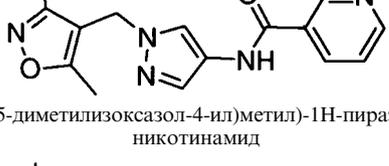
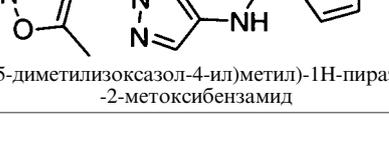
4-39

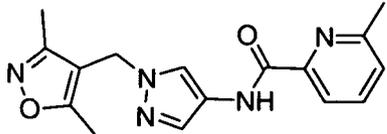
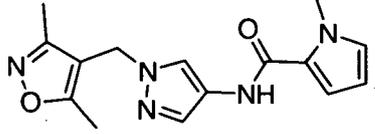
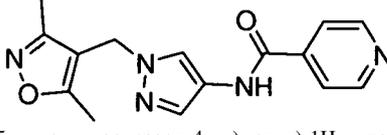
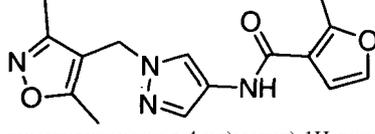
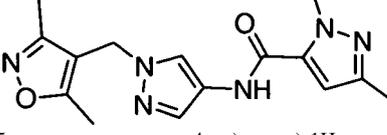
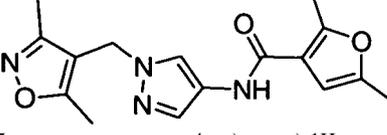
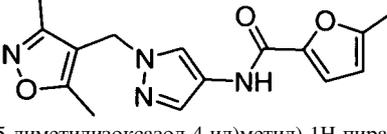
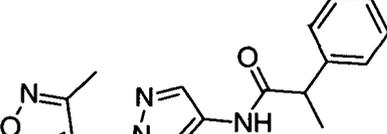


2-(1-((3,5-диметилизоксазол-4-ил)метил)-1H-пиразол-4-иламино)-2-оксо-1-фенилэтилацетат

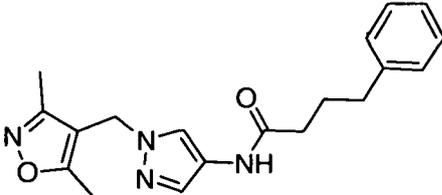
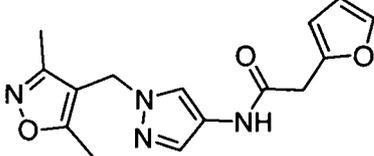
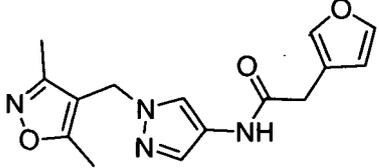
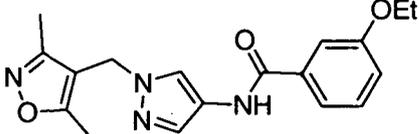
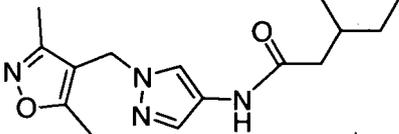
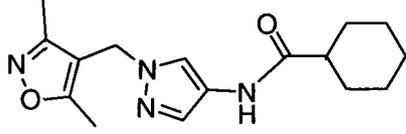
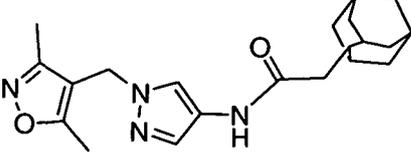
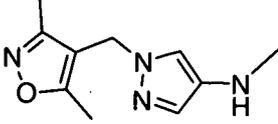
0,83

45

5	4-40		0,96
10	4-41		2,10
15	4-42		3,72
20	4-43		3,43
25	4-44		5,19
30	4-45		0,72
35	4-46		1,05
40	4-47		1,35

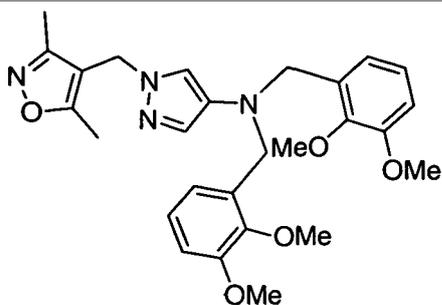
<p>5</p> <p>4-48</p>	 <p>N-(1-((3,5-диметилизоксазол-4-ил)метил)-1H-пиразол-4-ил)-6-метилпиколинамид</p>	<p>1,95</p>
<p>10</p> <p>4-49</p>	 <p>N-(1-((3,5-диметилизоксазол-4-ил)метил)-1H-пиразол-4-ил)-1-метил-1H-пиррол-2-карбоксамид</p>	<p>3,40</p>
<p>15</p> <p>4-50</p>	 <p>N-(1-((3,5-диметилизоксазол-4-ил)метил)-1H-пиразол-4-ил)изоникотинамид</p>	<p>4,59</p>
<p>20</p> <p>4-51</p>	 <p>N-(1-((3,5-диметилизоксазол-4-ил)метил)-1H-пиразол-4-ил)-2-метилфуран-3-карбоксамид</p>	<p>7,87</p>
<p>25</p> <p>4-52</p>	 <p>N-(1-((3,5-диметилизоксазол-4-ил)метил)-1H-пиразол-4-ил)-1,3-диметил-1H-пиразол-5-карбоксамид</p>	<p>18,05</p>
<p>30</p> <p>4-53</p>	 <p>N-(1-((3,5-диметилизоксазол-4-ил)метил)-1H-пиразол-4-ил)-2,5-диметилфуран-3-карбоксамид</p>	<p>3,03</p>
<p>35</p> <p>4-54</p>	 <p>N-(1-((3,5-диметилизоксазол-4-ил)метил)-1H-пиразол-4-ил)-5-метилфуран-2-карбоксамид</p>	<p>3,19</p>
<p>40</p> <p>4-55</p>	 <p>4-5 N-(1-((3,5-диметилизоксазол-4-ил)метил)-1H-пиразол-4-ил)-3-фенилпропанамид</p>	<p>0,49</p>

45

5	4-56		0,83
10	4-57		4,16
15	4-58		8,66
20	4-59		0,22
25	4-60		1,94
30			
35	4-61		2,20
40	4-62		3,77
45	4-63		8,76

5

4-64

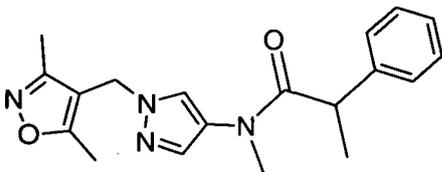


12,60

10

N,N-бис(2,3-диметоксибензил)-1-((3,5-диметилизоксазол-4-ил)метил)-1H-пиразол-4-амин

4-65



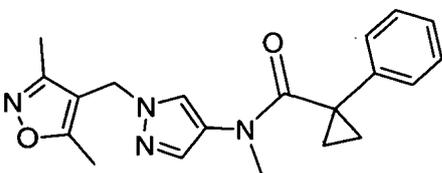
2,81

15

N-(1-((3,5-диметилизоксазол-4-ил)метил)-1H-пиразол-4-ил)-N-метил-2-фенилпропанамид

20

4-66

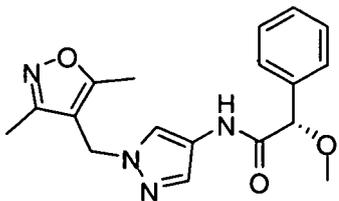


8,23

N-(1-((3,5-диметилизоксазол-4-ил)метил)-1H-пиразол-4-ил)-N-метил-1-фенилциклопропанкарбоксамид

25

4-67

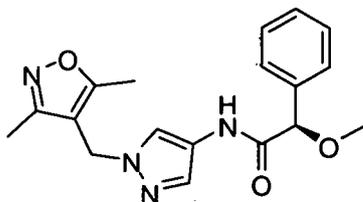


8,6

(S)-N-(1-((3,5-диметилизоксазол-4-ил)метил)-1H-пиразол-4-ил)-2-метокси-2-фенилацетамид

30

4-68

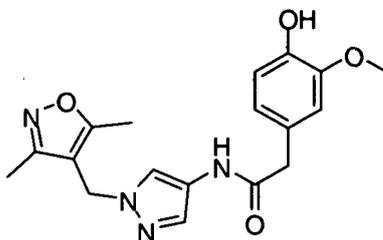


5,0

(R)-N-(1-((3,5-диметилизоксазол-4-ил)метил)-1H-пиразол-4-ил)-2-метокси-2-фенилацетамид

35

4-69



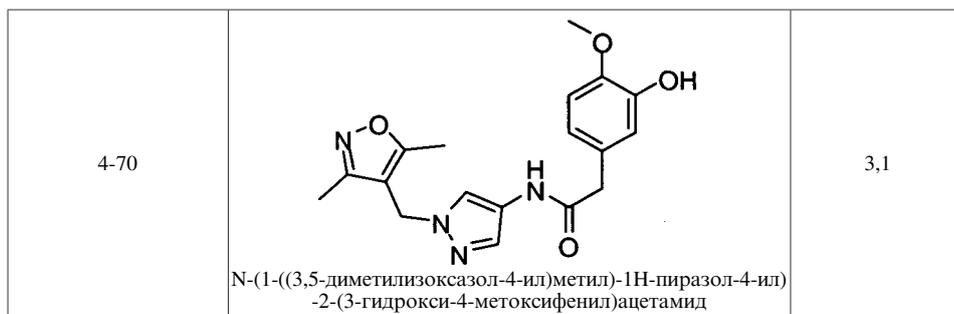
4,7

N-(1-((3,5-диметилизоксазол-4-ил)метил)-1H-пиразол-4-ил)-2-(4-гидрокси-3-метоксифенил)ацетамид

40

45

5



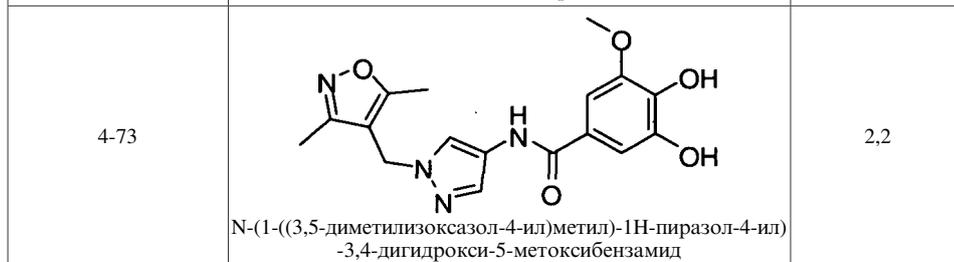
10



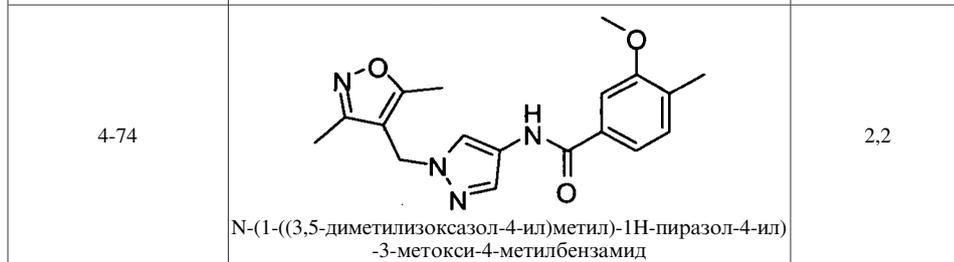
15



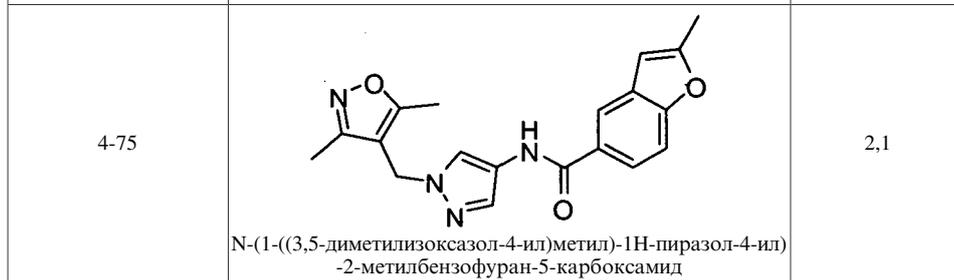
20



25



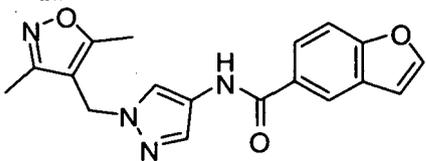
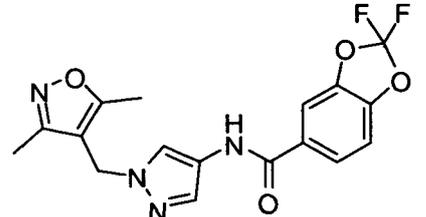
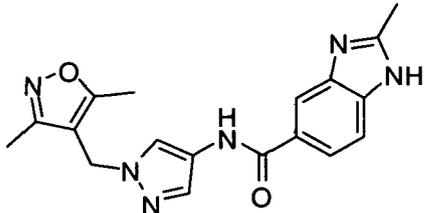
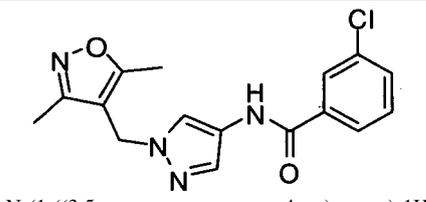
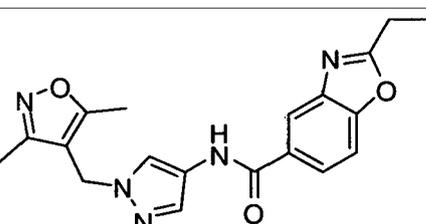
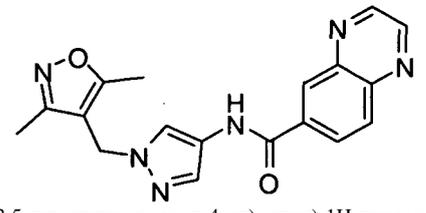
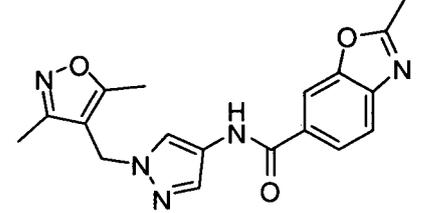
30

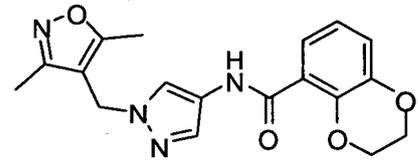
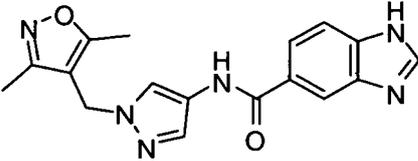
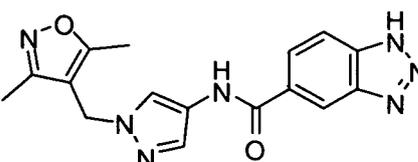
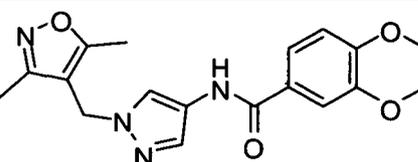
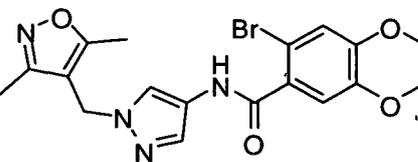
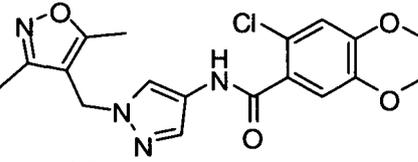
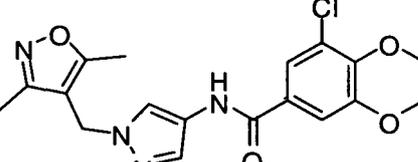
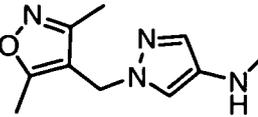


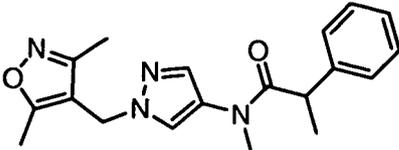
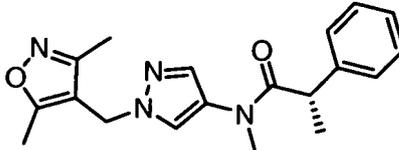
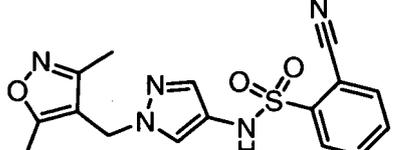
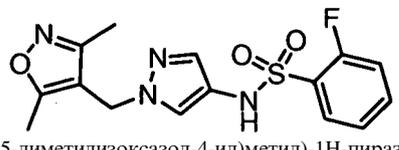
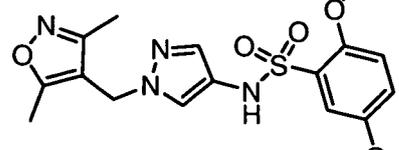
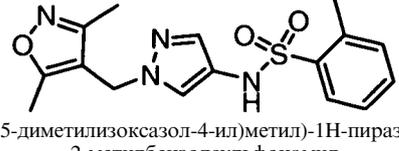
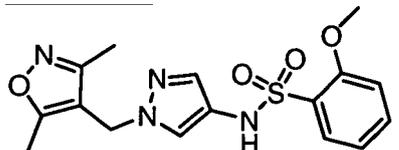
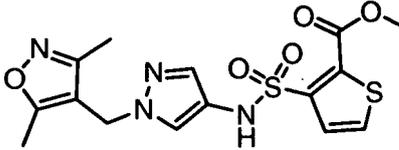
40

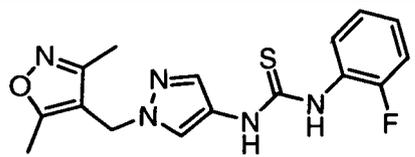
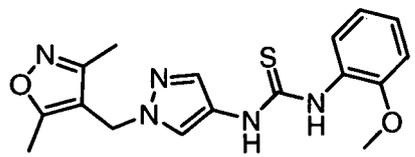
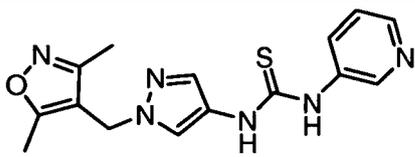
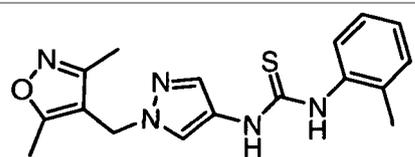
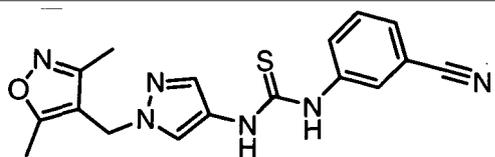
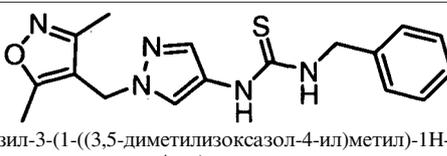
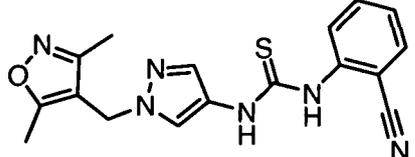
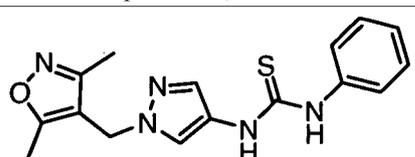


45

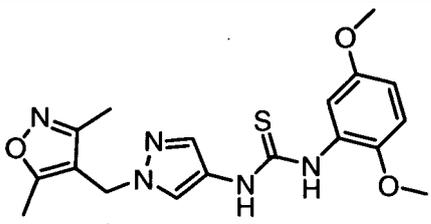
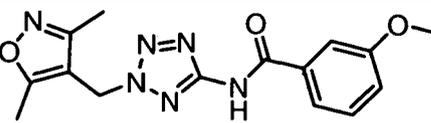
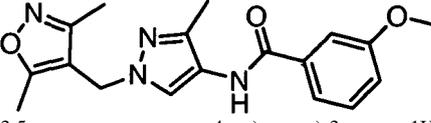
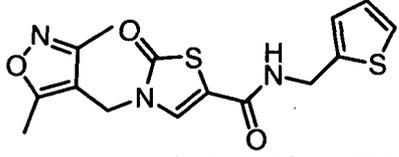
5	4-77		1,4
10	4-78		1,3
15	4-79		1,0
20	4-80		0,9
25	4-81		0,8
30	4-82		0,8
35	4-83		0,7

5	4-85		0,6
10	4-86		0,6
15	4-87		0,6
20	4-88		0,4
25	4-89		0,3
30	4-90		0,1
35	4-91		0,1
40	4-96		8,764

5	4-97		2,126
10	4-98		2,811
15	4-99		1,358
20	4-100		8,510
25	4-101		1,631
30	4-102		2,153
35	4-103		3,801
40	4-104		1,252
45			

5	4-105		1,629
10	4-106		2,607
15	4-107		2,999
20	4-108		3,013
25	4-109		0,783
30	4-110		1,097
35	4-111		2,347
40	4-112		2,492

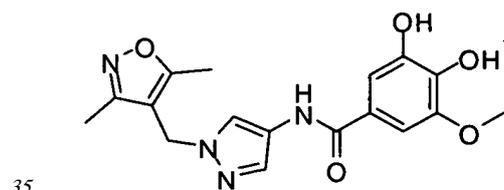
45

5	4-113		5,240
10	4-114		1,866
15	4-115		9,248
20	4-116		2,279

ПРИМЕРЫ 4-67 - 4-91:

25 Получали как в примере 4-73 из 1-((3,5-диметилизоксазол-4-ил)метил)-1H-пиразол-4-амина гидрохлорида (пример 4-1а) и соответствующих функционализированных карбоновых кислот. Определение характеристик было проведено методом ЖХ/МС, при этом были найдены требуемые массы.

30 **Пример 4-73: N-(1-((3,5-диметилизоксазол-4-ил)метил)-1H-пиразол-4-ил)-3,4-дигидрокси-5-метоксибензамид**

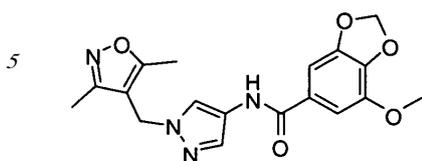
**4-73**

1-((3,5-Диметилизоксазол-4-ил)метил)-1H-пиразол-4-амина гидрохлорид (пример 4-1а) (228 мг, 1 ммоль), 3,4-дигидрокси-5-метоксибензойную кислоту (184 мг, 1 ммоль), НОВt (135 мг, 1 ммоль) и EDC (191 мг, 1 ммоль) растворяли в 2 мл ДМФ в сосуде для применения в микроволновой системе, после чего добавляли триэтиламин (101 мг, 1 ммоль). Реакционную смесь помещали в микроволновый реактор при 165°C на 5 минут. Неочищенный продукт очищали сразу же, применяя ВЭЖХ Varian (с градиентом 10%-95% ацетонитрил в H₂O: 25-минутный). Чистые фракции объединяли и концентрировали с получением N-(1-((3,5-диметилизоксазол-4-ил)метил)-1H-пиразол-4-ил)-3,4-дигидрокси-5-метоксибензамида. (280 мг, 70%). ЖХ/МС; [M+H] рассчитано для C₁₇H₁₈N₄O₅; ожидаемое значение 359,1; экспериментально 359,1.

IC₅₀ для указанного соединения при ингибировании рецептора горького вкуса hT2R8

составила 2,2 мкМ.

Пример 4-92: N-(1-((3,5-диметилизоксазол-4-ил)метил)-1H-пиразол-4-ил)-7-метоксибензо[d][1,3]диоксол-5-карбоксамид



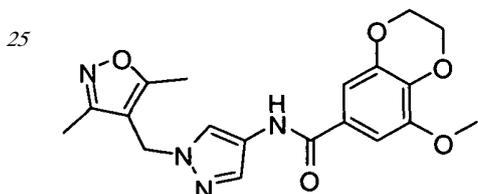
4-92

10 N-(1-((3,5-Диметилизоксазол-4-ил)метил)-1H-пиразол-4-ил)-3,4-дигидрокси-5-метоксибензамид (пример 73) (50 мг, 0,14 ммоль) и карбонат цезия (113 мг, 2,5 ммоль) растворяли в 1 мл ацетона, а затем добавляли дибромметан (239 мг, 1,4 ммоль). Реакционную смесь помещали в микроволновый реактор при 120°C на 20 минут. Полученный прозрачный раствор удаляли и испаряли под вакуумом. Неочищенный

15 продукт растворяли в 1 мл этанола и очищали методом ВЭЖХ Varian (с градиентом 10%-95% ацетонитрил в H₂O: 25-минутный). Чистые фракции объединяли и концентрировали с получением N-(1-((3,5-диметилизоксазол-4-ил)метил)-1H-пиразол-4-ил)-2-(7-метоксибензо[d][1,3]диоксол-5-ил)ацетамида. (12 мг, 23%). ЖХ/МС; [M+H] рассчитано для C₁₈H₁₈N₄O₅; ожидаемое значение 371,1; экспериментально 371,1.

20 IC₅₀ для указанного соединения при ингибировании рецептора горького вкуса hT2R8 составила 0,7 мкМ.

Пример 4-93: N-(1-((3,5-диметилизоксазол-4-ил)метил)-1H-пиразол-4-ил)-8-метокси-2,3-дигидробензо[b][1,4]диоксин-6-карбоксамид

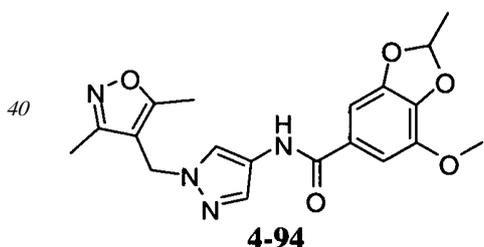


4-93

30 Получали как в примере 4-92 из N-(1-((3,5-диметилизоксазол-4-ил)метил)-1H-пиразол-4-ил)-3,4-дигидрокси-5-метоксибензамид (пример 4-73), карбоната цезия и дибромметана. Выход 20%. МС M+H рассчитано 385,1, экспериментально 385,1.

35 IC₅₀ соединения для указанного при ингибировании рецептора горького вкуса hT2R8 составила 0,7 мкМ.

Пример 4-94: N-(1-((3,5-диметилизоксазол-4-ил)метил)-1H-пиразол-4-ил)-7-метокси-2-метилбензо[d][1,3]диоксол-5-карбоксамид

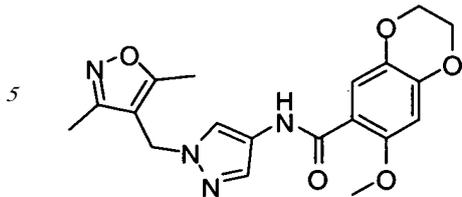


4-94

45 Получали как в примере 4-92 из N-(1-((3,5-диметилизоксазол-4-ил)метил)-1H-пиразол-4-ил)-3,4-дигидрокси-5-метоксибензамид (пример 4-73), карбоната цезия и 1,1-дибромэтана. Выход 25%. МС M+H рассчитано 385,1, экспериментально 385,1.

IC₅₀ для указанного соединения при ингибировании рецептора горького вкуса hT2R8 составила 0,7 мкМ.

Пример 4-95: N-(1-((3,5-диметилизоксазол-4-ил)метил)-1H-пиразол-4-ил)-7-метокси-2,3-дигидробензо[b][1,4]диоксин-6-карбоксамид



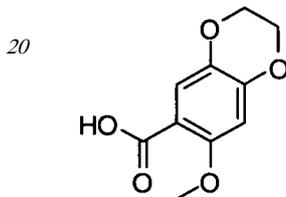
4-95

10 Получали как в примере 4-73 из 1-((3,5-диметилизоксазол-4-ил)метил)-1H-пиразол-4-амина гидрохлорида (пример 4-1а) и 7-метокси-2,3-дигидробензо[b][1,4]диоксин-6-карбоновой кислоты (пример 4-95а). Выход 50%. МС М+Н рассчитано 385,1,

экспериментально 385,1. ^1H ЯМР (400 МГц, ДМСО): δ 2,136 (с, 3H), 2,410 (с, 3H), 3,851 (с, 3H), 4,214 (ушир.с, 2H), 4,296 (ушир.с, 2H), 5,120 (с, 2H), 6,688 (с, 1H), 7,290 (с, 1H),
15 7,6006 (с, 1H), 8,069 (с, 1H), 9,856 (с, 1H).

IC_{50} соединения для указанного при ингибировании рецептора горького вкуса hT2R8 составила 0,7 мкМ.

Пример 4-95а: 7-Метокси-2,3-дигидробензо[b][1,4]диоксин-6-карбоновая кислота



4-95а

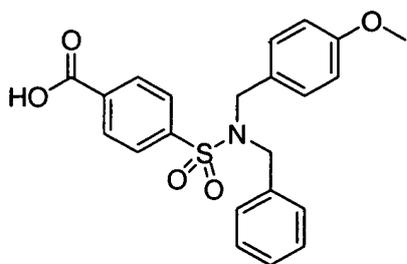
25 В сосуде вместимостью 2 мл для применения в микроволновой системе растворяли метил-7-бром-2,3-дигидробензо[b][1,4]диоксин-6-карбоксилат (273 мг, 1 ммоль) и CuBr (14,3 мг, 0,1 ммоль) в осушенном ДМФ и помещали на ледяную баню. (540 мг, 10 ммоль)
30 В реакционную смесь при перемешивании по каплям добавляли метоксид натрия при 0°C. Реакционную смесь нагревали до комнатной температуры и перемешивали в течение 45 минут. Затем реакционную смесь помещали в микроволновый реактор на 5 минут при 135°C. Реакционную смесь растворяли в воде и промывали этилацетатом. Водную фазу собирали и подкисляли до pH 4 с помощью 1M HCl. Продукт экстрагировали,
35 применяя этилацетат, затем сушили над сульфатом натрия. Растворитель испаряли под вакуумом с получением требуемого промежуточного соединения, представляющего собой 7-метокси-2,3-дигидробензо[b][1,4]диоксин-6-карбоновую кислоту, которую применяли непосредственно без дополнительной очистки. Выход 57%. МС М+Н рассчитано 211,1, экспериментально 211,1.

40 **Пример 5 Антагонисты hT2R14: Получение соединений согласно изобретению**

Следующие примеры приведены для иллюстрирования различных типичных вариантов реализации изобретения и никоим образом не ограничивают настоящее изобретение.

Пример 5-1: 4-(N-бензил-N-(4-метоксибензил)сульфамоил)бензойная кислота

45



5-1

5 Бензил-4-(N-бензил-N-(4-метоксибензил)сульфамоил)бензоат (пример 5-1a) (517 мг, 1 ммоль) перемешивали в растворе 10/1/2 6N NaOH(водный)/ТГФ/MeOH (27 мл) при 10 температуре окружающей среды в течение 6 часов. Раствор подкисляли 3N HCl (водная) до pH ~3 (примерно 50 мл) и водную фазу экстрагировали этилацетатом (3x, 75 мл). Объединенные органические экстракты сушили над сульфатом натрия и 15 концентрировали на роторном испарителе. Остаток переносили в MeOH (15 мл) и очищали методом обращенно-фазовой ВЭЖХ (с градиентом 5-95% ацетонитрила в H₂O: 25 минут), получая три аликвоты по 5 мл. Чистые фракции объединяли и концентрировали до образования белого твердого вещества. Продукт растворяли в 15 мл абсолютного этанола и испаряли на роторном испарителе (4x) с получением чистой 4-(N-бензил-N-(4-метоксибензил)сульфамоил)бензойной кислоты (174 мг, 42%) в виде 20 белого твердого вещества. Т.пл. 161-163°C. ¹H ЯМР (CDCl₃, 400 МГц): δ 3,78 (с, 3H), 4,32 (с, 2H), 4,36 (с, 2H), 6,78 (д, J=8,4 Гц, 2H), 6,99 (д, J=8,8 Гц, 2H), 7,09-7,07 (м, 2H), 7,27-7,24 (м, 3H), 7,93 (д, J=8,8 Гц, 2H), 8,24 (д, J=8 Гц, 2H). MS 412 (M⁺).

25 IC₅₀ для указанного соединения при ингибировании рецептора горького вкуса hT2R14 составила 0,22 мкМ.

Пример 5-1a: Бензил 4-(N-бензил-N-(4-метоксибензил)сульфамоил)бензоат

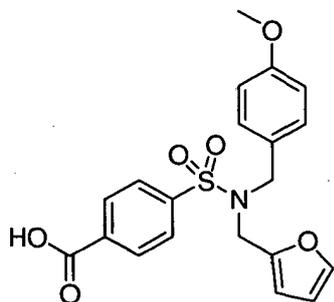
4-(N-(4-метоксибензил)сульфамоил)бензойную кислоту (пример 5-1b) (450 мг, 1,4 ммоль), бензилбромид (770 мг, 4,5 ммоль) и карбонат цезия (1,5 г, 4,5 ммоль) в ДМФ 30 (10 мл) перемешивали при 80°C в течение 2 часов. Раствор охлаждали до комнатной температуры, разбавляли H₂O (200 мл) и экстрагировали этилацетатом (3x, 100 мл). Объединенные органические фазы сушили над сульфатом натрия, фильтровали и концентрировали под вакуумом. Остаток очищали методом хроматографии на силикагеле (10% этилацетат в гексане) с получением бензил-4-(N-бензил-N-(4-метоксибензил)сульфамоил)бензоата (517 мг, 73%) в виде белого твердого вещества. 35 ¹H ЯМР (400 МГц, CDCl₃) δ 3,76 (с, 3H), 4,28 (с, 2H), 4,32 (с, 2H), 5,40 (с, 2H), 6,79 (д, J=8 Гц, 2H), 6,96 (д, J=8 Гц, 2H), 7,04-7,07 (м, 2H), 7,21-7,23 (м, 3H), 7,35-7,47 (м, 5H), 7,85 (д, J=8 Гц, 2H), 8,17 (д, J=8,4 Гц, 2H).

Пример 5-1b: 4-(N-(4-метоксибензил)сульфамоил)бензойная кислота

40 4-(Хлорсульфонил)бензойную кислоту (5 г, 22,7 ммоль) в виде твердого вещества добавляли в три порции при перемешивании к раствору 4-метоксибензиламина (6,1 г, 45 ммоль) и триэтиламина (2,3 г, 22,7 ммоль) в ацетоне (100 мл), охлажденном до 0°C с помощью бани с ледяной водой, в течение 10 минут. Баню со льдом удаляли и 45 реакцию смесь перемешивали в течение дополнительных 4 часов. Реакционную смесь разбавляли раствором 5% уксусной кислоты в H₂O (150 мл) и экстрагировали этилацетатом (3x, 100 мл). Объединенные органические экстракты сушили над сульфатом натрия, фильтровали и концентрировали на роторном испарителе. Образовавшееся белое твердое вещество растирали в порошок с гексаном/этилацетатом (9/1) с

получением 4-(N-(4-метоксибензил)сульфамоил)бензойной кислоты (5,1 г, 70%) в виде белого твердого вещества. ^1H ЯМР (400 МГц, ДМСО d_6) δ 3,68 (с, 3H), 3,91 (с, 2H), 6,79 (д, $J=8,4$ Гц, 2H), 7,10 (д, $J=8,8$ Гц, 2H), 7,80 (д, $J=8,8$ Гц, 2H), 8,02 (д, $J=8,4$ Гц, 2H).

Пример 5-2: 4-(N-(фуран-2-илметил)-N-(4-метоксибензил)сульфамоил)бензойная кислота



5-2

4-Метоксибензил-4-(N-(фуран-2-илметил)-N-(4-метоксибензил)сульфамоил)бензоат (пример 5-2а) (750 мг, 1,4 ммоль) перемешивали в смеси 2/2/1 водного 2N LiOH/ТГФ/MeOH (45 мл) при температуре окружающей среды в течение 3 часов. Раствор подкисляли водной 1N HCl до pH ~3 (примерно 100 мл) и экстрагировали этилацетатом (3х, 100 мл). Объединенные органические экстракты сушили над сульфатом натрия и концентрировали на роторном испарителе. Остаток переносили в MeOH (9 мл) и очищали методом обращенно-фазовой ВЭЖХ (с градиентом 5-95% ацетонитрила в H_2O : 40 минут), получая три аликвоты по 3 мл. Чистые фракции объединяли и концентрировали до образования белого твердого вещества. Продукт растворяли в абсолютном этаноле и испаряли (4х, 20 мл) с получением чистой 4-(N-(фуран-2-илметил)-N-(4-метоксибензил)сульфамоил)бензойной кислоты (205 мг, 36%) в виде белого твердого вещества. Т.пл. 151-152°C. ^1H ЯМР (ДМСО- d_6 , 400 МГц): δ 3,71 (с, 3H), 4,24 (с, 2H), 4,27 (с, 2H), 6,14 (д, 1H, $J=3,2$ Гц), 6,26 (м, 1H), 6,87 (д, 2H, $J=9,2$ Гц), 7,14 (д, 2H, $J=8,8$ Гц), 7,41 (с, 1H), 7,89 (д, 2H, $J=8$ Гц), 8,06 (д, 2H, $J=8,4$ Гц), 13,48 (ушир.с, 1H). MS 400 (M-H).

IC_{50} для указанного соединения при ингибировании рецептора горького вкуса hT2R14 составила 0,59 мкМ.

Пример 5-2а: 4-метоксибензил 4-(N-(фуран-2-илметил)-N-(4-метоксибензил)сульфамоил)бензоат:

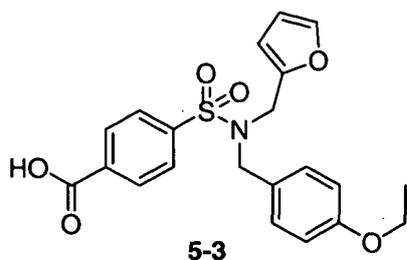
4-(N-(фуран-2-илметил)сульфамоил)бензойную кислоту (пример 5-2b) (500 мг, 1,8 ммоль), *p*-метоксибензилхлорид (624 мг, 4,0 ммоль) и карбонат цезия (1,3 г, 4,0 ммоль) растворяли в ДМФ (10 мл) и перемешивали при 80°C в течение 1 часа. Смесь охлаждали до температуры окружающей среды, разбавляли H_2O (200 мл) и экстрагировали этилацетатом (3х100 мл). Объединенные органические вещества сушили над сульфатом натрия и концентрировали на роторном испарителе. Продукт очищали методом хроматографии на силикагеле (15% этилацетат в гексане) с получением 4-метоксибензил-4-(N-(фуран-2-илметил)-N-(4-метоксибензил)сульфамоил)бензоата (753 мг, 80%) в виде прозрачного масла. ^1H ЯМР (ДМСО- d_6 , 400 МГц): δ 3,70 (с, 3H), 3,75 (с, 3H), 4,22 (с, 2H), 4,26 (с, 2H), 5,39 (с, 2H), 6,14 (д, 1H, $J=3,2$ Гц), 6,25 (м, 1H), 6,87 (д, 2H, $J=8,8$ Гц), 6,97 (д, 2H, $J=8,8$ Гц), 7,13 (д, 2H, $J=8,4$ Гц), 7,39 (м, 1H), 7,43 (д, 2H, $J=8,4$ Гц), 7,91 (д, 2H, $J=8,4$ Гц), 8,07 (д, 2H, $J=8,4$ Гц).

Пример 5-2b: 4-(N-(фуран-2-илметил)сульфамоил)бензойная кислота:

4-(Хлорсульфонил)бензойную кислоту (5,0 г, 22,7 ммоль) при перемешивании добавляли в три порции на протяжении 10 минут к раствору фурфуриламина (6,6 г, 68

ммоль) в ацетоне (200 мл), охлажденному до 0°C с помощью бани с ледяной водой. После завершения добавления сульфонилхлорида баню со льдом удаляли и раствор перемешивали в течение 1 часа при температуре окружающей среды. Смесь концентрировали и обрабатывали методом хроматографии на силикагеле (90% этилацетат, 8% гексан и 2% уксусная кислота) с получением 4,4 г 4-(N-(фуран-2-илметил)сульфамоил)бензойной кислоты (4,4 г, 68%) в виде белого твердого вещества. ¹H ЯМР (ДМСО-d₆, 400 МГц): δ 4,04 (д, 2H, J=6 Гц), 6,13 (д, 1H, J=3,2 Гц), 6,25 (м, 1H), 7,43 (м, 1H), 7,83 (д, 2H, J=8,4 Гц), 8,05 (д, 2H, J=8,4 Гц), 8,36 (т, 1H, J=6 Гц), 13,4 (ушир.с, 1H).

Пример 5-3: 4-(N-(4-этоксibenзил)-N-(фуран-2-илметил)сульфамоил)бензойная кислота



4-Циано-N-(4-этоксibenзил)-N-(фуран-2-илметил)бензолсульфонамид (пример 5-3a) (300 мг, 0,8 ммоль) перемешивали в 1/1 смеси диоксана/1,5 N водного NaOH (100 мл) при 80°C в течение 16 часов. Смесь охлаждали, подкисляли 1N водной HCl (100 мл) и экстрагировали этилацетатом (3x, 75 мл). Объединенные органические экстракты сушили над сульфатом натрия, фильтровали и концентрировали на роторном испарителе. Твердое вещество растирали в порошок с этилацетатом/гексаном (~1/9) и собирали с помощью фильтрования с получением 4-(N-(4-этоксibenзил)-N-(фуран-2-илметил)сульфамоил)бензойной кислоты (250 мг, 69%) в виде белого твердого вещества. ¹H ЯМР (ДМСО-d₆, 400 МГц): δ 1,29 (т, J=6,8 Гц, 3H), 3,97 (кв, J=6,4 Гц, 2H), 4,23 (с, 2H), 4,27 (с, 2H), 6,15 (д, J=3,2 Гц, 1H), 6,27 (м, 1H), 6,84 (д, J=8,8 Гц, 2H), 7,11 (д, J=8,8 Гц, 2H), 7,39 (м, 1H), 7,87 (д, J=8,4 Гц, 2H), 8,00 (д, J=8,4 Гц, 2H).

IC₅₀ соединения при ингибировании рецептора горького вкуса hT2R14 составила 3,0 мкМ.

Пример 5-3a: 4-циано-N-(4-этоксibenзил)-N-(фуран-2-илметил)бензолсульфонамид:

4-Цианобензол-1-сульфонилхлорид (600 мг, 2,9 ммоль) добавляли при перемешивании к раствору N-(4-этоксibenзил)-1-(фуран-2-ил)метанамина (пример 5-3b) (685 мг, 2,9 ммоль) и триэтиламина (455 мг, 4,5 ммоль) в ДХМ (100 мл) и реакционную смесь перемешивали в течение 2 часов. Реакционную смесь разбавляли H₂O (200 мл) и экстрагировали ДХМ (3x, 75 мл). Объединенные органические экстракты сушили над сульфатом натрия, фильтровали и концентрировали на роторном испарителе. Остаток очищали методом хроматографии на силикагеле (10% этилацетат в гексане) с получением 4-циано-N-(4-этоксibenзил)-N-(фуран-2-илметил)бензолсульфонамида (665 мг, 68%) в виде грязно-белого твердого вещества. ¹H ЯМР (ДМСО-d₆, 400 МГц): δ 1,29 (т, J=7,2 Гц, 3H), 3,97 (кв, J=6,8 Гц, 2H), 4,23 (с, 2H), 4,27 (с, 2H), 6,15 (д, J=3,2 Гц, 1H), 6,27 (м, 1H), 6,84 (д, J=8,8 Гц, 2H), 7,11 (д, J=8,8 Гц, 2H), 7,39 (м, 1H), 7,92 (д, J=8,4 Гц, 2H), 8,03 (д, J=8,4 Гц, 2H).

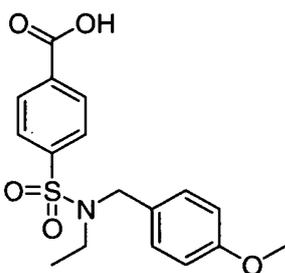
Пример 5-3b: 4 N-(4-этоксibenзил)-1-(фуран-2-ил)метанамин:

4-Этоксibenзальдегид (5 г, 33 ммоль) и фурфуриламин (4,2 г, 43 ммоль) в смеси метанола (50 мл), триметилортоформиата (10 мл) и AcOH (1 мл) перемешивали при комнатной температуре в атмосфере азота в течение 16 часов. Добавляли боргидрид

натрия (1,4 г, 35 ммоль) в 4 порции на протяжении 30 минут (экзотермическая реакция). Реакционную смесь перемешивали в течение дополнительных 2 часов при комнатной температуре. Растворитель удаляли под вакуумом и остаток переносили в этилацетат (150 мл). Органическую фазу промывали H₂O (200 мл) и водную фазу опять

экстрагировали этилацетатом (2х, 100 мл). Объединенные органические фазы концентрировали и остаток очищали на силикагеле (70% этилацетат в гексане с ~0,5% триэтиламино) с получением N-(4-этоксibenзил)-1-(фуран-2-ил)метанамина (6,1 г, 80%) в виде прозрачного масла. ¹H ЯМР (CDCl₃, 400 МГц): δ 1,40 (т, J=7,2 Гц, 3H), 3,71 (с, 2H), 3,76 (с, 2H), 4,02 (кв, J=7,2 Гц, 2H), 6,17 (д, J=4 Гц, 1H), 6,31 (м, 1H), 6,84 (д, J=8,8 Гц, 2H), 7,23 (д, J=8,8 Гц, 2H), 7,36 (м, 1H).

Пример 5-4: 4-(N-этил-N-(4-метоксибензил)сульфамоил)бензойная кислота

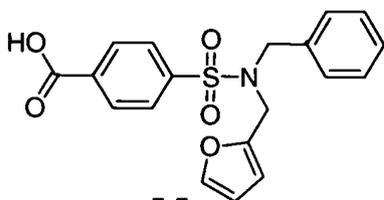


5-4

4-(N-(4-метоксибензил)сульфамоил)бензойную кислоту (пример 5-1b) (160 мг, 0,5 ммоль) и карбонат цезия (325 мг, 1 ммоль) помещали в сосуд для применения в микроволновой системе и растворяли в 2 мл ДМФ. В реакционную смесь добавляли этилийодид (155 мг, 1 ммоль). Реакционную смесь помещали в микроволновый реактор и нагревали при 165°C в течение 5 минут. Реакционную смесь растворяли в этилацетате и промывали водой. Органическую фазу сушили над сульфатом натрия и испаряли в вакууме. Неочищенный продукт растворяли в растворе 4/1 6N NaOH (водный)/ тетрагидрофуран (3 мл) и перемешивали при температуре окружающей среды в течение 6 часов. Раствор подкисляли 3N HCl (водной) до pH ~3 и продукт экстрагировали этилацетатом (3х, 75 мл). Объединенные органические экстракты сушили над сульфатом натрия и концентрировали под вакуумом. Остаток переносили в метанол (3 мл) и очищали методом обращенно-фазовой ВЭЖХ (с градиентом 5-95% ацетонитрила в H₂O: 25 минут). Как известно, эти соединения ингибируют hT2R14 с IC₅₀ 20 мкМ. Выход 35%. МС М+Н рассчитано 350,11, экспериментально 350,0.

IC₅₀ для указанного соединения при ингибировании рецептора горького вкуса hT2R14 составила 10 мкМ.

Пример 5-5: 4-(N-бензил-N-(фуран-2-илметил)сульфамоил)бензойная кислота



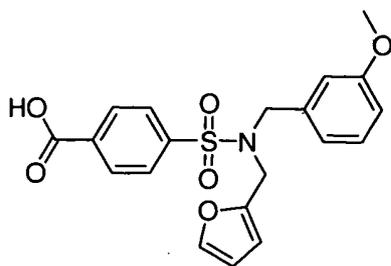
5-5

4-(N-(фуран-2-илметил)сульфамоил)бензойную кислоту (пример 5-2b) (140 мг, 0,5 ммоль) и карбонат цезия (325 мг, 1 ммоль) помещали в сосуд для применения в микроволновой системе и растворяли в 2 мл ДМФ. В реакционную смесь добавляли (бромметил)бензол (170 мг, 1 ммоль). Реакционную смесь помещали в микроволновый реактор и нагревали при 165°C в течение 5 минут. Реакционную смесь растворяли в

этилацетате и промывали водой. Органическую фазу сушили над сульфатом натрия и испаряли в вакууме. Неочищенный продукт растворяли в 4/1 растворе 6N NaOH (водный) /тетрагидрофуран (3 мл) и перемешивали при температуре окружающей среды в течение 6 часов. Раствор подкисляли 3N HCl (водной) до pH ~3 и экстрагировали продукт
 5 этилацетатом (3х, 75 мл). Объединенные органические экстракты сушили над сульфатом натрия и концентрировали в вакууме. Остаток переносили в метанол (3 мл) и очищали методом обращенно-фазовой ВЭЖХ (с градиентом 5-95% ацетонитрила в H₂O: 25 минут). Выход 35%. МС М+Н рассчитано 372,4, экспериментально 372,0.

10 IC₅₀ для указанного соединения при ингибировании рецептора горького вкуса hT2R14 составила 4,6 мкМ.

Пример 5-6: 4-(N-(фуран-2-илметил)-N-(3-метоксибензил)сульфамоил)бензойная кислота

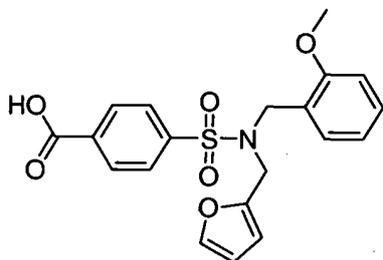


5-6

20 Получали как в примере 5-5 из 1-(бромметил)-3-метоксибензола и 4-(N-(фуран-2-илметил)сульфамоил)бензойной кислоты (пример 5-2b). Выход 35%. МС М+Н рассчитано 402,3, экспериментально 402,0.

IC₅₀ для указанного соединения при ингибировании рецептора горького вкуса hT2R14
 25 составила 10 мкМ.

Пример 5-7: 4-(N-(фуран-2-илметил)-N-(2-метоксибензил)сульфамоил)бензойная кислота

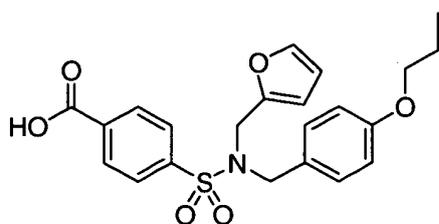


5-7

35 Получали как в примере 5-5 из 1-(бромметил)-2-метоксибензола и 4-(N-(фуран-2-илметил)сульфамоил)бензойной кислоты (пример 5-2b). Выход 35%. МС М+Н рассчитано 402,3, экспериментально 402,0.

IC₅₀ для указанного соединения при ингибировании рецептора горького вкуса hT2R14
 40 составила 12 мкМ.

Пример 5-8: 4-(N-(4-пропоксибензил)-N-(фуран-2-илметил)сульфамоил)бензойная кислота



5-8

4-Циано-N-(4-пропоксибензил)-N-(фуран-2-илметил)бензолсульфонамид (пример 5-

8а) (300 мг, 0,8 ммоль) перемешивали в 1/1 смеси диоксана/1,5 N водного NaOH (100 мл) при 80°C в течение 16 часов. Смесь охлаждали, подкисляли 1N водной HCl (100 мл) и экстрагировали этилацетатом (3х, 75 мл). Объединенные органические экстракты сушили над сульфатом натрия, фильтровали и концентрировали на роторном испарителе. Твердое вещество растирали в порошок с этилацетатом/гексаном (~1/9) и собирали с помощью фильтрования с получением 4-(N-(4-пропоксибензил)-N-(фуран-2-илметил)сульфамоил)бензойной кислоты (165 мг, 63%) в виде белого твердого вещества. ¹H ЯМР (ДМСО-d₆, 400 МГц): δ 0,94 (т, J=7,6 Гц, 3H), 1,70 (м, J=6,8 Гц, 2H), 3,87 (т, J=6,4 Гц, 2H), 4,23 (с, 2H), 4,27 (с, 2H), 6,13 (д, J=2,8 Гц, 1H), 6,27 (м, 1H), 6,84 (д, J=6,8 Гц, 2H), 7,11 (д, J=8,8 Гц, 2H), 7,39 (м, 1H), 7,87 (д, J=6,8 Гц, 2H), 8,05 (д, J=6,8 Гц, 2H), 13,45 (ушир.с, 1H).

IC₅₀ для указанного соединения при ингибировании рецептора горького вкуса hT2R14 составила 2,5 мкМ.

Пример 5-8а: 4-циано-N-(4-пропоксибензил)-N-(фуран-2-илметил)бензолсульфонамид
4-Цианобензол-1-сульфонилхлорид (600 мг, 2,9 ммоль) добавляли при перемешивании к раствору N-(4-пропоксибензил)-1-(фуран-2-ил)метанамина (пример 5-8b) (685 мг, 2,9 ммоль) и триэтиламина (455 мг, 4,5 ммоль) в ДХМ (100 мл) и реакционную смесь перемешивали в течение 2 часов. Реакционную смесь разбавляли H₂O (200 мл) и

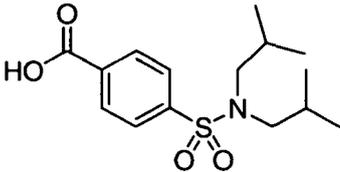
экстрагировали ДХМ (3х, 75 мл). Объединенные органические экстракты сушили над сульфатом натрия, фильтровали и концентрировали на роторном испарителе. Остаток очищали методом хроматографии на силикагеле (10% этилацетат в гексане) с получением 4-циано-N-(4-пропоксибензил)-N-(фуран-2-илметил)бензолсульфонамида (500 мг, 50%) в виде грязно-белого твердого вещества. ¹H ЯМР (ДМСО-d₆, 400 МГц): δ 0,95 (т, J=7,2 Гц, 3H), 1,70 (м, J=6,4 Гц, 2H), 3,88 (т, J=6,4 Гц, 2H), 4,25 (с, 2H), 4,28 (с, 2H), 6,15 (д, J=3,2 Гц, 1H), 6,27 (м, 1H), 6,84 (д, J=6,8 Гц, 2H), 7,11 (д, J=8,8 Гц, 2H), 7,39 (м, 1H), 7,93 (д, J=6,4 Гц, 2H), 8,01 (д, J=6,4 Гц, 2H).

Пример 5-8b: 4 N-(4-пропоксибензил)-1-(фуран-2-ил)метанамин:

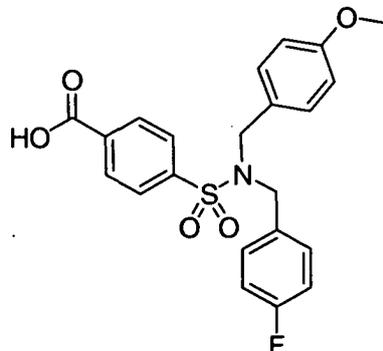
4-Пропоксибензальдегид (5 г, 31 ммоль) и фурфуриламин (3,9 г, 40 ммоль) в смеси метанола (50 мл), триметилортоформиата (10 мл) и AcOH (~1 мл) перемешивали при комнатной температуре в атмосфере азота в течение 16 часов. Добавляли в 4 порции боргидрид натрия (1,4 г, 35 ммоль) на протяжении 30 минут (экзотермическая реакция). Реакционную смесь перемешивали в течение дополнительных 2 часов при комнатной температуре. Растворитель удаляли на роторном испарителе, и остаток переносили в этилацетат (150 мл). Органическую фазу промывали H₂O (200 мл) и водную фазу опять экстрагировали этилацетатом (2х, 100 мл). Объединенные органические фазы концентрировали и остаток очищали на силикагеле (70% этилацетат в гексане с ~2% триэтиламина) с получением N-(4-пропоксибензил)-1-(фуран-2-ил)метанамина (5,3 г, 75%) в виде желтого масла. ¹H ЯМР (CDCl₃, 400 МГц): δ 1,03 (т, J=7,2 Гц, 3H), 1,79 (м, J=6,4 Гц, 2H), 3,71 (с, 2H), 3,76 (с, 2H), 3,90 (т, J=6,8 Гц, 2H), 6,17 (д, J=3,2 Гц, 1H), 6,32 (м, 1H), 6,85 (д, J=8,4 Гц, 2H), 7,22 (д, J=8,8 Гц, 2H), 7,37 (м, 1H).

Дополнительные соединения экспериментально исследовали и обнаружили, что они имеют относительно высокий уровень эффективности в качестве ингибиторов рецептора горького вкуса hT2R14. Результаты этого исследования приведены ниже в таблице В.

Таблица В		
№ соединения	Соединение	hT2R14 IC ₅₀ (мкМ)

5-9	 <p>4-(N,N-диизобутилсульфамоил)бензойная кислота</p>	15
-----	---	----

Пример 5-10: 4-(N-(4-фторбензил)-N-(4-метоксибензил)сульфамоил)бензойная кислота



Метил-4-(N-(4-фторбензил)-N-(4-метоксибензил)сульфамоил)бензоат (пример 5-10а) (3,7 г, 8,3 ммоль) растворяли в MeOH/ТГФ (1:1,5, 30 мл) и обрабатывали водным NaOH (3 N, 15 мл). Смесь перемешивали при температуре окружающей среды в течение ночи, затем MeOH и ТГФ удаляли в вакууме. Образовавшийся водный раствор подкисляли 6 N водной HCl до pH ~3 и экстрагировали EtOAc (3×40 мл). Объединенные органические фазы промывали водой и соляным раствором, сушили над Na₂SO₄ и концентрировали. Неочищенный продукт очищали посредством перекристаллизации из EtOH с получением чистой 4-(N-(4-фторбензил)-N-(4-метоксибензил)сульфамоил)бензойной кислоты в виде белого кристаллического твердого вещества (2,1 г, 58,6%). МС (М-Н, 428,1); ¹H ЯМР (400 МГц, DMSO-d₆): δ, млн. частей: 3,66 (с, 3H), 4,23 (с, 2H), 4,26 (с, 2H), 6,72 (д, 2H, J=8 Гц), 6,95 (м, 6H), 7,92 (д, 2H, J=8 Гц), 8,07 (д, 2H, J=8 Гц). IC₅₀ для указанного соединения при ингибировании рецептора горького вкуса hT2R14 составила 1,97 мкМ.

Пример 5-10а: Метил-4-(N-(4-фторбензил)-N-(4-метоксибензил)сульфамоил)бензоат

Метил-4-(N-(4-метоксибензил)сульфамоил)бензоат (пример 5-10b) (4,3 г, 12,8 ммоль) растворяли в ацетоне (70 мл). Добавляли карбонат цезия (8,57 г, 25,6 ммоль) и 4-фторбензилбромид (1,76 мл, 14,08 ммоль) и перемешивали смесь при комнатной температуре в течение ночи. Неорганические соли отфильтровывали и ацетон удаляли в вакууме. Остаток повторно растворяли в этилацетате, промывали водой и соляным раствором, затем органическую фазу сушили над сульфатом магния и концентрировали. Неочищенный продукт очищали с помощью перекристаллизации из этилацетата/гексана с получением чистого метил-4-(N-(4-фторбензил)-N-(4-метоксибензил)сульфамоил)бензоата (3,7 г, 65%) в виде белого твердого вещества. ¹H ЯМР (400 МГц, CDCl₃): δ, млн. частей: 3,77 (с, 3H), 3,98 (с, 3H), 4,27 (с, 2H), 4,28 (с, 2H), 6,74 (д, 2H, J=8 Гц), 6,92 (м, 4H), 7,03 (м, 2H), 7,88 (д, 2H, J=8 Гц), 8,16 (д, 2H, J=8 Гц).

Пример 5-10b: Метил-4-(N-(4-метоксибензил)сульфамоил)бензоат

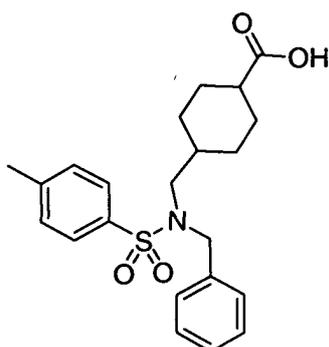
К раствору метил-4-(хлорсульфони)л)бензоата (пример 5-10c) (4 г, 17,09 ммоль) в дихлорметане (40 мл) при 0°C на ледяной бане добавляли (4-метоксифенил)метанамин (2,56 мл, 19,65 ммоль) и триэтиламин (2,38 мл, 17,1 ммоль). Затем баню со льдом удаляли и оставляли смесь нагреваться до температуры окружающей среды при перемешивании в течение дополнительных 2 часов. После завершения реакции (контролировали методом ТСХ, 40% этилацетат/гексан), растворитель удаляли в вакууме. Остаток повторно

растворяли в этилацетате (200 мл), промывали 1N HCl (водной, 20 мл), водой (20 мл) и соляным раствором (20 мл), затем сушили над сульфатом магния. Раствор концентрировали и продукт очищали методом перекристаллизации из горячего этилацетата/гексана с получением чистого метил-4-(N-(4-метоксибензил)сульфамойл) бензоата (4,3 г, 74,8%) в виде белого твердого вещества. ¹H ЯМР (400 МГц, ДМСО-d₆): δ, млн. частей: 3,67 (с, 3H), 3,78 (с, 3H), 3,93 (с, 2H), 6,78 (м, 2H), 7,09 (м, 2H), 7,87 (м, 2H), 8,08 (м, 2H), 8,25 (ушир.с, 1H).

Пример 5-10с: Метил-4-(хлорсульфонил)бензоат

4-Хлорсульфонилбензойную кислоту (5 г, 23 ммоль) и тионилхлорид (20 мл) в дихлорэтане (10 мл) нагревали до 80°C в течение 2 час. Реакционную смесь концентрировали путем роторного испарения с получением коричневатого твердого вещества. Твердое вещество охлаждали на льду в течение 5 минут и при перемешивании добавляли ледяной метанол (40 мл) при 0°C в течение 5 минут. Реакционную смесь оставляли нагреваться до температуры окружающей среды и перемешивали дополнительные 10 мин. После добавления ледяной воды (40 мл) получали белое твердое вещество, которое собирали с помощью фильтрования и сушили под вакуумом с получением чистого метил-4-(хлорсульфонил)бензоата (4,5 г, 84%). ¹H ЯМР (400 МГц, ДМСО-d₆): δ, млн. частей: 3,84 (с, 3H), 7,70 (д, 2H, J=8,4 Гц), 7,93 (д, 2H, J=8,4 Гц).

Пример 5-11: 4-((N-бензил-4-метилфенилсульфонамидо)метил)циклогексанкарбоновая кислота



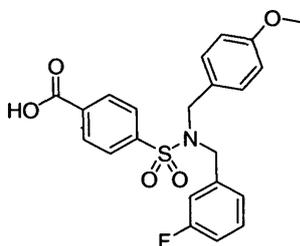
К суспензии 4-(аминометил)циклогексанкарбоновой кислоты (1,57 г, 10 ммоль) в 100 мл 2,2-диметоксипропана добавляли HCl (10 мл, 36% водную). Смесь перемешивали при температуре окружающей среды в течение 18 час и затем концентрировали. Остаток растворяли в минимальном объеме MeOH и добавляли диэтиловый эфир для осаждения соли HCl, метил-4-(аминометил)циклогексанкарбоксилата в виде грязно-белого твердого вещества. Это вещество применяли без дальнейшей очистки или определения характеристик.

К смеси HCl соли метил-4-(аминометил)циклогексанкарбоксилата (208 мг, 1 ммоль) в 5 мл дихлорметана при 0°C на ледяной бане добавляли триэтиламин (360 мкл, 2,58 ммоль) и 4-метилбензол-1-сульфонилхлорид (190 мг, 1 ммоль). Смесь на бане со льдом оставляли медленно нагреваться до температуры окружающей среды и перемешивали в течение ночи. Растворитель удаляли в вакууме. Остаток повторно растворяли в этилацетате (20 мл), промывали 1N HCl (5 мл), водой (5 мл) и соляным раствором (5 мл), затем сушили над сульфатом магния и концентрировали. Полученный неочищенный продукт (162 мг, 0,5 ммоль) повторно растворяли в ацетоне (5 мл) и обрабатывали карбонатом калия (110 мг, 0,79 ммоль) и (4-фторфенил)метанамин (1,76 мл, 14,08 ммоль). Смесь перемешивали в сосуде под давлением при 80°C в течение ночи, затем охлаждали и отфильтровывали неорганические соли. Ацетон удаляли под вакуумом, и остаток повторно растворяли в этилацетате и промывали водой, а затем соляным

раствором. Органическую фазу сушили над сульфатом магния и концентрировали. Неочищенный продукт (162 мг, 0,4 ммоль) растворяли в MeOH/ТГФ (1:1,5, 10 мл) и обрабатывали водным NaOH (10N, 400 мкл). Смесь перемешивали при 100°C в течение 20 мин в микроволновой печи и затем удаляли MeOH и ТГФ в вакууме. Остаток подкисляли 6 N водной HCl до pH ~3 и экстрагировали EtOAc; объединенные органические фазы промывали водой и соляным раствором, сушили над Na₂SO₄ и концентрировали. Неочищенный продукт очищали посредством перекристаллизации из EtOH с получением чистой 4-((N-бензил-4-метилфенилсульфонамидо)метил) циклогексанкарбоновой кислоты в виде белого твердого вещества (120 мг, 74%). МС (M+N, 402); ¹H ЯМР (400 МГц, DMSO-d₆): δ, млн. частот: 0,68 (м, 2H), 0,91 (м, 2H), 1,06 (ушир.с, 1H), 1,50 (д, 2H), 1,72 (д, 2H), 2,0 (1H), 2,41 (с, 3H), 2,86 (м, 2H), 4,21 (с, 2H), 7,30 (м, 5H), 7,43 (м, 2H), 7,73 (м, 2H), 11,97 (ушир.с, 1H).

IC₅₀ для указанного соединения при ингибировании рецептора горького вкуса hT2R14 составила 0,014 мкМ.

Пример 5-12: 4-(N-(3-фторбензил)-N-(4-метоксибензил)сульфамоил)бензойная кислота



Метил-4-(N-(4-метоксибензил)сульфамоил)бензоат (пример 5-10b) (500 мг, 1,49 ммоль), 3-фторбензилбромид (280 мг, 2,98 ммоль) и карбонат цезия (971 мг, 2,98 ммоль) помещали в ДМФ (12 мл) и перемешивали при 90°C в течение 4 часов. Раствор охлаждали до температуры окружающей среды, разбавляли H₂O (200 мл) и экстрагировали этилацетатом (3x, 100 мл). Объединенные органические фазы сушили над MgSO₄, фильтровали и концентрировали в вакууме. Остаток очищали методом хроматографии на силикагеле (10-20% этилацетат в гексане) с получением метил-4-(N-(3-фторбензил)-N-(4-метоксибензил)сульфамоил)бензоата (528 мг, 80%) в виде белого твердого вещества.

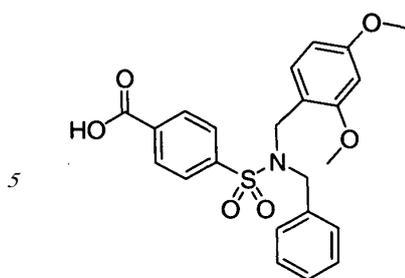
Метил-4-(N-(3-фторбензил)-N-(4-метоксибензил)сульфамоил)бензоат (500 мг, 1,12 ммоль) растворяли в MeOH/ТГФ (1:1, 40 мл) и обрабатывали раствором водного NaOH (10 N, 8 мл). Смесь перемешивали при температуре окружающей среды в течение ночи, затем удаляли MeOH и ТГФ путем роторного испарения. Образовавшийся водный раствор промывали EtOAc (10 мл) и подкисляли 6 N водной HCl (~15 мл) до pH~4. Водный раствор экстрагировали EtOAc (3x, 40 мл) и объединенные органические фазы промывали водой, соляным раствором, сушили над MgSO₄ и концентрировали.

Неочищенный продукт очищали посредством перекристаллизации из EtOH с получением титульного соединения 4-(N-(3-фторбензил)-N-(4-метоксибензил)сульфамоил)бензойной кислоты в виде белого кристаллического твердого вещества (150 мг) с 30% выходом.

МС (M-N, 428,1); ¹H ЯМР (400 МГц, DMSO-d₆): δ, млн. частот: 3,65 (с, 3H), 4,27 (с, 2H), 4,29 (с, 2H), 6,75-7,00 (м, 7H), 7,20 (м, 1H), 7,95 (д, 2H, J=8 Гц); 8,10 (д, 2H, J=8 Гц).

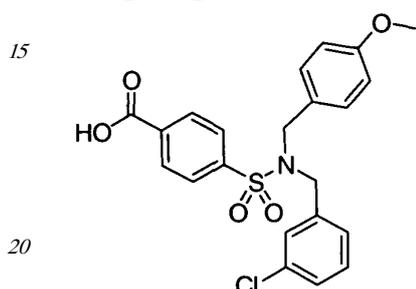
Пример 5-13: 4-(N-бензил-N-(2,4-диметоксибензил)сульфамоил)бензойная кислота

45



10 Получали как в примере 5-10 из (2,4-диметоксифенил)метанамина, метил-4-(хлорсульфонил)бензоата (пример 5-10с) и бензилбромид. МС (М-Н, 440,10); ¹Н ЯМР (400 МГц, ДМСО-d₆): δ, млн. частей: 3,50 (с, 63Н), 3,66 (с, 3Н), 4,20 (с, 2Н), 4,34 (с, 2Н), 6,29 (с, 1Н), 6,33 (д, J=8,0 Гц, 1Н), 6,91 (д, J=8,8 Гц, 1Н), 7,12-7,23 (м, 5Н), 7,80 (д, J=8,0 Гц, 2Н), 8,01 (д, J=8,4 Гц, 2Н), 13,49 (с, 1Н).

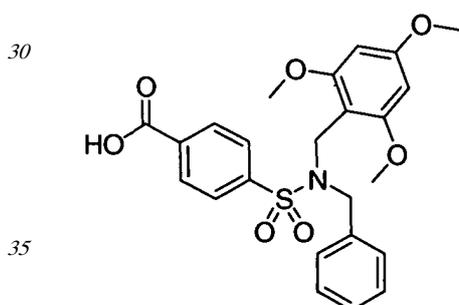
15 **Пример 5-14: 4-(N-(3-хлорбензил)-N-(4-метоксибензил)сульфамоил)бензойная кислота**



25 Получали как в примере 5-10 из метил-4-(N-(4-метоксибензил)сульфамоил)бензоата (пример 5-10b) и 1-(бромметил)-3-хлорбензола. МС (М-Н, 444,1); ¹Н ЯМР (400 МГц, ДМСО-d₆): δ, млн. частей: 3,69 (с, 3Н), 4,30 (м, 4Н), 6,76-7,24 (м, 8Н), 7,99 (м, 2Н), 8,13 (м, 2Н).

ИC₅₀ для указанного соединения при ингибировании рецептора горького вкуса hT2R14 составила 1,88 мкМ.

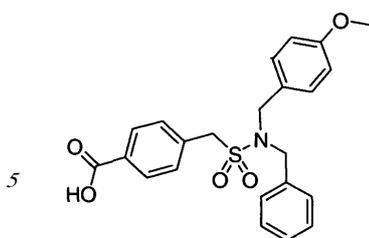
30 **Пример 5-15: 4-(N-бензил-N-(2,4,6-триметоксибензил)сульфамоил)бензойная кислота**



40 Получали как в примере 5-10 из (2,4,6-триметоксифенил)метанамина, метил-4-(хлорсульфонил)бензоата (пример 5-10с) и бензилбромид. МС (М-Н, 470,10); ¹Н ЯМР (400 МГц, ДМСО-d₆): δ, млн. частей: 3,45 (с, 6Н), 3,69 (с, 3Н), 4,26 (с, 2Н), 4,28 (с, 2Н), 5,98 (с, 2Н), 7,11-7,26 (м, 5Н), 7,82 (д, J=8,0 Гц, 2Н), 8,07 (д, J=8 Гц, 2Н), 13,49 (с, 1Н). Элементный анализ (экспериментально, %): С 61,05; Н 5,49; N 2,98; (рассчитано, %): С 61,13; Н 5,34 и N 2,97.

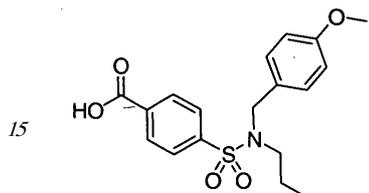
45 ИC₅₀ для указанного соединения при ингибировании рецептора горького вкуса hT2R14 составила 10,76 мкМ.

Пример 5-16: 4-(N-бензил-N-(4-метоксибензил)сульфамоил)метилбензойная кислота



Получали как в примере 5-10 из метил-4-(N-(4-метоксибензил)сульфамоил)бензоата (пример 5-10b) и бензилбромида. МС (М-Н, 424,1); ¹Н ЯМР (400 МГц, ДМСО-d6): δ, млн. частей: 3,72 (с, 3Н), 4,18 (д, 2Н), 4,55 (с, 2Н), 6,83 (м, 2Н), 7,12 (м, 2Н), 7,21 (м, 2Н), 7,28 (м, 3Н), 7,43 (м, 2Н), 7,93 (м, 2Н).

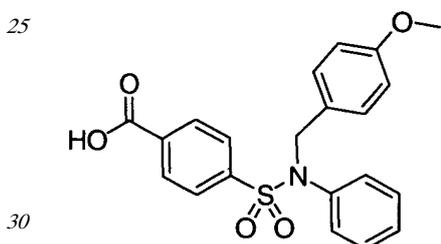
10 **Пример 5-17: 4-(N-(4-метоксибензил)-N-пропилсульфамоил)бензойная кислота**



Получали как в примере 5-10 из метил-4-(N-(4-метоксибензил)сульфамоил)бензоата (пример 5-10b) и n-пропилбромида. МС (М-Н, 362,1); ¹Н ЯМР (400 МГц, CDCl₃): δ, млн. частей: 0,70 (м, 3Н), 1,35 (м, 3Н), 3,08 (м, 2Н), 3,73 (с, 3Н), 4,31 (с, 2Н), 6,83 (м, 2Н), 7,17 (м, 2Н), 7,93 (м, 2Н), 8,23 (м, 2Н).

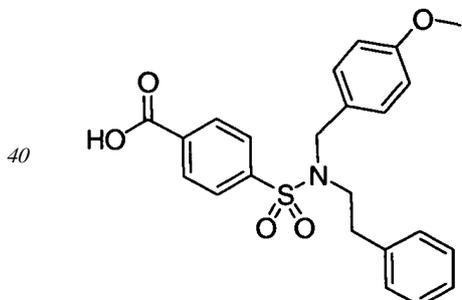
IC₅₀ для указанного соединения при ингибировании рецептора горького вкуса hT2R14 составила 3,75 мкМ.

25 **Пример 5-18: 4-(N-(4-метоксибензил)-N-фенилсульфамоил)бензойная кислота**



Получали как в примере 5-10 из анилина, метил-4-(хлорсульфонил)бензоата (пример 5-10c) и 1-(хлорметил)-4-метоксибензола. МС (М-Н, 396,1); ¹Н ЯМР (400 МГц, ДМСО-d6): δ, млн. частей: 3,66 (с, 3Н), 4,73 (с, 2Н), 6,78 (д, J=8,4 Гц, 2Н), 7,00 (д, J=7,6 Гц, 2Н), 7,12 (д, J=8,0 Гц, 2Н), 7,24 (д, J=8,0 Гц, 2Н), 8,11 (д, J=8,4 Гц, 2Н), 13,49 (с, 1Н).

35 **Пример 5-19: 4-(N-(4-метоксибензил)-N-фенетилсульфамоил)бензойная кислота**



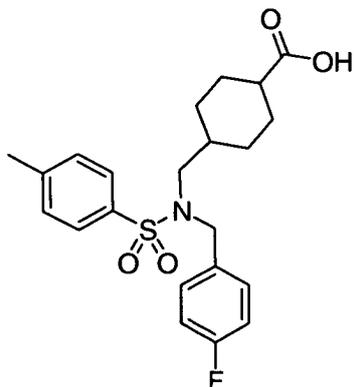
45 Получали как в примере 5-10 из 2-фенилэтанамина, метил-4-(хлорсульфонил)бензоата (пример 5-10c) и 1-(хлорметил)-4-метоксибензола. МС (М-Н, 424,1); ¹Н ЯМР (400 МГц, ДМСО-d6): δ, млн. частей: 2,51 (м, 2Н), 3,23 (м, 2Н), 3,74 (с, 3Н), 4,31 (с, 2Н), 4,31 (с, 2Н), 6,92 (м, 2Н), 6,98 (м, 2Н), 7,20-7,27 (м, 5Н), 7,85 (м, 2Н), 8,06 (м, 2Н).

IC₅₀ для указанного соединения при ингибировании рецептора горького вкуса hT2R14 составила 4,58 мкМ.

Пример 5-20: 4-((N-(4-фторбензил)-4-метилфенилсульфонамидо)метил)циклогексанкарбоновая кислота

5

10



15

Получали как в примере 5-11 из 1-(бромметил)-4-фторбензола, 4-(аминометил)циклогексанкарбоновой кислоты и 4-метилбензол-1-сульфонилхлорида. МС (М+Н, 420); ¹Н ЯМР (400 МГц, ДМСО-d₆): δ, млн. частей: 0,71 (м, 2Н), 0,95 (м, 2Н), 1,15 (ушир.с, 1Н), 1,51 (д, 2Н), 1,76 (д, 2Н), 2,0 (1Н), 2,40 (с, 3Н), 2,85 (м, 2Н), 4,22 (с, 2Н), 7,14 (м, 2Н), 7,32 (м, 2Н), 7,40 (м, 2Н), 7,69 (м, 2Н), 11,93 (ушир.с, 1Н).

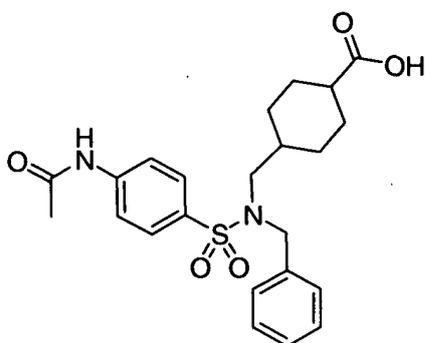
20

IC₅₀ для указанного соединения при ингибировании рецептора горького вкуса hT2R14 составила 0,083 мкМ.

Пример 5-21: 4-((4-ацетида-N-бензилфенилсульфонамидо)метил)циклогексанкарбоновая кислота

25

30



35

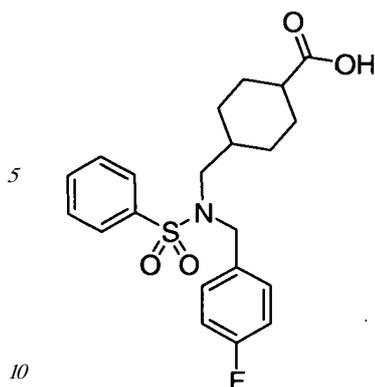
Получали как в примере 5-11 из ацетидабензол-1-сульфонилхлорида, 4-(аминометил)циклогексанкарбоновой кислоты и бензилбромид. МС (М+Н, 445,2); ¹Н ЯМР (400 МГц, ДМСО-d₆): δ, млн. частей: 0,65 (м, 2Н), 0,68 (м, 2Н), 1,05 (м, 1Н), 1,48 (м, 2Н), 1,70 (м, 2Н), 1,92 (м, 1Н), 2,00 (с, 3Н), 2,82 (с, 2Н), 4,21 (с, 2Н), 7,27 (м, 5Н), 7,76 (м, 4Н), 7,62 (м, 2Н), 10,1 (с, 1Н), 11,93 (ушир.с, 1Н).

40

IC₅₀ для указанного соединения при ингибировании рецептора горького вкуса hT2R14 составила 1,619 мкМ.

Пример 5-22: 4-((N-(4-фторбензил)фенилсульфонамидо)метил)циклогексанкарбоновая кислота

45



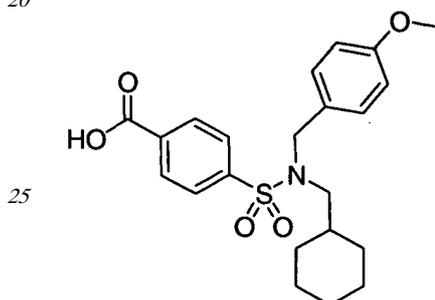
Получали как в примере 5-11 из бензолсульфонилхлорида, 4-(аминометил) циклогексанкарбоновой кислоты и 1-(бромметил)-4-фторбензола. МС (М+Н, 406); ¹Н ЯМР (400 МГц, ДМСО-d₆): δ, млн. частей: 0,77 (м, 2Н), 0,94 (м, 2Н), 0,98 (м, 2Н), 1,50 (м, 2Н), 1,75 (м, 2Н), 1,77 (м, 1Н), 2,80 (д, 2Н), 4,28 (с, 2Н), 7,20 (м, 2Н), 7,38 (м, 2Н), 7,62 (м, 2Н), 7,70 (м, 1Н), 7,88 (м, 2Н), 11,93 (ушир.с, 1Н).

15

IC₅₀ для указанного соединения при ингибировании рецептора горького вкуса hT2R14 составила 0,240 мкМ.

Пример 5-23: 4-(N-(циклогексилметил)-N-(4-метоксибензил)сульфамоил)бензойная кислота

20



Получали как в примере 5-10 из метил-4-(N-(4-метоксибензил)сульфамоил)бензоата (пример 5-10b) и циклогексилметанамина. МС (М-Н, 416,1); ¹Н ЯМР (400 МГц, ДМСО-d₆): δ, млн. частей: 0,63 (м, 2Н), 0,87 (м, 3Н), 0,94 (м, 1Н), 1,25-1,52 (м, 5Н), 1,70 (м, 2Н), 2,86 (м, 2Н), 3,70 (с, 3Н), 4,22 (с, 2Н), 6,84 (м, 2Н), 7,16 (м, 2Н), 7,91 (м, 2Н), 7,62 (м, 2Н), 8,09 (м, 2Н).

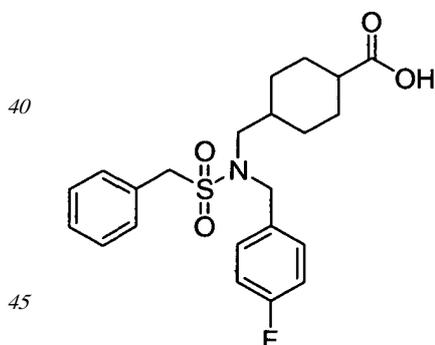
30

IC₅₀ для указанного соединения при ингибировании рецептора горького вкуса hT2R14 составила 3,47 мкМ.

35

Пример 5-24: 4-((N-(4-фторбензил)-1-фенилметилсульфонамидо)метил)циклогексанкарбоновая кислота

40

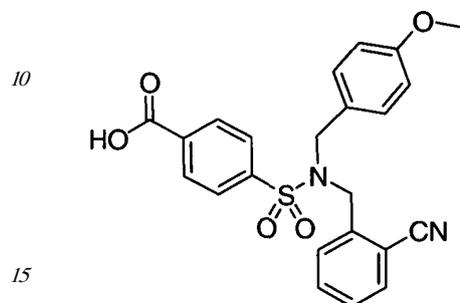


Получали как в примере 5-10 из фенилметансульфонилхлорида и метил-4-(аминометил)циклогексанкарбоксилата и 1-(бромметил)-4-фторбензола. МС (М-Н,

418); ^1H ЯМР (400 МГц, ДМСО-d6): δ , млн. частей: 0,639 (м, 2H), 0,897 (м, 2H), 1,034 (м, 1H), 1,467 (д, ушир., 2H, J=11,2 Гц), 1,709 (д, ушир., 2H, J=11,2 Гц), 1,961 (м, 1H), 2,828 (д, 2H, J=7,6 Гц), 4,207 (с, 2H), 4,449 (с, 2H), 7,155 (т, 2H, J=9,2 Гц), 7,377 (м, 7H), 12 (с, ушир., 1H)

5 IC_{50} для указанного соединения при ингибировании рецептора горького вкуса hT2R14 составила 9,57 мкМ.

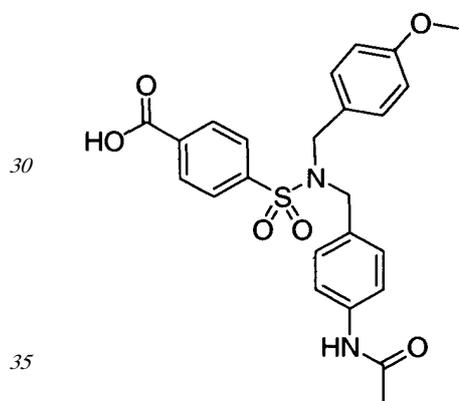
Пример 5-25: 4-(N-(2-цианобензил)-N-(4-метоксибензил)сульфамоил)бензойная кислота



Получали как в примере 5-10 из метил-4-(N-(4-метоксибензил)сульфамоил)бензоата (пример 5-10b) и альфа-бром-о-толунитрила. МС (М-Н, 435,1); ^1H ЯМР (400 МГц, ДМСО-d6): δ , млн. частей: 3,664 (с, 2H), 4,348 (с, 2H), 4,498 (с, 2H), 6,728 (д, 2H, J=8,4 Гц), 7,036 (д, 2H, J=8,4 Гц), 7,352 (т, 2H, J=9,2 Гц), 7,548 (т, 1H, J=7,6 Гц), 7,640 (д, 1H, J=7,6 Гц), 8,003 (д, 2H, J=8 Гц), 8,139 (д, 2H, J=8,4 Гц), 13,559 (с, ушир., 1H).

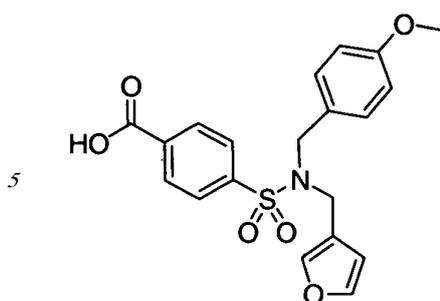
20 IC_{50} для указанного соединения при ингибировании рецептора горького вкуса hT2R14 составила 4,61 мкМ.

Пример 5-26: 4-(N-(4-ацетамидобензил)-N-(4-метоксибензил)сульфамоил)бензойная кислота



Получали как в примере 5-10 из метил-4-(N-(4-метоксибензил)сульфамоил)бензоата (пример 5-10b) и N-(4-(хлорметил)фенил)ацетамида. МС (М-Н, 467,1); ^1H ЯМР (400 МГц, ДМСО-d6): δ , млн. частей: 2,0 (с, 3H), 3,69 (с, 3H), 4,23 (с, 4H), 6,78 (д, 2H, J=7,6 Гц), 6,98 (м, 4H), 7,41 (д, 2H, J=8 Гц), 7,94 (д, 2H, J=8 Гц), 8,09 (д, 2H, J=8 Гц), 9,90 (с, 1H).

Пример 5-27: 4-(N-(фуран-3-илметил)-N-(4-метоксибензил)сульфамоил)бензойная кислота

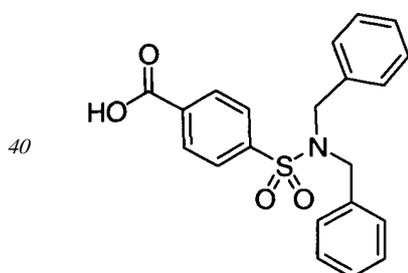


110 мг 1-(фуран-3-ил)-N-(4-метоксибензил)метанамина (пример 5-27а) смешивали с метил-4-(хлорсульфонил)бензоатом (пример 5-10с) (117 мг, 0,5 ммоль) и триэтиламино
 10 (100 мкл) в ДХМ (5 мл). Смесь перемешивали в течение ночи при температуре окружающей среды и концентрировали. Остаток повторно растворяли в этилацетате (20 мл), промывали 1N HCl (водной, 2 мл), а затем водой (5 мл) и соляным раствором (5 мл), потом сушили над сульфатом магния. Неочищенный продукт очищали методом
 15 препаративной ТСХ (40% этилацетат/гексан) с получением метил-4-(N-(фуран-3-илметил)-N-(4-метоксибензил)сульфамойл)бензоата в виде белого твердого вещества. Омыление, проводимое как в примере 5-10, позволяло получить 4-(N-(фуран-3-илметил)-N-(4-метоксибензил)сульфамойл)бензойную кислоту в виде белого кристаллического твердого
 20 вещества (68 мг, 64% выход). МС (М-Н, 400,1); ¹Н ЯМР (400 МГц, ДМСО-d₆): δ, млн. частей: 3,72 (с, 3Н), 4,13 (с, 2Н), 4,26 (с, 2Н), 5,99 (с, 1Н), 6,87 (м, 4Н), 6,87 (д, 2Н, J=8,8 Гц), 7,13 (д, 2Н, J=8,8 Гц), 7,39 (с, 1Н), 7,49 (с, 1Н), 7,95 (д, 2Н, J=8,4 Гц), 8,09 (д, 2Н, J=8,8 Гц).

Пример 5-27а: 1-(фуран-3-ил)-N-(4-метоксибензил)метанамин

Смесь 3-фуральдегида (5 ммоль, 437 мкл) и (4-метоксифенил)метанамина в MeOH
 25 (20 мл) перемешивали при температуре окружающей среды в течение ночи, затем медленно добавляли боргидрид натрия (300 мг, 7,89 ммоль). Образовавшуюся смесь перемешивали при комнатной температуре в течение 15 минут и гасили NaOH (1 N, водным). Метанол удаляли в вакууме и затем образовавшуюся взвесь повторно
 30 растворяли в этилацетате, промывали водой, соляным раствором, сушили над сульфатом натрия и концентрировали. После очистки методом хроматографии на силикагеле (этилацетат:гексан 7:3) получали 1-(фуран-3-ил)-N-(4-метоксибензил)метанамин в виде
 35 масла. МС (М+Н, 218,10); ¹Н ЯМР (400 МГц, CDCl₃): δ, млн. частей: 3,64 (с, 2Н), 3,74 (с, 2Н), 3,80 (с, 3Н), 6,39 (м, 1Н), 6,86 (м, 1Н), 6,88 (м, 1Н), 7,23 (м, 1Н), 7,25 (м, 1Н), 7,35 (м, 1Н), 7,38 (м, 1Н).

Пример 5-28: 4-(N,N-добензилсульфамойл)бензойная кислота

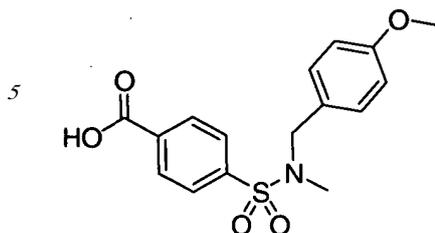


Получали как в примере 5-27 из дибензиламина и метил-4-(хлорсульфонил)бензоата
 45 (пример 5-10с). МС (М-Н, 380,1); ¹Н ЯМР (400 МГц, ДМСО-d₆): δ, млн. частей: 4,52 (с, 4Н), 7,10 (м, 4Н), 7,25 (м, 6Н), 8,00 (д, 2Н, J=8,4 Гц), 8,15 (д, 2Н J=8,4 Гц), 13,5 (с, ушир., 1Н).

IC₅₀ для указанного соединения при ингибировании рецептора горького вкуса hT2R14

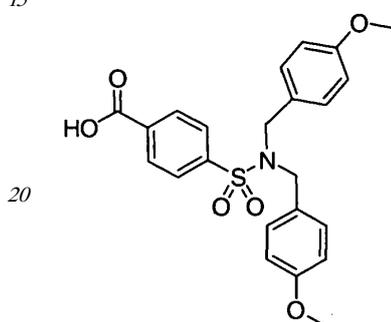
составила 7,74 мкМ.

Пример 5-29: 4-(N-(4-метоксибензил)-N-метилсульфамоил)бензойная кислота



10 Получали как в примере 5-27 из 1-(4-метоксифенил)-N-метилметанамина и метил-4-(хлорсульфонил)бензоата (пример 5-10с). МС (М-Н, 335,1); ¹Н ЯМР (400 МГц, ДМСО-d6): δ, млн. частей: 2,51 (с, 3Н), 3,71 (с, 3Н), 4,05 (с, 2Н), 6,88 (д, 2Н), 7,18 (д, 2Н), 7,91 (д, 2Н); 8,13 (д, 2Н). Элементный анализ: (экспериментально): С 57,47%, Н 4,77% и N 4,31%; (теоретически): С 57,30%, Н 5,11% и N 4,18%.

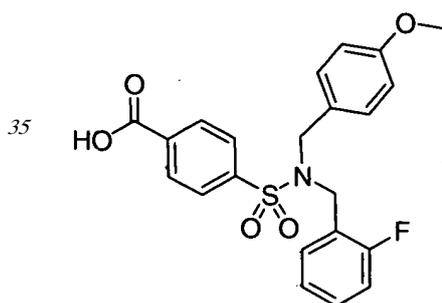
15 **Пример 5-30: 4-(N,N-бис(4-метоксибензил)сульфамоил)бензойная кислота**



25 Получали как в примере 5-27 из бис(4-метоксибензил)амина и метил-4-(хлорсульфонил)бензоата (пример 5-10с). МС (М-Н, 440,1); ¹Н ЯМР (400 МГц, ДМСО-d6): δ, млн. частей: 3,68 (с, 6Н), 4,20 (с, 4Н), 6,77 (д, 4Н, J=10 Гц), 6,98 (д, 4Н, J=10 Гц), 7,92 (дд, 2Н J=8 Гц), 8,06 (дд, 2Н, J=8 Гц). Элементный анализ: (экспериментально): С 62,45%, Н 5,19% и N 3,06%; (теоретически): С 62,57%, Н 5,25% и N 3,17%.

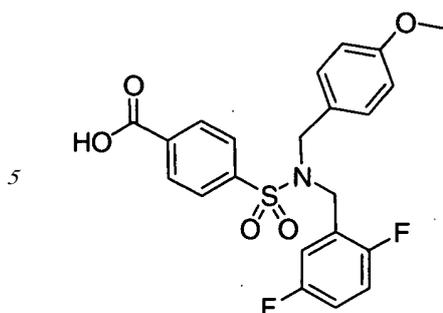
30 IC₅₀ для указанного соединения при ингибировании рецептора горького вкуса hT2R14 составила 4,14 мкМ.

Пример 5-31: 4-(N-(2-фторбензил)-N-(4-метоксибензил)сульфамоил)бензойная кислота



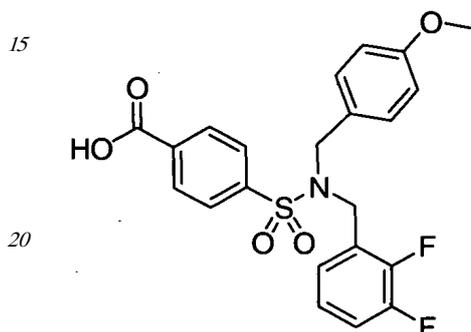
40 Получали как в примере 5-10 из метил-4-(N-(4-метоксибензил)сульфамоил)бензоата (пример 5-10b) и 1-(бромметил)-2-фторбензола. ¹Н ЯМР (400 МГц, ДМСО-d6): δ, млн. частей: 3,66 (с, 3Н), 4,29 (с, 2Н), 4,37 (с, 2Н), 6,72 (д, 2Н, J=8 Гц), 7,01-7,03 (м, 6Н), 7,93 (д, 2Н, J=8 Гц), 8,08 (д, 2Н, J=8 Гц).

45 **Пример 5-32: 4-(N-(2,5-дифторбензил)-N-(4-метоксибензил)сульфамоил)бензойная кислота**



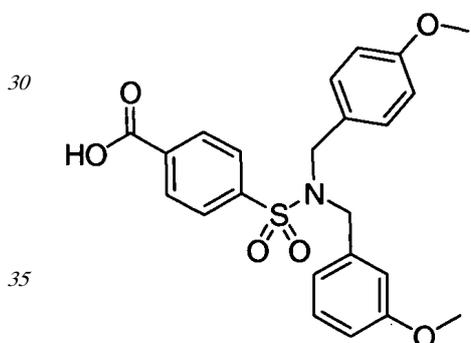
10 Получали как в примере 5-10 из метил-4-(N-(4-метоксибензил)сульфамоил)бензоата (пример 5-10b) и 2-(бромметил)-1,4-дифторбензола. ^1H ЯМР (400 МГц, ДМСО- d_6): δ , млн. частей: 3,66 (с, 3H), 4,31 (с, 2H), 4,33 (с, 2H), 6,74-7,06 (м, 7H), 7,95 (д, 2H, $J=8$ Гц), 8,09 (д, 2H, $J=8$ Гц).

15 **Пример 5-33: 4-(N-(2,3-дифторбензил)-N-(4-метоксибензил)сульфамоил)бензойная кислота**



25 Получали как в примере 5-10 из метил-4-(N-(4-метоксибензил)сульфамоил)бензоата (пример 5-10b) и 1-(бромметил)-2,3-дифторбензола. ^1H ЯМР (400 МГц, ДМСО- d_6): δ , млн. частей: 3,30 (с, 3H), 4,29 (с, 2H), 4,32 (с, 2H), 6,87 (д, 2H, $J=8$ Гц), 7,02-7,20 (м, 5H), 7,95 (д, 2H, $J=8$ Гц), 8,05 (д, 2H, $J=8$ Гц).

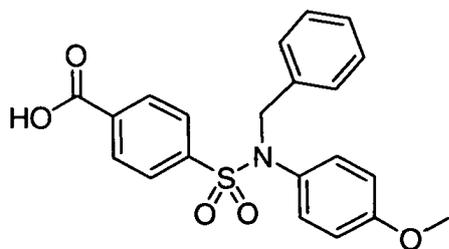
30 **Пример 5-34: 4-(N-(3-метоксибензил)-N-(4-метоксибензил)сульфамоил)бензойная кислота**



40 Получали как в примере 5-10 из метил-4-(N-(4-метоксибензил)сульфамоил)бензоата (пример 5-10b) и 3-метоксибензилбромида. МС (М-Н, 440,50); ^1H ЯМР (400 МГц, ДМСО- d_6): δ , млн. частей: 3,58 (с, 3H), 3,68 (с, 3H), 4,24 (с, 2H), 4,25 (с, 2H), 6,50 (с, 1H), 6,64 (д, $J=4$ Гц, 1H), 6,73 (м, 1H), 6,77 (д, $J=8$ Гц, 2H), 7,00 (д, $J=8$ Гц, 2H), 7,12 (т, $J=8$ Гц, 1H), 7,94 (д, $J=8$ Гц, 2H), 8,09 (д, $J=8$ Гц, 2H), 13,49 (с, 1H).

45 IC_{50} для указанного соединения при ингибировании рецептора горького вкуса hT2R14 составила 2,46 мкМ.

Пример 5-35: 4-(N-бензил-N-(4-метоксифенил)сульфамоил)бензойная кислота

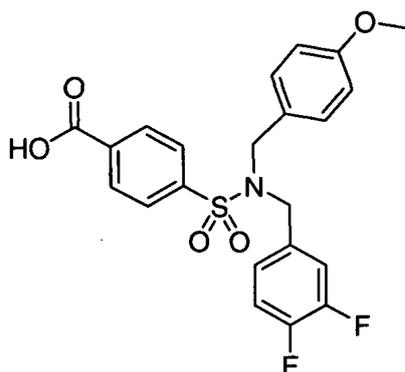


Получали как в примере 5-10 из метил-4-(N-(4-метоксифенил)сульфамоил)бензоата (пример 5-35a) и бензилбромидом. МС (М-Н, 396); ¹Н ЯМР (400 МГц, ДМСО-d₆): δ, млн. частот: 3,66 (с, 3Н), 4,75 (с, 2Н), 6,76 (д, J=8 Гц, 2Н), 6,90 (д, J=8 Гц, 2Н), 7,23 (м, 5Н), 7,74 (д, J=8 Гц, 2Н), 8,11 (д, J=8 Гц, 2Н), 13,51 (с, 1Н).

Пример 5-35а: Метил-4-(N-(4-метоксифенил)сульфамоил)бензоат

К 4-метоксибензоламину (580 мг, 4,71 ммоль) и триэтиламину (1,48 мл, 10,7 ммоль) в дихлорметане (10 мл) добавляли метил-4-(хлорсульфонил)бензоат (1,00 г, 4,28 ммоль). Эту смесь перемешивали в течение 16 часов при комнатной температуре. Реакционную смесь разбавляли дихлорметаном (50 мл) и промывали последовательно водой, 10% лимонной кислотой и соевым раствором. Органические фазы сушили над сульфатом натрия и концентрировали на роторном испарителе. Образовавшееся неочищенное вещество хроматографировали на силикагеле с применением 100% дихлорметана в качестве элюента, получая метил-4-(N-(4-метоксифенил)сульфамоил)бензоат в виде белого кристаллического твердого вещества (400 мг, 30% выход).

Пример 5-36: 4-(N-(3,4-дифторбензил)-N-(4-метоксифенил)сульфамоил)бензойная кислота



Получали как в примере 5-10 из N-(3,4-дифторбензил)(4-метоксифенил)метанамина (пример 5-36a) и метил-4-(хлорсульфонил)бензоата (пример 5-10c). МС (М-Н, 446); ¹Н ЯМР (400 МГц, ДМСО-d₆): δ млн. частот: 3,69 (с, 3Н), 4,20 (с, 4Н), 6,73 (д, J=8,8 Гц, 2Н), 6,93 (м, 2Н), 6,98 (д, J=8,8 Гц, 2Н), 7,22 (м, 1Н), 7,74 (д, J=8,4 Гц, 2Н), 7,99 (д, J=8,4 Гц, 2Н).

Пример 5-36а: N-(3,4-дифторбензил)(4-метоксифенил)метанамин

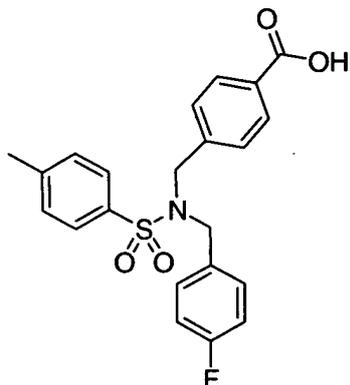
К (4-метоксифенил)метанамину (1,77 мл, 13,6 ммоль) и уксусной кислоте (2,7 мл, 45 ммоль) в дихлорметане (15 мл) добавляли 3,4-дифторбензальдегид (1,0 мл, 9,08 ммоль). Эту смесь нагревали в микроволновой печи при 100°C в течение 15 мин. Реакционную смесь охлаждали до комнатной температуры и порциями добавляли крупнопористую цианборгидридную смолу (9,8 г, 22,7 ммоль). Эту смесь перемешивали при комнатной температуре в течение 16 часов. Смолу отфильтровывали и промывали дихлорметаном, и органические вещества промывали насыщенным бикарбонатом натрия до прекращения газообразования. Органические вещества сушили над сульфатом натрия и концентрировали на роторном испарителе. Образовавшееся неочищенное вещество очищали методом хроматографии на силикагеле с применением градиента метанол-дихлорметан в качестве элюента и получали N-(3,4-дифторбензил)(4-метоксифенил)

метанамин в виде желтоватого масла (1,9 г, 80% выход). МС (М+Н, 264); ¹Н ЯМР (400 МГц, ДМСО-d6): δ, млн. частей: 2,63 (шир.с, 1Н), 3,56 (с, 2Н), 3,61 (с, 2Н), 3,71 (с, 3Н), 6,84 (д, J=8,8 Гц, 2Н), 7,14 (м, 1Н), 7,21 (д, J=8,4 Гц, 2Н), 7,34 (м, 2Н).

Пример 5-37: 4-((N-(4-фторбензил)-4-метилфенилсульфонамидо)метил)бензойная кислота

5

10



15

Получали как в примере 5-11 из 4-(аминометил)фенилкарбоновой кислоты, 4-метилбензол-1-сульфонилхлорида и 4-фторбензилбромида. ¹Н ЯМР (400 МГц, ДМСО-d6): δ, млн. частей: 3,11 (с, 3Н), 4,21 (с, 2Н), 4,24 (с, 2Н), 6,94-7,08 (м, 6Н), 7,40-7,42 (д, 2Н, J=8 Гц), 7,63 (д, 2Н, J=8 Гц), 7,73 (д, 2Н, J=8 Гц).

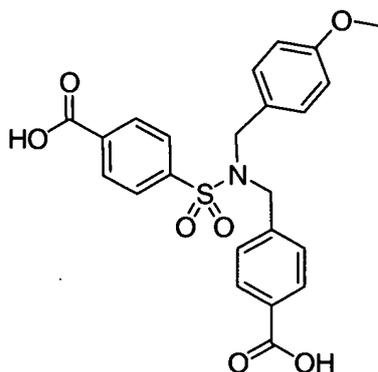
20

IC₅₀ для указанного соединения при ингибировании рецептора горького вкуса hT2R14 составила 0,054 мкМ.

Пример 5-38: 4-((4-карбокси-N-(4-метоксибензил)фенилсульфонамидо)метил)бензойная кислота

25

30



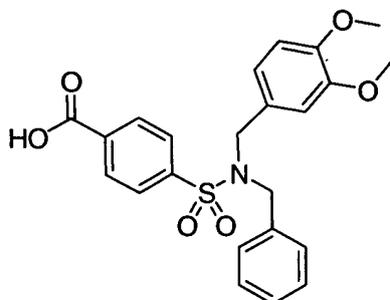
35

Получали как в примере 5-10 из метил-4-(бромметил)бензоата и метил-4-(N-(4-метоксибензил)сульфамоил)бензоата (пример 5-10b). ¹Н ЯМР (400 МГц, ДМСО-d6): δ, млн. частей: 3,65 (с, 3Н), 4,24 (с, 2Н), 4,33 (с, 2Н), 6,71 (д, 2Н, J=8 Гц), 6,95 (д, 2Н, J=8 Гц), 7,14 (д, 2Н, J=8 Гц), 7,73 (д, 2Н, J=8 Гц), 7,89 (д, 2Н, J=8 Гц), 8,06 (д, 2Н, J=8 Гц).

Пример 5-39: 4-(N-бензил-N-(3,4-диметоксибензил)сульфамоил)бензойная кислота

40

45

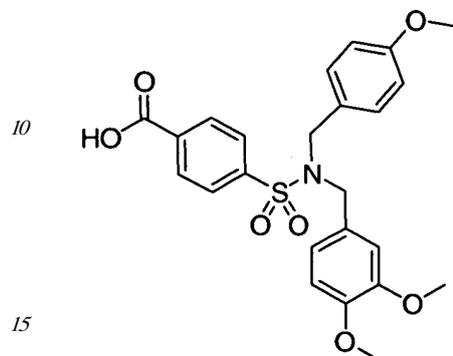


Получали как в примере 5-10 из (3,4-диметоксифенил)метанамин, метил-4-(хлорсульфонил)бензоата (пример 5-10с) и бензилхлорида. МС (М-Н, 440,10); ¹Н ЯМР (400 МГц, CD₃OD): δ, млн. частей: 3,59 (с, 3Н), 3,76 (с, 3Н), 4,30 (с, 2Н), 4,36 (с, 2Н), 6,51

(д, 1H, J=1,7 Гц), 6,60 (м, 1H), 6,76 (д, 1H, J=8,2 Гц), 7,12 (м, 2H), 7,21 (м, 3H), 7,95 (д, 2H, J=8,6 Гц), 8,18 (д, 2H, J=8,6 Гц).

IC₅₀ для указанного соединения при ингибировании рецептора горького вкуса hT2R14 составила 0,678 мкМ.

5 **Пример 5-40: 4-(N-(3,4-диметоксибензил)-N-(4-метоксибензил)сульфамоил)бензойная кислота**

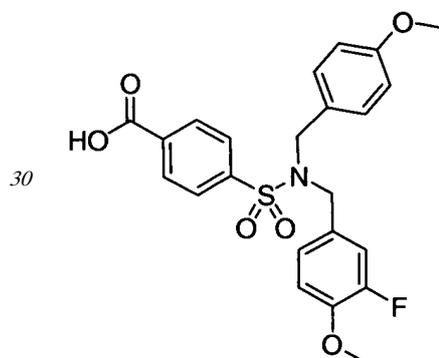


Получали как в примере 5-10 из (3,4-диметоксифенил)метанамина, метил-4-(хлорсульфонил)бензоата (пример 5-10с) и 4-метоксибензилбромида. МС (М-Н, 470,10); ¹H ЯМР (400 МГц, ДМСО-d₆): δ, млн. частей: 3,49 (с, 3H), 3,67 (с, 3H), 3,68 (с, 3H), 4,20 (с, 2H), 4,22 (с, 2H), 6,41 (д, 1H, J=1,4 Гц), 6,58 (дд, 1H, J₁=8,2 Гц, J₂=1,4 Гц), 6,78 (м, 3H), 7,02 (д, 2H, J=8,6 Гц), 7,94 (д, 2H, J=8,4 Гц), 8,09 (д, 2H, J=8,4 Гц).

20

IC₅₀ для указанного соединения при ингибировании рецептора горького вкуса hT2R14 составила 1,47 мкМ.

25 **Пример 5-41: 4-(N-(3-фтор-4-метоксибензил)-N-(4-метоксибензил)сульфамоил)бензойная кислота**

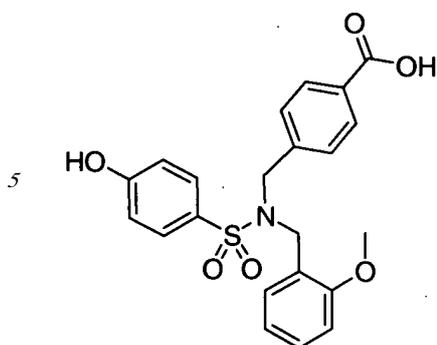


Получали как в примере 5-10 из 4-(бромметил)-2-фтор-1-метоксибензола и метил-4-(N-(4-метоксибензил)сульфамоил)бензоата (пример 5-10b). МС (М-Н, 458,10); ¹H ЯМР (400 МГц, CD₃OD): δ, млн. частей: 3,73 (с, 3H), 3,80 (с, 3H), 4,24 (с, 2H), 4,28 (с, 2H), 6,75 (м, 4H), 6,88 (м, 1H), 6,97 (д, 2H, J=8,6 Гц), 7,88 (д, 2H, J=8,3 Гц), 8,14 (д, 2H, J=8,3 Гц).

40

IC₅₀ для указанного соединения при ингибировании рецептора горького вкуса hT2R14 составила 1,11 мкМ.

45 **Пример 5-42: 4-((4-гидрокси-N-(2-метоксибензил)фенилсульфонамидо)метил)бензойная кислота**



10 4-(N-(2-метоксибензил)сульфамоил)фенилацетат (пример 5-42a) (50 мг, 0,15 ммоль) растворяли в ацетоне (1,0 мл), а затем добавляли карбонат цезия (97 мг, 0,30 ммоль) и метил-4-(бромметил)бензоат (38 мг, 0,17 ммоль). Смесь перемешивали при комнатной температуре в течение ночи и затем неорганические соли отфильтровывали. Ацетон удаляли под вакуумом, и остаток повторно растворяли в этилацетате и промывали

15 водой, а затем солевым раствором. Органическую фазу сушили над сульфатом магния и концентрировали. Неочищенный продукт очищали методом колоночной хроматографии с применением этилацетата/гексана в качестве элюента с получением метил-4-((4-ацетокси-N-(2-метоксибензил)фенилсульфонамидо)метил)бензоата.

Метил-4-((4-ацетокси-N-(2-метоксибензил)фенилсульфонамидо)метил)бензоат (неочищенный) растворяли в ТГФ (1,0 мл) и обрабатывали водным NaOH (1N, 2,0 мл, 2,0 ммоль). Смесь кипятили с обратным холодильником в течение часа. По завершению ТГФ удаляли под вакуумом, и образовавшийся водный раствор подкисляли 6 N водной HCl до pH ~3. Водную фазу экстрагировали EtOAc (2×15 мл) и объединенные органические фазы промывали водой, солевым раствором, сушили над Na₂SO₄ и

25 концентрировали. Неочищенный продукт очищали методом обращенно-фазовой ВЭЖХ с получением 10,8 мг вышеназванного соединения (15% выход в двух стадиях). МС (M+H, 426,1); ¹H ЯМР (400 МГц, ацетон-d₆): δ, млн. частей: 3,65 (с, 3H), 4,37 (с, 2H), 4,43 (с, 2H), 6,79 (м, 2H), 7,01 (д, 2H, J=8,0 Гц), 7,17 (м, 2H), 7,28 (д, 2H, J=7,9 Гц), 7,73 (д, 2H, J=8,0 Гц), 7,87 (д, 2H, J=7,9 Гц).

30 IC₅₀ для указанного соединения при ингибировании рецептора горького вкуса hT2R14 составила 2,56 мкМ.

Пример 5-42a: 4-(N-(2-метоксибензил)сульфамоил)фенилацетат

Раствор 4-(хлорсульфонил)фенилацетата (пример 5-42b) (531 мг, 2,265 ммоль) в 5,0 мл дихлорметана, охлаждали до 0°C на ледяной бане. Добавляли (2-метоксифенил)метанамин (325 мкл, 2,492 ммоль) и триэтиламин (347 мкл, 2,492 ммоль). Затем баню со льдом удаляли, и смесь нагревали до температуры окружающей среды и перемешивали в течение 2 часов. Реакционную смесь концентрировали и очищали неочищенный продукт методом колоночной хроматографии (гексан/этилацетат=90/10-30/70) с получением чистого 4-(N-(2-метоксибензил)сульфамоил)фенилацетата (743 мг, 89%) в виде белого твердого вещества. МС (M+H, 336,1) ¹H ЯМР (400 МГц, CDCl₃): δ, млн. частей: 2,32 (с, 3H), 3,71 (с, 3H), 4,18 (д, 2H, J=5,8 Гц), 5,15 (т, 1H, J=5,8 Гц), 6,71 (д, 1H, J=8,2 Гц), 6,82 (ушир.т, 1H, J=7,4 Гц), 7,07 (ушир.д, 1H, J=7,4 Гц), 7,10 (д, 2H, J=8,7 Гц), 7,19 (ушир.т, 1H, J=7,8 Гц), 7,74 (д, 2H, J=8,7 Гц).

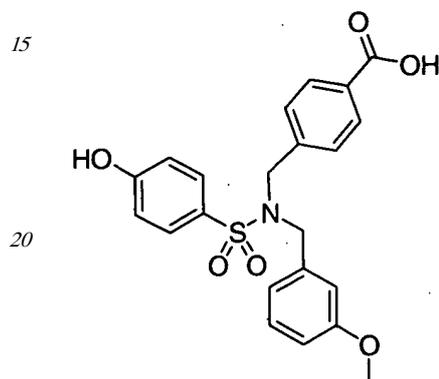
45 **Пример 5-42b: 4-(хлорсульфонил)фенилацетат**

6,285 г (36,08 ммоль) 4-гидроксибензолсульфо кислоты растворяли в смеси 30 мл уксусного ангидрида и 15 мл уксусной кислоты и кипятили с обратным холодильником в течение 6 часов. Летучие компоненты выпаривали и помещали в глубокий вакуум на

в течение ночи. Образовавшийся неочищенный продукт растворяли в 100 мл ДХМ и обрабатывали 4,72 мл оксалилхлорида (54,12 ммоль) и 139 мкл ДМФ (1,804 ммоль) при 0°C. Продолжали перемешивание до прекращения выделения газа, затем реакционную смесь концентрировали и повторно растворяли в EtOAc. Органическую фазу промывали дважды 2 N H₂SO₄ и сушили с помощью солевого раствора и MgSO₄. После концентрирования получали 7,067 г 4-(хлорсульфонил)фенилацетата в виде темного густого масла, которое со временем затвердевало (83% выход в двух стадиях).

¹H-ЯМР (400 МГц, CDCl₃): δ, млн. частей: 2,35 (с, 3H), 7,37 (д, 2H, J=8,9 Гц), 8,06 (д, 2H, J=8,9 Гц). ¹³C-ЯМР (100 МГц, CDCl₃): δ, млн. частей: 21,13, 123,05, 128,91, 141,15, 155,80, 168,29.

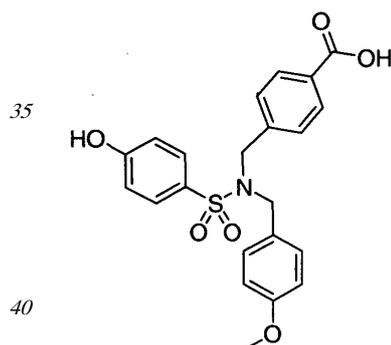
Пример 5-43: 4-((4-гидрокси-N-(3-метоксибензил)фенилсульфонамидо)метил)бензойная кислота



25 Получали как в примере 5-42 из (3-метоксифенил)метанамина и метил-4-(бромметил)бензоата. МС (М-Н, 426,10); ¹H ЯМР (400 МГц, ацетон-d₆): δ, млн. частей: 3,66 (с, 3H), 4,32 (с, 2H), 4,40 (с, 2H), 6,65 (ушир.с, 1H), 6,73 (м, 2H), 7,05 (д, 2H, J=8,5 Гц), 7,12 (т, 1H, J=8,0 Гц), 7,27 (д, 2H, J=8,0 Гц), 7,82 (д, 2H, J=8,5 Гц), 7,88 (д, 2H, J=8,0 Гц).

30 IC₅₀ для указанного соединения при ингибировании рецептора горького вкуса hT2R14 составила 0,188 мкМ.

Пример 5-44: 4-((4-гидрокси-N-(4-метоксибензил)фенилсульфонамидо)метил)бензойная кислота

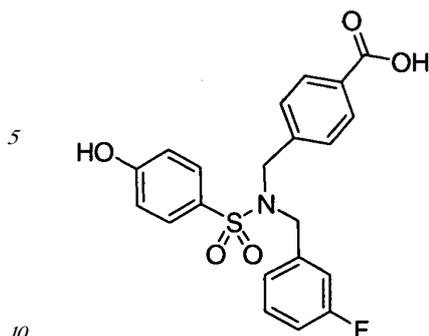


45 Получали как в примере 5-42 из (4-метоксифенил)метанамина и метил-4-(бромметил)бензоата. МС (М-Н, 426,10); ¹H ЯМР (400 МГц, ацетон-d₆): δ, млн. частей: 3,73 (с, 3H), 4,27 (с, 2H), 4,35 (с, 2H), 6,76 (д, 2H, J=8,0 Гц), 7,04 (д, 4H), 7,24 (д, 2H, J=7,8 Гц), 7,79 (д, 2H, J=8,2 Гц), 7,88 (д, 2H, J=7,8 Гц).

IC₅₀ для указанного соединения при ингибировании рецептора горького вкуса hT2R14 составила 3,43 мкМ.

Пример 5-45: 4-((N-(3-фторбензил)-4-гидроксифенилсульфонамидо)метил)бензойная

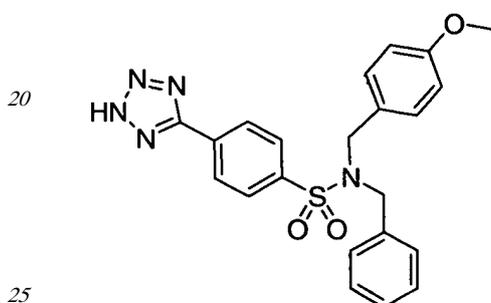
кислота



Получали как в примере 5-42 из (3-фторфенил)метанамина и метил-4-(бромметил)бензоата. МС (М+Н, 414,1), ¹Н ЯМР (400 МГц, ацетон-d6): δ, млн. частей: 4,37 (с, 2Н), 4,42 (с, 2Н), 6,94 (м, 3Н), 7,06 (д, 2Н, J=8,3 Гц), 7,21 (м, 1Н), 7,28 (д, 2Н, J=7,6 Гц), 7,81 (д, 2Н, J=8,3 Гц), 7,87 (д, 2Н, J=7,6 Гц).

15 IC₅₀ для указанного соединения при ингибировании рецептора горького вкуса hT2R14 составила 0,459 мкМ.

Пример 5-46: N-бензил-N-(4-метоксибензил)-4-(1H-тетразол-5-ил)бензол-сульфонамид



N-бензил-4-циано-N-(4-метоксибензил)бензолсульфонамид (пример 5-46а, 400 мг, 1 ммоль) и азид триметилолова (400 мг, 2 ммоль) растворяли в толуоле (10 мл) и подвергали действию микроволнового излучения при 150°C в течение 3 часов. Добавляли дополнительные 2 эквивалента азид триметилолова и реакцию смесь подвергали действию микроволнового излучения при 150°C в течение еще 3 часов. Смесь охлаждали и фильтровали с получением неочищенного тетразола олова, которое гидролизовали в МЕОН/концентрированная НСl (50 мл: 20 мл). Добавляли воду и образовавшийся осадок собирали с помощью фильтрования. Продукт перекристаллизовывали из абсолютного этанола и воды с получением N-бензил-N-(4-метоксибензил)-4-(1H-тетразол-5-ил)бензол-сульфонамида в виде белого твердого вещества. МС (М+Н, 436,10); ¹Н ЯМР (400 МГц, ДМСО-d6): δ, млн. частей: 3,65 (с, 3Н), 4,27 (с, 2Н), 4,30 (с, 2Н), 6,75 (д, J=8,4 Гц, 2Н), 6,98 (д, J=8,4 Гц, 2Н), 7,08 (м, 2Н), 7,20 (м, 3Н), 8,05 (д, J=8,4 Гц, 2Н), 8,22 (д, J=9,2 Гц, 2Н).

40 IC₅₀ для указанного соединения при ингибировании рецептора горького вкуса hT2R14 составила 3,67 мкМ.

Пример 5-46а: N-бензил-4-циано-N-(4-метоксибензил)бензолсульфонамид

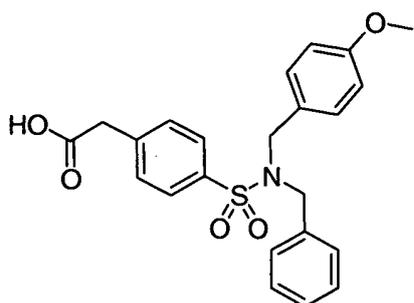
4-Цианобензол-1-сульфонилхлорид (600 мг, 3 ммоль) добавляли к раствору N-бензил-1-(4-метоксифенил)метанамина (пример 5-46б, 750 мг, 3,3 ммоль) и триэтиламина (500 мг, 3,6 ммоль) в дихлорметане (15 мл). Реакционную смесь перемешивали при температуре окружающей среды в течение 4 часов, затем концентрировали на роторном испарителе. Неочищенное вещество очищали на силикагеле с получением N-бензил-4-циано-N-(4-метоксибензил)бензол-сульфонамида в виде белого твердого вещества. ¹Н ЯМР (400 МГц, ДМСО-d6): δ, млн. частей: 3,68 (с, 3Н), 4,26 (с, 2Н), 4,31 (с, 2Н), 6,75 (д,

J=8,4 Гц, 2Н), 6,97 (д, J=9,2 Гц, 2Н), 7,07 (м, 2Н), 7,21 (м, 3Н), 7,98 (д, J=8,4 Гц, 2Н), 8,04 (д, J=8,8 Гц, 2Н).

Пример 5-46b: N-бензил-1-(4-метоксифенил)метанамин

4-Метоксибензальдегид (5 г, 35 ммоль) и бензиламин (3,8 г, 35 ммоль) добавляли к триацетоксиборгидриду натрия (10,4 г, 49 ммоль) в дихлорэтане (125 мл). Реакционную смесь перемешивали при температуре окружающей среды 2 часа, затем концентрировали. Смесь разбавляли дихлорметаном (200 мл), промывали насыщенным водным раствором бикарбоната натрия (200 мл), соевым раствором (200 мл) и сушили над сульфатом магния. Неочищенный амин концентрировали и очищали методом хроматографии на силикагеле (70% этилацетат в гексане) с получением N-бензил-1-(4-метоксифенил)метанамина в виде масла. ¹Н ЯМР (400 МГц, ДМСО-d₆): δ, млн. частей: 3,59 (с, 2Н), 3,64 (с, 2Н), 3,71 (с, 3Н), 6,86 (д, J=8,8 Гц, 2Н), 7,28 (м, 7Н).

Пример 5-47: 2-(4-(N-бензил-N-(4-метоксибензил)сульфамойл)фенил)уксусная кислота

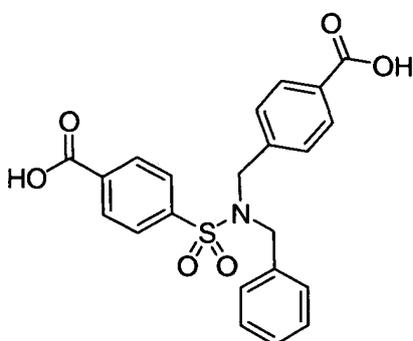


Получали как в примере 5-27 из метил-2-(4-(хлорсульфонил)фенил)ацетата (пример 5-47a), 4-метоксибензальдегида и бензиламина. МС (М-Н, 424,10); ¹Н ЯМР (400 МГц, ДМСО-d₆): δ, млн. частей: 3,66 (с, 3Н), 3,72 (с, 2Н), 4,18 (с, 2Н), 4,22 (с, 2Н), 6,73 (д, J=8,4 Гц, 2Н), 6,91 (д, J=8,4 Гц, 2Н), 7,02 (м, 2Н), 7,19 (м, 3Н), 7,49 (д, J=8,4 Гц, 2Н), 7,80 (д, J=8 Гц, 2Н).

Пример 5-47a: Метил-2-(4-(хлорсульфонил)фенил)ацетат

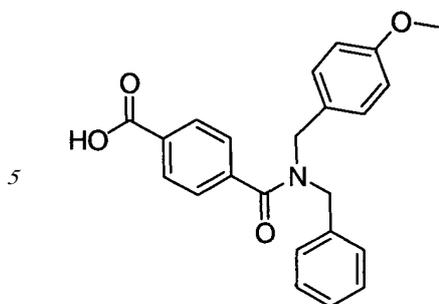
2-(4-(Хлорсульфонил)фенил)уксусную кислоту (600 мг, 2,6 ммоль) добавляли к тионилхлориду (3 мл) и нагревали при 80°C в течение 1 часа. Реакционную смесь концентрировали, охлаждали до 0°C на ледяной бане и добавляли по каплям ледяной метанол. Смесь перемешивали в течение 30 минут и концентрировали с получением метил-2-(4-(хлорсульфонил)фенил)ацетата в виде масла. ¹Н ЯМР (400 МГц, ДМСО-d₆): δ, млн. частей: 3,57 (с, 3Н), 3,65 (с, 2Н), 7,21 (д, J=8 Гц, 2Н), 7,55 (д, J=8 Гц, 2Н).

Пример 5-48: 4-(N-бензил-4-карбоксифенилсульфонамидо)метилбензойная кислота



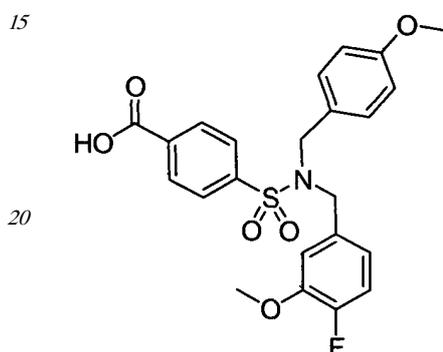
Получали как в примере 5-10 из метил-4-(хлорсульфонил)бензоата (пример 5-10с), бензиламина и метил-4-(бромметил)бензоата. МС (М+Н, 426,10); ¹Н ЯМР (400 МГц, ДМСО-d₆): δ, млн. частей: 4,29 (с, 2Н), 4,34 (с, 2Н), 7,03 (м, 2Н), 7,12 (м, 2Н), 7,68 (д, J=8 Гц, 2Н), 7,94 (д, J=8,8 Гц, 2Н), 8,06 (д, J=8,8 Гц, 2Н), 13,03 (с, 2Н).

Пример 5-49: 4-(бензил(4-метоксибензил)карбамоил)бензойная кислота



10 Получали как в примере 5-27 из 4-(хлоркарбонил)бензоата и N-бензил-1-(4-метоксифенил)метанамина. ¹H ЯМР (400 МГц, ДМСО-d₆): δ, млн. частей: 3,72 (д, J=7,6 Гц, 3H), 4,26 (с, 1H), 4,30 (с, 1H), 4,50 (с, 1H), 4,55 (с, 1H), 6,89 (м, 2H), 7,02 (м, 1H), 7,10 (м, 1H), 7,10 (м, 1H), 7,20 (м, 1H), 7,28 (м, 4H), 7,55 (м, 2H), 7,96 (м, 2H), 13,13 (с, 1H).

15 **Пример 5-50: 4-(N-(4-фтор-3-метоксибензил)-N-(4-метоксибензил)сульфамойл)бензойная кислота**



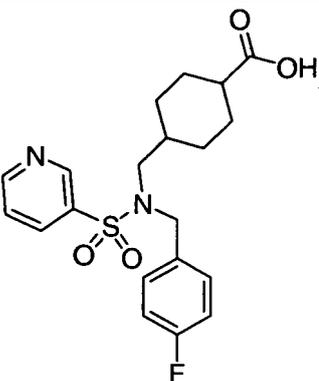
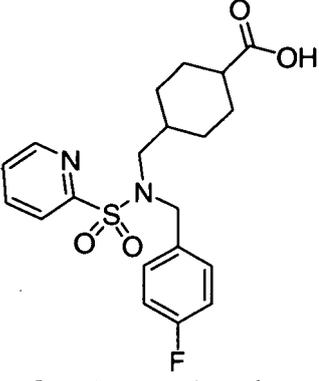
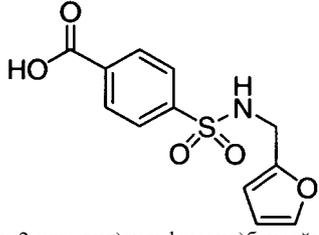
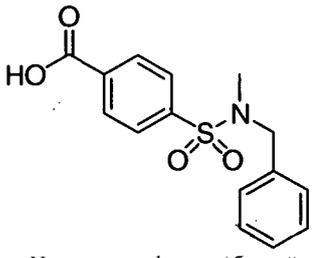
25 Получали как в примере 5-10 из 4-(бромметил)-4-фтор-3-метоксибензола и метил-4-(N-(4-метоксибензил)сульфамойл)бензоата (пример 5-10b). МС (М-Н, 458,10); ¹H ЯМР (400 МГц, ДМСО-d₆): δ, млн. частей: 3,59 (с, 3H), 3,67 (с, 3H), 4,25 (с, 2H), 4,25 (с, 2H), 6,62 (м, 2H), 6,77 (д, J=8,4 Гц, 2H), 7,02 (м, 3H), 7,97 (д, J=8 Гц, 2H), 8,01 (д, J=8,8 Гц, 2H), 13,49 (с, 1H).

30 IC₅₀ для указанного соединения при ингибировании рецептора горького вкуса hT2R14 составила 1,65 мкМ.

Дополнительные соединения экспериментально исследовали и обнаружили, что они имеют относительно высокий уровень эффективности в качестве ингибиторов рецептора горького вкуса hT2R14. Результаты этого исследования приведены ниже в таблице С.

35

Таблица С		
№ соединения	Соединение	hT2R14 IC ₅₀ (мкМ)
40 45	<p>5-51</p> <p>4-((N-(4-фторбензил)тиофен-2-сульфонамидо)метил)циклогексанкарбоновая кислота</p>	0,342

<p>5</p> <p>10</p>	<p>5-52</p>  <p>4-((N-(4-фторбензил)пиридин-3-сульфонамидо)метил)циклогексанкарбоновая кислота</p>	<p>8,434</p>
<p>15</p> <p>20</p>	<p>5-53</p>  <p>4-((N-(4-фторбензил)пиридин-2-сульфонамидо)метил)циклогексанкарбоновая кислота</p>	
<p>25</p> <p>30</p>	<p>5-54</p>  <p>4-(N-(фуран-2-илметил)сульфамоил)бензойная кислота</p>	
<p>35</p>	<p>5-55</p>  <p>4-(N-бензил-N-метилсульфамоил)бензойная кислота</p>	
<p>40</p> <p>45</p>	<p>5-56</p>  <p>4-(N-(4-метоксибензил)сульфамоил)бензойная кислота</p>	

5	5-57		3-(N-бензил-N-(4-метоксибензил)сульфамойл)пропановая кислота
10	5-58		2,943
15	5-59		3-(4-(N-бензил-N-(4-метоксибензил)сульфамойл)фенил)пропановая кислота
30	5-60		2-(N-бензил-N-(4-метоксибензил)сульфамойл)бензойная кислота
35	5-61		4-(N-(4-метоксибензил)-N-(тиофен-2-илметил)сульфамойл)бензойная кислота

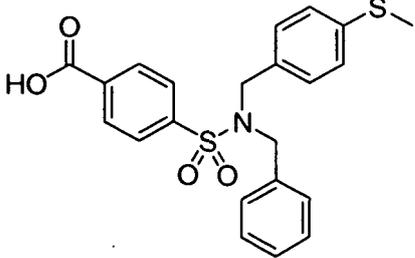
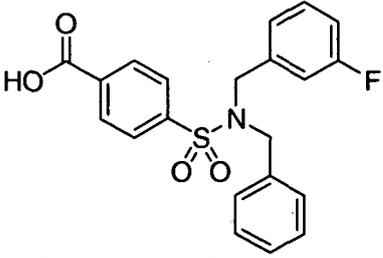
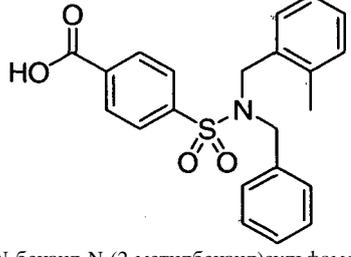
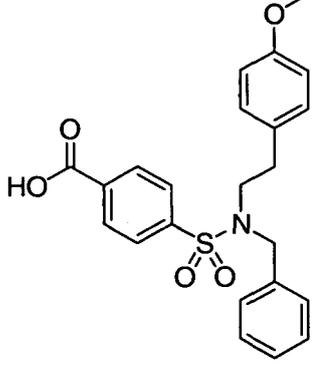
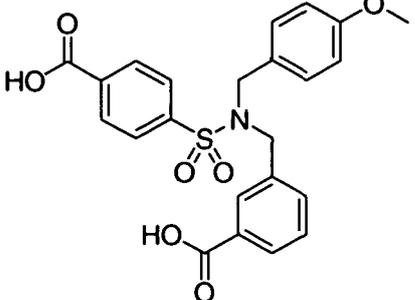
45

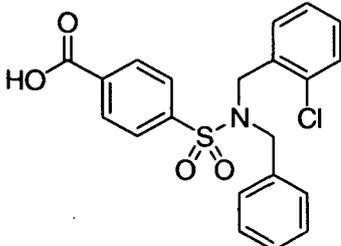
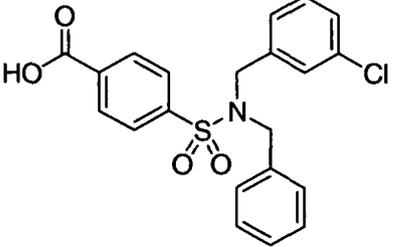
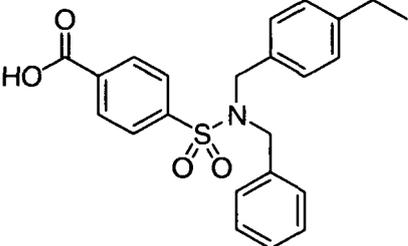
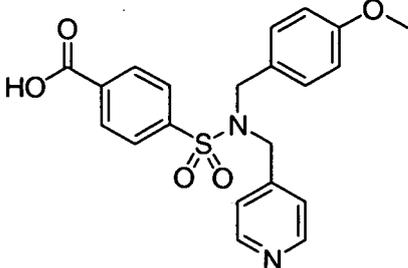
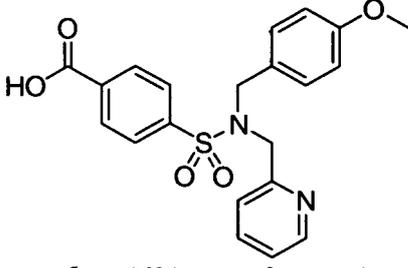
5	5-62		<p>4-(N-(4-метоксибензил)-N-(тиофен-3-илметил)сульфамоил) бензойная кислота</p>
10	5-63		<p>4-(N-(4-метоксибензил)-N-(5-метилфуран-2-ил)метил)сульфамоил)бензойная кислота</p>
20	5-64		<p>4-(N-(4-метоксибензил)-N-(2-метилбензил)сульфамоил) бензойная кислота</p>
25	5-65		<p>4-(N-(4-метоксибензил)-N-(3-метилбензил)сульфамоил) бензойная кислота</p>
30	5-66		<p>4-(N-(4-метоксибензил)-N-(4-метилбензил)сульфамоил) бензойная кислота</p>
35	40		

45

5	5-67		12,141
10	5-68		7,044
15			
20	5-69		8,283
25			
30	5-70		5,394
35			
40	5-71		5,061
45			

5	5-72		6,164
10	5-73		2,290
15		<p>4-(N-бензил-N-(2-фторбензил)сульфамойл) бензойная кислота</p>	
20	5-74		5,991
25		<p>4-(N-бензил-N-(3-метоксибензил)сульфамойл) бензойная кислота</p>	
30	5-75		
35		<p>4-(N-бензил-N-(3-цианобензил)сульфамойл) бензойная кислота</p>	
40	5-76		
45	5-77		3,977
		<p>3-((N-бензил-4-карбоксифенилсульфонамидо) метил)бензойная кислота</p>	
		<p>3-((N-бензил-4-хлорфенилсульфонамидо) метил)бензойная кислота</p>	

	<p>4-(N-бензил-N-(4-хлорбензил)сульфамоил) бензойная кислота</p>	
<p>5 5-78 10</p>	 <p>4-(N-бензил-N-(4-(метилтио)бензил)сульфамоил) бензойная кислота</p>	<p>2,458</p>
<p>15 5-79</p>	 <p>4-(N-бензил-N-(3-фторбензил)сульфамоил) бензойная кислота</p>	<p>2,310</p>
<p>20 5-80 25</p>	 <p>4-(N-бензил-N-(2-метилбензил)сульфамоил) бензойная кислота</p>	<p>2,926</p>
<p>30 5-81 35</p>	 <p>4-(N-бензил-N-(4-метоксифенетил)сульфамоил) бензойная кислота</p>	
<p>40 5-82 45</p>	 <p>3-((4-карбокси-N-(4-метоксибензил) фенилсульфонамидо)метил) бензойная кислота</p>	

5	5-83	 <p>4-(N-бензил-N-(2-хлорбензил)сульфамойл) бензойная кислота</p>	4,486
10	5-84	 <p>4-(N-бензил-N-(3-хлорбензил)сульфамойл) бензойная кислота</p>	4,286
15	5-85	 <p>4-(N-бензил-N-(4-этилбензил)сульфамойл) бензойная кислота</p>	8,580
20	5-86	 <p>4-(N-(4-метоксибензил)-N-(пиридин-4-илметил)сульфамойл) бензойная кислота</p>	
25	5-87	 <p>4-(N-(4-метоксибензил)-N-(пиридин-2-илметил)сульфамойл) бензойная кислота</p>	
30			
35			
40			

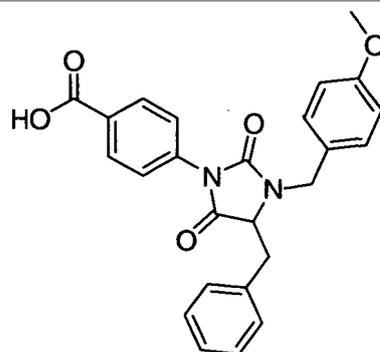
5	5-88		4-(N-(4-метоксибензил)-N-(пиридин-3-илметил)сульфамоил) бензойная кислота
10	5-89		4-(N-бензил-N-(4-метокси-3-метилбензил)сульфамоил) бензойная кислота
15	5-90		4-(N-бензил-N-((6-метоксипиридин-3-ил)метил)сульфамоил) бензойная кислота
20	5-91		4-(N-бензил-N-(4-цианобензил)сульфамоил) бензойная кислота
25	5-92		4-(N-бензил-N-(2-цианобензил)сульфамоил) бензойная кислота
30		1,995	3,258
35		1,848	4,627

45

5	5-93		2,167
10	5-94		
15	5-95		1,397
20	5-96		2,415
35	5-97		
40	5-97		
45			

5

5-98

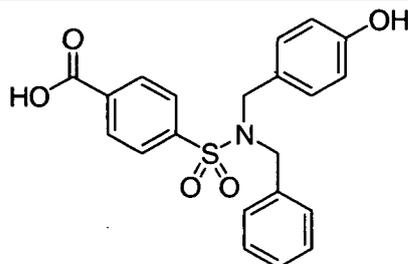


4-(4-бензил-3-(4-метоксибензил)-2,5-диоксоимидазолидин-1-ил)бензойная кислота

10

15

5-99



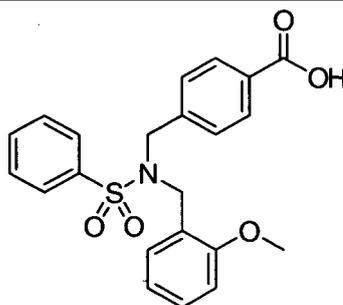
4-(N-бензил-N-(4-гидроксибензил)сульфамоил)бензойная кислота

5,207

20

25

5-100



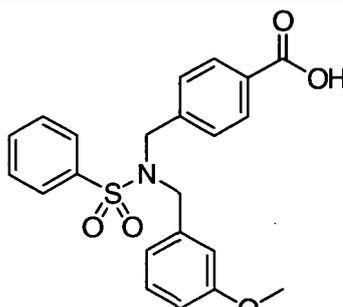
4-((N-(2-метоксибензил)фенилсульфонамидо)метил)бензойная кислота

1,294

30

35

5-101

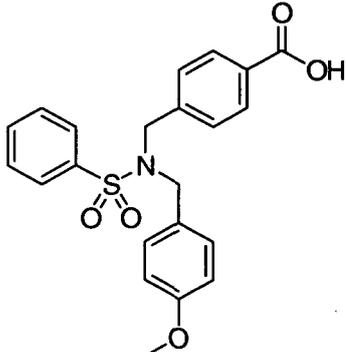
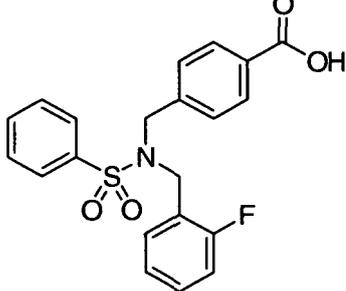
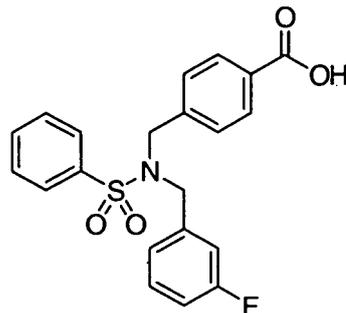
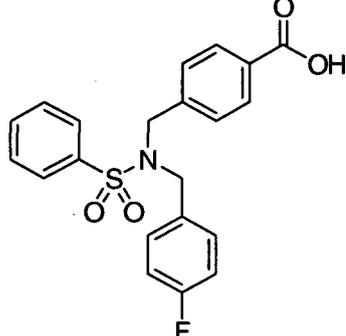
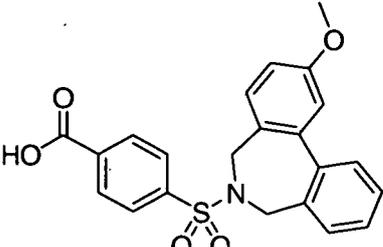


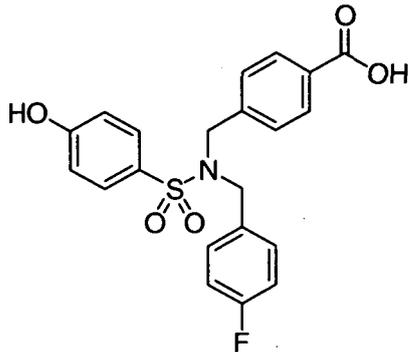
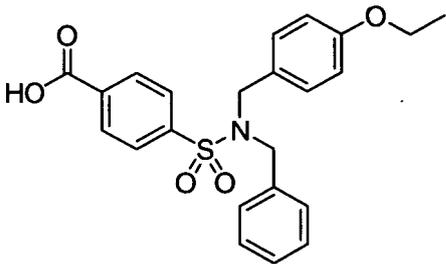
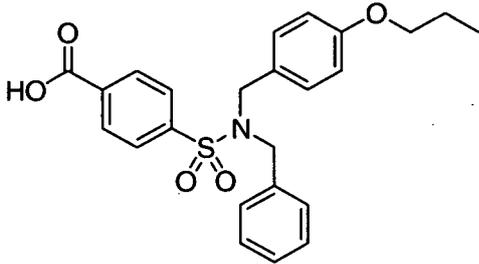
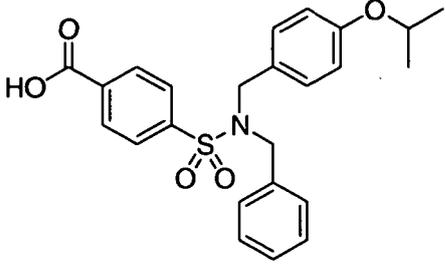
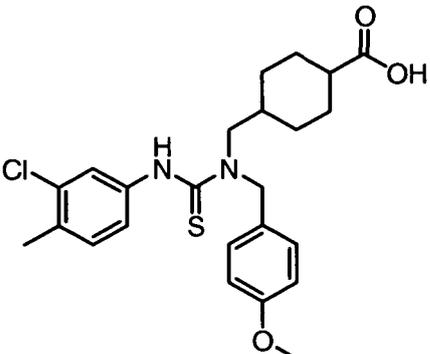
4-((N-(3-метоксибензил)фенилсульфонамидо)метил)бензойная кислота

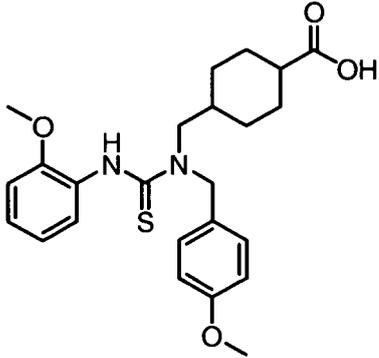
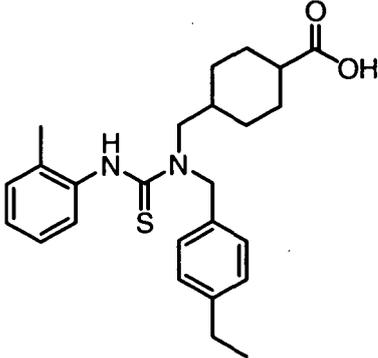
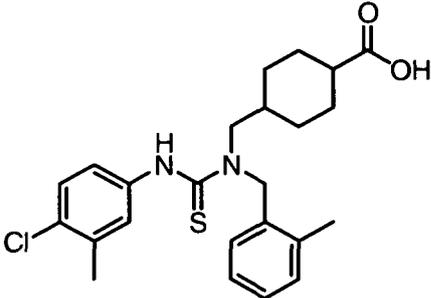
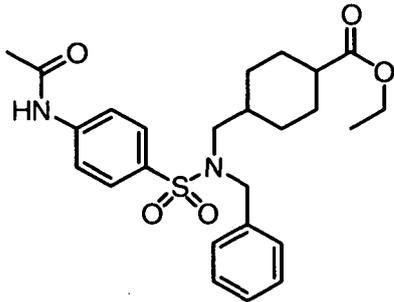
0,345

40

45

<p>5</p> <p>10</p>	<p>5-102</p>  <p>4-((N-(4-метоксибензил) фенилсульфонамидо)метил) бензойная кислота</p>	<p>2,219</p>
<p>15</p> <p>20</p>	<p>5-103</p>  <p>4-((N-(2-фторбензил)фенилсульфонамидо)метил)бензойная кислота</p>	<p>0,429</p>
<p>25</p> <p>30</p>	<p>5-104</p>  <p>4-((N-(3-фторбензил)фенилсульфонамидо)метил)бензойная кислота</p>	<p>0,406</p>
<p>35</p> <p>40</p>	<p>5-105</p>  <p>4-((N-(4-фторбензил)фенилсульфонамидо)метил)бензойная кислота</p>	<p>0,935</p>
<p>45</p>	<p>5-106</p> 	

	<p>4-(2-метокси-5Н-дibenzo[с,е]азепин-6(7Н)-илсульфонил)бензойная кислота</p>	
<p>5 10</p>	<p>5-107</p>  <p>4-((N-(4-фторбензил)-4-гидроксифенилсульфонамидо)метил)бензойная кислота</p>	<p>4,086</p>
<p>15 20</p>	<p>5-108</p>  <p>4-(N-бензил-N-(4-этоксibenзил)сульфамоил)бензойная кислота</p>	
<p>25 30</p>	<p>5-109</p>  <p>4-(N-бензил-N-(4-пропоксибензил)сульфамоил)бензойная кислота</p>	
<p>35 40</p>	<p>5-110</p>  <p>4-(N-бензил-N-(4-изопропоксибензил)сульфамоил)бензойная кислота</p>	
<p>45</p>	<p>5-111</p>  <p>4-((3-(3-хлор-4-метилфенил)-1-(4-метоксибензил)тиоуреидо)метил)циклогексанкарбоновая кислота</p>	<p>6,136</p>

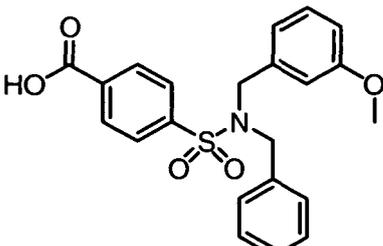
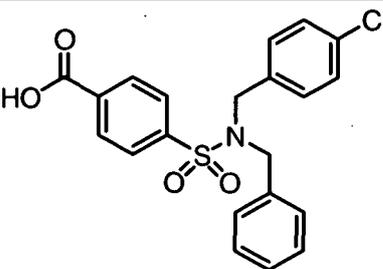
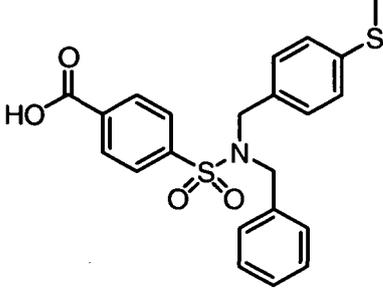
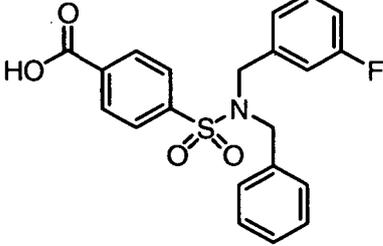
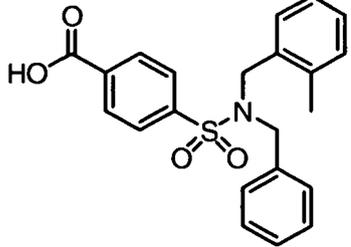
<p>5</p> <p>10</p>	 <p>5-112</p> <p>4-((1-(4-метоксибензил)-3-(2-метоксифенил)тиоуреидо)метил)циклогексанкарбоновая кислота</p>	<p>8,852</p>
<p>15</p> <p>20</p>	 <p>5-113</p> <p>4-((1-(4-этилбензил)-3-о-толилтиоуреидо)метил)циклогексанкарбоновая кислота</p>	<p>5,018</p>
<p>25</p> <p>30</p>	 <p>5-114</p> <p>4-((3-(4-хлор-3-метилфенил)-1-(2-метилбензил)тиоуреидо)метил)циклогексанкарбоновая кислота</p>	<p>4,872</p>
<p>35</p> <p>40</p>	 <p>5-115</p> <p>этил 4-((4-ацетамино-N-бензилфенилсульфонамидо)метил)циклогексанкарбоксилат</p>	<p>0,334</p>

5	5-116		2,567
10		<p>этил 4-((N-(3-бромбензил)-2,3-дигидробензо[b][1,4]диоксин-6-сульфонамидо)метил) циклогексанкарбоксилат</p>	
15	5-117		2,816
20		<p>этил 4-((N-(2-хлорбензил)-4-метилфенилсульфонамидо)метил) циклогексанкарбоксилат</p>	
25	5-118		2,344
30		<p>этил 4-((N-бензил-4-бромфенилсульфонамидо)метил) циклогексанкарбоксилат</p>	
35	5-119		0,672
40		<p>этил 4-((N-бензил-4-хлорфенилсульфонамидо)метил) циклогексанкарбоксилат</p>	
45	5-120		0,394
		<p>4-((N-бензил-4-хлорфенилсульфонамидо)метил) бензойная кислота</p>	

5	5-121		2,943
10	5-122		2,219
15	5-123		0,092
20	5-124		0,842
25	5-125		1,651
30	5-125	<p>4-((4-амино-N-(4-фторбензил)фенилсульфонамидо)метил)циклогексанкарбоновая кислота</p>	1,651

5	5-126		0,109
10		<p>4-((4-метил-N-(4-метилбензил)фенилсульфонамидо)метил)циклогексанкарбоновая кислота</p>	
15	5-127		0,499
20		<p>4-((N-(4-цианобензил)-4-метилфенилсульфонамидо)метил)циклогексанкарбоновая кислота</p>	
25	5-128		0,036
30		<p>4-((N-(3-метоксибензил)-4-метилфенилсульфонамидо)метил)циклогексанкарбоновая кислота</p>	
35	5-129		5,316
40		<p>4-(N-(4-метоксибензил)-N-(2-метилбензил)сульфамоил)бензойная кислота</p>	

5	5-130		7,044
10	5-131		8,283
15	5-132		5,394
20	5-133		5,061
25	5-134		6,164
30	5-135		2,290
40			
45			

	4-(N-бензил-N-(3-метилбензил)сульфамоил) бензойная кислота	
5	 <p>5-136</p>	5,991
10	4-(N-бензил-N-(3-метоксибензил)сульфамоил) бензойная кислота	
15	 <p>5-137</p>	3,977
20	4-(N-бензил-N-(4-хлорбензил)сульфамоил) бензойная кислота	
25	 <p>5-138</p>	2,458
30	4-(N-бензил-N-(4-метилтио)бензил)сульфамоил) бензойная кислота	
35	 <p>5-139</p>	2,310
40	4-(N-бензил-N-(3-фторбензил)сульфамоил) бензойная кислота	
45	 <p>5-140</p>	2,926
	4-(N-бензил-N-(2-метилбензил)сульфамоил) бензойная кислота	

5	5-141		4,486
10	5-142		4,286
15	5-143		8,580
20	5-144		1,995
25	5-145		3,258
30			
35			
40			
45			

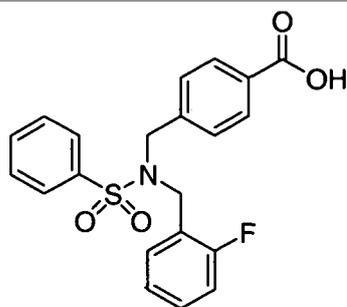
5	5-146		1,848
10	5-147		4,627
15	5-148		2,167
20	5-149		1,397
35	5-150		2,415
40	5-150	<p>4-(N-(4-метоксибензил)-N-(1,2,3,4-тетрагидронафталин-1-ил)сульфамойл)бензойная кислота</p>	2,415

5	5-151		5,207
10	5-152		1,294
15			
20			
25	5-153		0,345
30			
35	5-154		2,219
40			

45

5

5-155

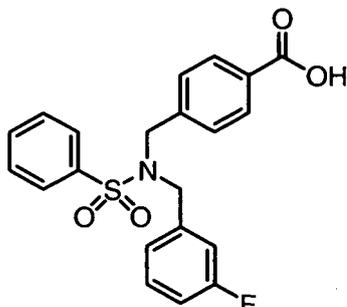


0,429

4-((N-(2-фторбензил)фенилсульфонамидо)метил)бензойная кислота

10

5-156

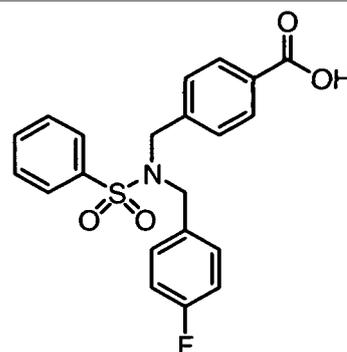


0,406

4-((N-(3-фторбензил)фенилсульфонамидо)метил)бензойная кислота

20

5-157

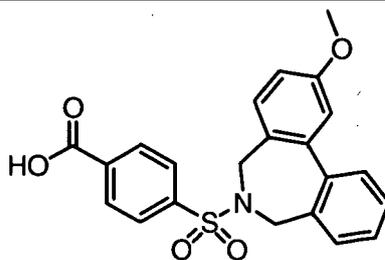


0,935

4-((N-(4-фторбензил)фенилсульфонамидо)метил)бензойная кислота

30

5-158

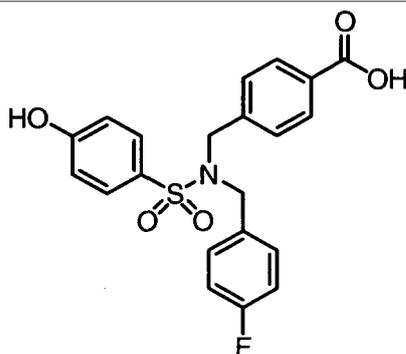


3,571

4-(2-метокси-5Н-дibenzo[с,е]азепин-6(7Н)-илсульфонил)бензойная кислота

35

5-159



4,086

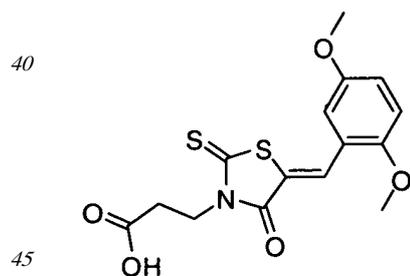
4-((N-(4-фторбензил)-4-гидроксифенилсульфонамидо)метил)бензойная кислота

40

45

5	5-160		1,255
10		4-(N-(2,4-дифторбензил)-N-(4-метоксибензил)сульфамоил) бензойная кислота	
15	5-161		6,267
20		4-(3-(4-метоксифенил)-3,4-дигидроизохинолин-2(1H)-илсульфонил)бензойная кислота	
25	5-162		9,616
30		4-(6-метокси-1-фенил-3,4-дигидроизохинолин-2(1H)-илсульфонил)бензойная кислота	
35	5-163		2,879
35		4-(7-метокси-1-фенил-3,4-дигидроизохинолин-2(1H)-илсульфонил)бензойная кислота	

Пример 6-1: (Z)-3-(5-(2,5-диметоксибензилиден)-4-оксо-2-тиоксотиазолидин-3-ил)пропановая кислота

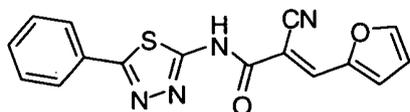


3-(4-Оксо-2-тиоксотиазолидин-3-ил)пропановую кислоту (200 мг, 1 ммоль), 2,5-диметоксибензальдегид (168 мг, 1 ммоль) и пиперидин (0,3 мл) смешивали в этаноле (3 мл) и подвергали действию микроволнового излучения при 100°C в течение 10 минут.

Реакционную смесь охлаждали, твердое вещество собирали с помощью фильтрования, промывали этилацетатом/гексаном (1/1) и перекристаллизовывали из этанола с получением 85% выхода вышеназванного соединения (309 мг, коричнево-оранжевое твердое вещество). МС (М+Н, 284); ¹Н ЯМР (400 МГц, ДМСО-d₆): δ, млн. частот: 2,57 (т, 2Н), 3,74 (с, J=6,8 Гц, 3Н), 3,84 (с, 3Н), 4,19 (т, 2Н), 6,90 (с, 1Н), 7,10 (с, 2Н), 7,86 (с, 1Н).

IC₅₀ для указанного соединения при ингибировании рецептора горького вкуса hT2R14 составила 2,75 мкМ.

Пример 6-2: (Е)-2-циано-3-(фуран-2-ил)-N-(5-фенил-1,3,4-тиадиазол-2-ил)акриламид

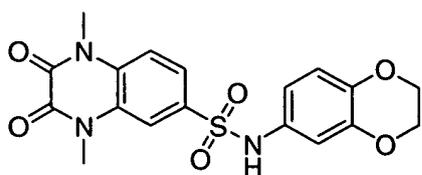


5-Фенил-1,3,4-тиадиазол-2-амин (600 мг, 3,3 ммоль), цианоуксусную кислоту (300 мг, 3,6 ммоль) и EDC-HCl (861 мг, 4,5 ммоль) перемешивали в ацетонитриле (15 мл) при комнатной температуре в течение 2 часов. Смесь разбавляли водным 1N HCl и экстрагировали водную фазу этилацетатом. Объединенные органические экстракты сушили над сульфатом натрия, фильтровали и концентрировали под вакуумом. Остаток растирали в порошок с этилацетатом/гексаном (1/9) с получением 2-циано-N-(5-фенил-1,3,4-тиадиазол-2-ил)ацетамида в виде белого твердого вещества, которое применяли без дополнительной очистки.

312 мг 2-циано-N-(5-фенил-1,3,4-тиадиазол-2-ил)ацетамида и 150 мкл фуран-2-карбальдегида смешивали в 2,5 мл ДМФ и нагревали в микроволновой печи при 150°C в течение 15 мин. Добавляли 5 мл H₂O и образовавшийся осадок собирали и промывали водой (4×) с получением неочищенного продукта. Перекристаллизация из этанола позволяла получить 180 мг чистого продукта в виде коричневого твердого вещества. МС (М+Н, 323); ¹Н ЯМР (400 МГц, ДМСО-d₆): δ, млн. частот: 6,82 (м, 1Н), 7,43 (д, 1Н), 7,49 (м, 4Н), 7,87 (м, 2Н), 8,15 (с, 1Н), 8,22 (ушир.с, 1Н).

IC₅₀ для указанного соединения при ингибировании рецептора горького вкуса hT2R14 составила 0,499 мкМ.

Пример 6-3: N-(2,3-дигидробензо[b][1,4]диоксин-6-ил)-1,4-диметил-2,3-диоксо-1,2,3,4-тетрагидрохиноксалин-6-сульфонамид



1,4-Диметил-2,3-диоксо-1,2,3,4-тетрагидрохиноксалин-6-сульфонилхлорид (пример 6-3а, 450 мг, 1,6 ммоль) добавляли при перемешивании к раствору 2,3-дигидробензо[b][1,4]диоксин-6-амина (215 мг, 1,4 ммоль) и триэтиламина (170 мг, 1,7 ммоль) в дихлорметане (10 мл). Реакционную смесь перемешивали при температуре окружающей среды в течение ночи, затем концентрировали. Неочищенный продукт очищали методом хроматографии на силикагеле (0-30% этилацетат в гексане) с получением N-(2,3-дигидробензо[b][1,4]диоксин-6-ил)-1,4-диметил-2,3-диоксо-1,2,3,4-тетрагидрохиноксалин-6-сульфонамида в виде белого твердого вещества. МС (М+Н, 404,10); ¹Н ЯМР (400 МГц, ДМСО-d₆): δ, млн. частот: 3,47 (с, 3Н), 3,49 (с, 3Н), 4,12 (м, 4Н), 6,55 (м, 1Н), 6,61 (д, J=2,4 Гц, 1Н), 6,69 (д, J=8,4 Гц, 1Н), 7,53 (м, 1Н), 7,59 (д, J=2 Гц, 1Н), 10,00 (с, 1Н).

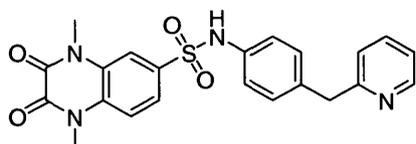
IC₅₀ для указанного соединения при ингибировании рецептора горького вкуса составила hT2R14 7,71 мкМ.

Пример 6-3а: 1,4-диметил-2,3-диоксо-1,2,3,4-тетрагидрохиноксалин-6-сульфонилхлорид

Хлорсульфоновую кислоту (3 мл) нагревали до 65°C и добавляли порциями 1,4-диметилхиноксалин-2,3(1Н,4Н)-дион (пример 6-3б, 1 г, 5,5 ммоль) на протяжении 0,5 часа. Реакционную смесь перемешивали в течение 4 часов, затем охлаждали до температуры окружающей среды и медленно выливали на лед. Образовавшийся осадок фильтровали и промывали водой с получением 1,4-диметил-2,3-диоксо-1,2,3,4-тетрагидрохиноксалин-6-сульфонилхлорида в виде белого твердого вещества. ¹Н ЯМР (400 МГц, ДМСО-d₆): δ, млн. частот: 3,50 (с, 6Н), 7,25 (м, 2Н), 7,38 (м, 4Н).

Пример 6-3б: 1,4-диметилхиноксалин-2,3(1Н,4Н)-дион

К раствору NaH (2,5 г) в ДМФ (200 мл) добавляли порциями хиноксалин-2,3(1Н,4Н)-дион (5 г), а затем медленно добавляли метилйодид (3,8 мл). Реакционную смесь перемешивали при температуре окружающей среды в течение 4 часов, затем добавляли воду (200 мл). Образовавшийся осадок собирали с помощью фильтрования и промывали водой с получением 1,4-диметилхиноксалин-2,3(1Н,4Н)-диона в виде белого твердого вещества при 95% выходе. ¹Н ЯМР (400 МГц, ДМСО-d₆): δ, млн. частот: 3,50 (с, 6Н), 7,25 (м, 2Н), 7,38 (м, 4Н).

Пример 6-4: 1,4-диметил-2,3-диоксо-N-(4-(пиридин-2-илметил)фенил)-1,2,3,4-тетрагидрохиноксалин-6-сульфонамид

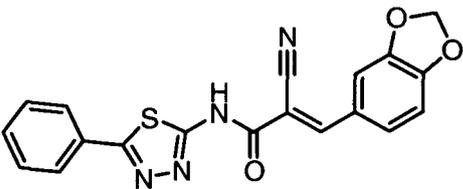
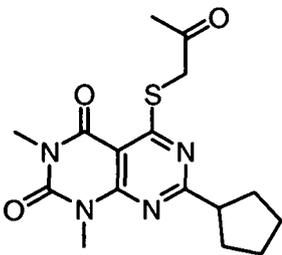
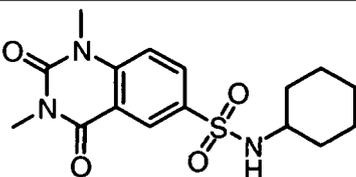
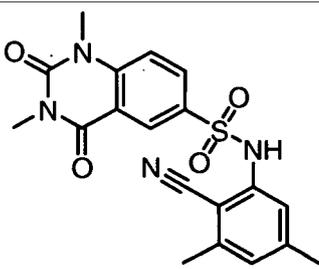
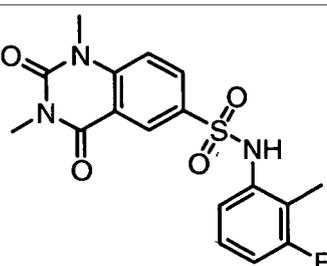
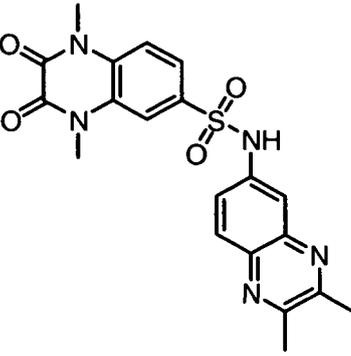
Соединение является коммерчески доступным и было приобретено через компанию Ryan Scientific.

IC₅₀ для указанного соединения при ингибировании рецептора горького вкуса hT2R14 составила 6,14 мкМ.

Дополнительные соединения экспериментально исследовали и обнаружили, что они имеют сравнительно высокий уровень эффективности в качестве ингибиторов рецептора горького вкуса hT2R14. Результаты этого исследования приведены ниже в таблице D.

№ соединения	Соединение	hT2R14 IC ₅₀ (мкМ)
6-5	 N-(бензо[d][1,3]диоксол-5-ил)-1,3-диметил-2,4-диоксо-1,2,3,4-тетрагидрохиназолин-6-сульфонамид	0,264
6-6	 N-(2,3-дигидробензо[b][1,4]диоксин-6-ил)-1,3-диметил-2,4-диоксо-1,2,3,4-тетрагидрохиназолин-6-сульфонамид	0,706

5	6-7		0,935
10	6-8		
15	6-9		1,726
20	6-10		12,623
25	6-11		14,926
35	6-12		9,371
40	6-13		5,378
45			

5	6-14	 <p>(E)-3-(бензо[d][1,3]диоксол-5-ил)-2-циано-N-(5-фенил-1,3,4-тиадiazол-2-ил)акриламид</p>	2,906
10	6-15	 <p>7-циклопентил-1,3-диметил-5-(2-оксопропилтио)пиримидо[4,5-d]пиримидин-2,4(1H,3H)-дион</p>	5,428
15	6-16	 <p>N-циклогексил-1,3-диметил-2,4-диоксо-1,2,3,4-тетрагидрохиназолин-6-сульфонамид</p>	7,239
20	6-17	 <p>N-(2-циано-3,5-диметилфенил)-1,3-диметил-2,4-диоксо-1,2,3,4-тетрагидрохиназолин-6-сульфонамид</p>	1,946
30	6-18	 <p>N-(3-фтор-2-метилфенил)-1,3-диметил-2,4-диоксо-1,2,3,4-тетрагидрохиназолин-6-сульфонамид</p>	0,935
35	6-19	 <p>N-(2,3-диметилхиноксалин-6-ил)-1,4-диметил-2,3-диоксо-1,2,3,4-тетрагидрохиноксалин-6-сульфонамид</p>	6,332
45			

5	6-20		1,726
10	6-22		0,861
15	6-23		9,703
20	6-24		0,292
25	6-25		1,006
30	6-25		1,006
35	6-25		1,006
40	6-25		1,006
45	6-25		1,006

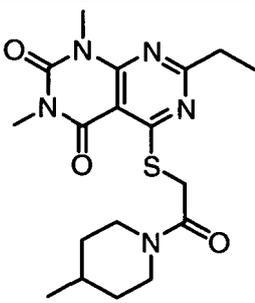
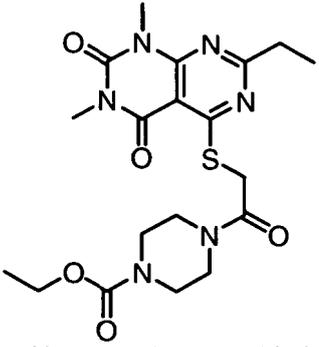
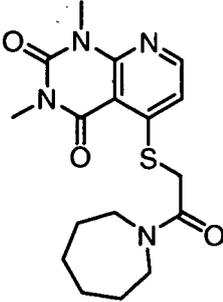
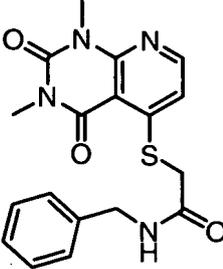
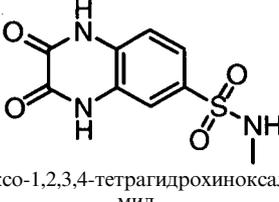
5	6-26	 <p>7-этил-1,3-диметил-5-(2-(4-метилпиперидин-1-ил)-2-оксоэтилтио)пири미до[4,5-d]пириимидин-2,4(1H,3H)-дион</p>	0,721
10			
15	6-27	 <p>этил 4-(2-(2-этил-6,8-диметил-5,7-диоксо-5,6,7,8-тетрагидропиримидо[4,5-d]пириимидин-4-илтио)ацетил)пиперазин-1-карбоксилат</p>	0,763
20			
25	6-28	 <p>5-(2-(азепан-1-ил)-2-оксоэтилтио)-1,3-диметилпиридо[2,3-d]пириимидин-2,4(1H,3H)-дион</p>	2,377
30			
35	6-29	 <p>N-бензил-2-(1,3-диметил-2,4-диоксо-1,2,3,4-тетрагидропиридо[2,3-d]пириимидин-5-илтио)ацетамид</p>	0,710
40			
45	6-30	 <p>N-метил-2,3-диоксо-1,2,3,4-тетрагидрохиноксалин-6-сульфонамид</p>	6,234

Таблица 7: Результаты репрезентативного скрининга в отношении 23 рецепторов горького вкуса

Соединения из примеров 5 и 6, описанные выше, были подвергнуты скринингу в

отношении группы из 23 рецепторов горького вкуса. Рецепторы горького вкуса активировали до EC80 соответствующим агонистом, затем обрабатывали вышеописанными соединениями при концентрации 25 мкМ. Данные суммированы ниже в таблице.

- 5 Ингибирование 80% или больше=++++
- Ингибирование 60%-80%=+++
- Ингибирование 40%-60%=++
- Ингибирование 20%-40%=+

Пример	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		++	+	+	++			+++		++++	+++	+++	++	+	++++	++++	++++	+++	++	+	+	+++	+
5-7		+	+		+			+		++	++	++			++++	++++	++++	++++		+	++	+	
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		+																					

40

45

5

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							+		+				++	+++	+		+	+	+

10

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		++	398	+	+		++	+	+++	++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	++
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						

45

Пример 7. Данные в отношении восприятия для примера 10-10

Для определения эффективности индивидуального антагониста проводили исследования в отношении вкуса с применением конкретного агониста T2R8, исследуемого соединения и контрольного блокатора горького вкуса. Авторами настоящего изобретения ранее был предложен эффективный антагонист hT2R8, который, как было показано, имеет эффект воздействия на вкус, пример 4-8 из предварительной заявки на патент США, серийный № 60/957129, поданной 21 августа 2007 года: N-(1-(3,5-диметилизоксазол-4-ил)метил)-1H-пиразол-4-ил)бензо[d][1,3]диоксол-5-карбоксамид. Как было показано, это вещество уменьшает горький вкус кофе как в отдельности, так и в комбинации с блокатором горького вкуса широкого спектра действия. Как показано в таблице 6, при сравнении с контрольным антагонистом согласно настоящему изобретению (пример 10-8) антагонист hT2R8 из примера 10-10 демонстрирует большую способность блокировать восприятие горького вкуса.

Таблица 6

Результаты исследования в отношении вкуса, где сравнивали контрольный блокатор горького вкуса и более эффективный блокатор горького вкуса 10-10

Номер примера	Анализ HTS	Выбраны как более горькие		Значение p	Концентрация антагониста
	IC ₅₀ мкМ	10-8	+ другой		мкМ
10-10	0,02-0,04	14	2	0,004	1

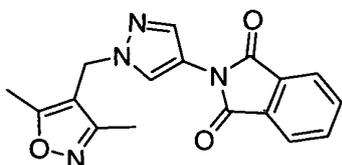
Как было показано в ходе исследований в отношении вкуса согласно этому примеру, ощущение горечи можно уменьшить или устранить путем введения антагонистов hT2R8, при этом антагонист из примера 10-10, по-видимому, является более сильнодействующим аналогом по сравнению с известными антагонистами горького вкуса, такими как N-(1-((3,5-диметилизоксазол-4-ил)метил)-1H-пиразол-4-ил)бензо[d][1,3]диоксол-5-карбоксамид (7767). Из этого следует, что ощущение горечи можно уменьшить или устранить путем введения антагонистов hT2R8 в композиции, такие как пища, напитки и/или лекарственные средства, горький вкус которых обусловлен агонистами T2R8.

Пример 8. Идентификация антагонистов hT2R8

Для идентификации антагонистов клеточные линии, стабильно экспрессирующие hT2R8, вместе с беспорядочным химерным белком G16g44 были получены, как описано в предыдущих заявках на патент. Высокопроизводительный анализ проводили с применением стабильных клеточных линий и FLIPR (флуориметрический планшетный анализатор (Fluorescent Imaging Plate Reader)). Агонист hT2R8 применяли для активирования рецепторов до 70-80% от их соответствующей максимальной активности. В случае hT2R8 применяемым агонистом был андрографолид (200 мкМ). Чтобы идентифицировать антагонисты, вместе с агонистом добавляли соединения другой химической структуры. Соединения, вызывающие статистически значимое снижение рецепторной активности, объединяли вместе и повторно идентифицировали с помощью зависящих от дозы кривых ингибирования. Остов А и остов В были идентифицированы в качестве антагонистов hT2R8 (фиг.1). Конкретные примеры представлены в таблице 1.

Пример 9. Антагонисты hT2R8

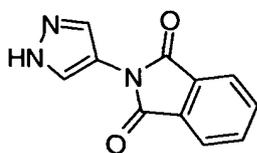
Пример 9-1: 2-(1-((3,5-диметилизоксазол-4-ил)метил)-1H-пиразол-4-ил)изоиндолин-1,3-дион



2-(1H-пиразол-4-ил)изоиндолин-1,3-дион (пример 9-1a) (1,5 г, 7 ммоль), 4-(хлорметил)

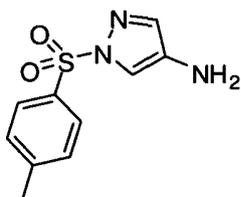
-3,5-диметилизоксазол (1,5 г, 10 ммоль) и карбонат цезия (3,3 г, 10 ммоль) перемешивали в ДМФ (20 мл) при 80°C в течение 3 часов. Реакционную смесь охлаждали, разбавляли H₂O (150 мл) и экстрагировали этилацетатом (3×, 75 мл). Объединенные органические экстракты сушили над сульфатом натрия, фильтровали и концентрировали на роторном испарителе. Твердый продукт растирали в порошок с этилацетатом/гексаном (1/9) и перекристаллизовывали из абсолютного этанола (30 мл) при кипячении с обратным холодильником с получением 2-(1-((3,5-диметилизоксазол-4-ил)метил)-1H-пиразол-4-ил)изоиндолин-1,3-диона (900 мг, 38%) в виде прозрачного, светло-желтого твердого вещества. ¹H ЯМР (DMCO-d₆, 400 МГц): δ 1,36 (д, 3H), 2,16 (с, 3H), 2,41 (с, 3H), J=7,2 Гц), 5,22 (с, 2H), 7,81 (с, 1H), 7,91-7,83 (м, 4H), 8,21 (с, 1H). МС М+Н рассчитано 323,11; экспериментально 323,1. Температура плавления: 170-171°C. Как было показано, вышеназванное соединение ингибирует рецептор горького вкуса hT2R08 и имеет IC₅₀ 0,18 мкМ.

Пример 9-1a: 1-тозил-1H-пиразол-4-амин



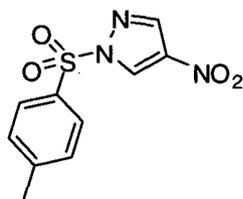
1-Тозил-1H-пиразол-4-амин (пример 9-1b) (3 г, 12,7 ммоль) и изобензофуран-1,3-дион (1,9 г, 13 ммоль) перемешивали в ДМФ/ацетонитриле (1/1) (20 мл) при 100°C в течение 1 часа. Смесь охлаждали и разбавляли H₂O. Осадок собирали с помощью фильтрования, промывали дополнительным количеством воды, а затем этилацетатом и гексаном. Твердый продукт высушивали в глубоком вакууме с получением 2-(1H-пиразол-4-ил)изоиндолин-1,3-диона (2,5 г, 92%) в виде желтого твердого вещества. МС М+Н рассчитано 214,1; экспериментально 214,1. ¹H ЯМР (CDCl₃, 400 МГц): δ 7,93-8,10 (м, 6H), 13,03 (ушир.с, 1H).

Пример 9-1b: 1-тозил-1H-пиразол-4-амин



4-нитро-1-тозил-1H-пиразол (пример 9-1c) (3 г, 11,2 ммоль) и 10% палладий-на-углероде (800 мг) в MeOH (150 мл) перемешивали при 2 атмосферах водорода в гидрогенизаторе Парра в течение 3 часов. Смесь фильтровали через целит, концентрировали и очищали методом хроматографии на силикагеле (80% этилацетат в гексане) с получением 1-тозил-1H-пиразол-4-амина (1,9 г, 71%) в виде розового твердого вещества. ¹H ЯМР (CDCl₃, 400 МГц): δ 2,40 (с, 3H), 3,01 (ушир.с, 2H), 7,29 (д, 2H, J=8 Гц), 7,41 (д, 1H, J=1,2 Гц), 7,53 (д, 1H, J=1,2 Гц), 7,81 (д, 2H, J=8 Гц).

Пример 9-1c: 4-нитро-1-тозил-1H-пиразол



5

4-Нитро-1Н-пиразол (500 мг, 4,4 ммоль), 4-метилбензол-1-сульфонилхлорид (840 мг, 4,4 ммоль) и триэтиламин (510 мг, 5 ммоль) перемешивали в ДМФ (25 мл) при 80°C в течение 1 часа. Реакционную смесь охлаждали, разбавляли H₂O (200 мл) и

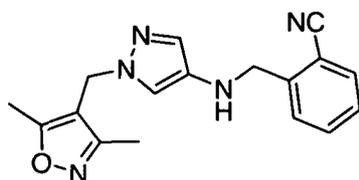
10

экстрагировали этилацетатом (3×, 100 мл). Органическую фазу промывали водным 1N HCl (200 мл) и H₂O (200 мл), сушили над сульфатом натрия, фильтровали и

концентрировали на роторном испарителе. Твердое вещество растирали в порошок с гексаном с получением 4-нитро-1-тозил-1Н-пиразола (600 мг, 50%) в виде грязно-белого твердого вещества. ¹H ЯМР (ДМСО-d₆, 400 МГц): δ 2,40 (с, 3H), 7,52 (д, 2H, J=8,4 Гц), 7,98 (д, 2H, J=8,8 Гц), 8,57 (с, 1H), 9,58 (с, 1H).

15

Пример 9-2: 2-((1-((3,5-диметилизоксазол-4-ил)метил)-1Н-пиразол-4-иламино)метил)бензонитрил



20

1-((3,5-диметилизоксазол-4-ил)метил)-1Н-пиразол-4-амин-гидрохлорид (100 мг, 0,44 ммоль), 2-(бромметил)бензонитрил (115 мг, 0,6 ммоль) и триэтиламин (0,5 мл, 3,5 ммоль) в ДМФ (3 мл) подвергали действию излучения и перемешивали в микроволновом реакторе при 80°C в течение 10 минут. Реакционную смесь охлаждали, разбавляли H₂O

25

(50 мл) и экстрагировали этилацетатом (3×, 30 мл). Объединенные органические экстракты сушили над сульфатом натрия и концентрировали на роторном испарителе.

30

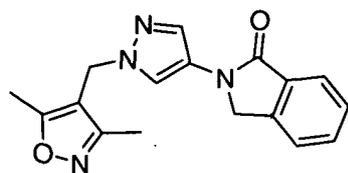
Остаток растворяли в этаноле (70 мл), H₂O (3 мл) и уксусной кислоте (1 мл) и смесь кипятили с обратным холодильником в течение 2 часов. Раствор концентрировали на роторном испарителе, переносили в метанол (3 мл) и очищали методом обращенно-фазовой ВЭЖХ, получая 3-1 мл аликвоты (5-95% ацетонитрил в H₂O: 16-минутный градиент). Чистые фракции объединяли и концентрировали на роторном испарителе.

35

Остаток растирали в порошок с этилацетатом/гексаном (1/9) с получением 2-((1-((3,5-диметилизоксазол-4-ил)метил)-1Н-пиразол-4-ил)изоиндолин-1-она (85 мг, 61%) в виде чистого белого твердого вещества. ¹H ЯМР (ДМСО-d₆, 400 МГц): δ 2,18 (с, 3H), 2,43 (с, 3H), 4,97 (с, 2H), 5,18 (с, 2H), 7,58-7,68 (м, 3H), 7,77 (с, 1H), 8,10 (д, J=8 Гц, 1H), 8,27 (с, 1H), 9,19 (ушир.с, 1H). Как было показано, вышеназванное соединение ингибирует рецептор горького вкуса hT2R08 и имеет величину IC₅₀ более 30 мкМ.

40

Пример 9-3: 2-((1-((3,5-диметилизоксазол-4-ил)метил)-1Н-пиразол-4-ил)изоиндолин-1-он

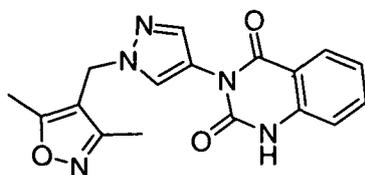


45

2-((1-((3,5-Диметилизоксазол-4-ил)метил)-1Н-пиразол-4-иламино)метил)бензонитрил

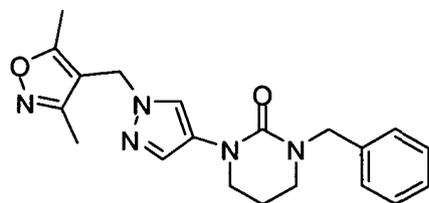
(пример 9-2) (30 мг, 0,14 ммоль) перемешивали в смеси MeOH/2N водный NaOH (5 мл) при 100°C в течение 30 минут в микроволновом реакторе. Реакционную смесь подкисляли 1N водным HCl (100 мл) и экстрагировали этилацетатом (3х, 70 мл). Объединенные органические экстракты сушили над сульфатом натрия и концентрировали. Остаток растворяли в MeOH (3 мл) и очищали методом обращенно-фазовой ВЭЖХ, получая 2-1,5 мл аликвоты (5-95% ацетонитрил в H₂O: 16-минутный градиент). Чистые фракции объединяли и концентрировали с получением 2-(1-((3,5-диметилизоксазол-4-ил)метил)-1H-пиразол-4-ил)изоиндолин-1-она (21 мг, 50%) в виде чистого белого твердого вещества. ¹H ЯМР (DMCO-d₆, 400 МГц): δ 2,15 (с, 3H), 2,41 (с, 3H), 4,81 (с, 2H), 5,17 (с, 2H), 7,48-7,50 (м, 1H), 7,51-7,52 (м, 2H), 7,72 (д, J=7,2 Гц, 1H), 7,75 (с, 1H), 8,20 (с, 1H). Как было показано, вышеназванное соединение ингибирует рецептор горького вкуса hT2R08 и имеет IC₅₀ 11 мкМ.

Пример 9-4: 3-(1-((3,5-диметилизоксазол-4-ил)метил)-1H-пиразол-4-ил)хиназолин-2,4(1H,3H)-дион



1-((3,5-Диметилизоксазол-4-ил)метил)-1H-пиразол-4-амина гидрохлорид (75 мг, 0,33 ммоль), метил-2-изоцианатобензоат и триэтиламин (200 мг, 2 ммоль) в ацетонитриле (3 мл) подвергали действию излучения в микроволновом реакторе при 100°C в течение 30 минут. Реакционную смесь охлаждали, разбавляли H₂O (75 мл) и экстрагировали этилацетатом (3х, 50 мл). Объединенные органические экстракты сушили над сульфатом натрия, фильтровали и концентрировали на ротормном испарителе. Остаток очищали методом хроматографии на силикагеле (75% этилацетат в гексане) с получением 3-(1-((3,5-диметилизоксазол-4-ил)метил)-1H-пиразол-4-ил)хиназолин-2,4(1H,3H)-диона (20 мг, 18%) в виде светло-розового твердого вещества. ¹H ЯМР (DMCO-d₆, 400 МГц): δ 2,16 (с, 3H), 2,40 (с, 3H), 5,17 (с, 2H), 7,17-7,22 (м, 2H), 7,50 (с, 1H), 7,66 (дт, J=8, 1,2 Гц, 1H), 7,92 (д, J=6,8 Гц, 1H), 7,95 (с, 1H), 11,52 (ушир.с, 1H). Как было показано, вышеназванное соединение ингибирует рецептор горького вкуса hT2R08 и имеет IC₅₀ 1,5 мкМ.

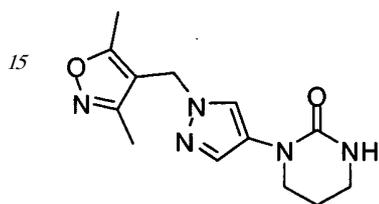
Пример 9-5: 1-бензил-3-(1-((3,5-диметилизоксазол-4-ил)метил)-1H-пиразол-4-ил)тетрагидропиримидин-2(1H)-он



1-(1-((3,5-Диметилизоксазол-4-ил)метил)-1H-пиразол-4-ил)тетрагидропиримидин-2(1H)-он (пример 9-5а) (50 мг, 0,18 ммоль) и 60% гидрид натрия (8 мг, 0,20 ммоль) в ДМФ (3 мл) перемешивали при комнатной температуре в течение 15 минут, затем охлаждали до 0°C. К смеси добавляли бензилбромид (31 мг, 0,18 ммоль) и оставляли нагреваться при комнатной температуре, затем перемешивали в течение 2 часов. Реакцию гасили метанолом и концентрировали. Реакционную смесь разбавляли солевым раствором (50 мл) и экстрагировали дихлорметаном (2х, 50 мл). Объединенные

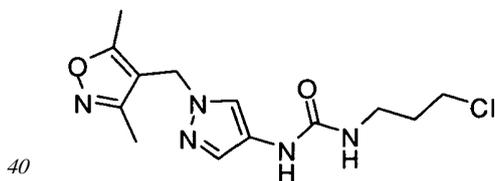
органические экстракты сушили над сульфатом магния, фильтровали и концентрировали на роторном испарителе. Остаток переносили в дихлорметан (5 мл) и очищали с помощью колоночной хроматографии на силикагеле (100%-90% дихлорметан в метаноле: 30-минутный градиент) с получением 1-бензил-3-(1-((3,5-диметилизоксазол-4-ил)метил)-1*H*-пиразол-4-ил)тетрагидропиримидин-2(1*H*)-она (20 мг, 30%) в виде белого твердого вещества. ¹H ЯМР (ДМСО-*d*₆, 400 МГц): δ 1,85-1,91 (м, 2H), 2,10 (с, 3H), 2,37 (с, 3H), 3,12 (м, 2H), 3,55 (т, *J*=5,8 Гц, 2H), 4,48 (с, 2H), 5,05 (с, 2H), 7,22-7,31 (м, 5H), 7,49 (с, 1H), 7,84 (с, 1H). ЖХ/МС; [M+H] рассчитано для C₂₀H₂₃N₅O₂; ожидаемое значение 366,19; экспериментально 366,15. Как было показано, вышеназванное соединение ингибирует рецептор горького вкуса hT2R08 и имеет IC₅₀ 1,65 мкМ.

Пример 9-5а: 1-(1-((3,5-диметилизоксазол-4-ил)метил)-1*H*-пиразол-4-ил)тетрагидропиримидин-2(1*H*)-он



1-(3-Хлорпропил)-3-(1-((3,5-диметилизоксазол-4-ил)метил)-1*H*-пиразол-4-ил)мочевину (пример 9-5b) (200 мг, 0,64 ммоль) и 60% гидрид натрия (28 мг, 0,71 ммоль) в ДМФ (2 мл) перемешивали при 0°C в течение 15 минут, затем оставляли нагреваться до комнатной температуры и перемешивали в течение 2 часов. Реакцию гасили метанолом и концентрировали. Реакционную смесь разбавляли солевым раствором (50 мл) и экстрагировали дихлорметаном (2х, 50 мл). Объединенные органические экстракты сушили над сульфатом магния, фильтровали и концентрировали. Остаток переносили в дихлорметан (5 мл) и очищали с помощью колоночной хроматографии на силикагеле (100%-90% дихлорметан в метаноле: 30-минутный градиент) с получением 1-(1-((3,5-диметилизоксазол-4-ил)метил)-1*H*-пиразол-4-ил)тетрагидропиримидин-2(1*H*)-она (84 мг, 48%) в виде белого твердого вещества. ¹H ЯМР (ДМСО-*d*₆, 400 МГц): δ 1,85-1,91 (м, 2H), 2,10 (с, 3H), 2,37 (с, 3H), 3,12 (м, 2H), 3,48 (т, *J*=6,0 Гц, 2H), 5,05 (с, 2H), 6,57 (с, 1H), 7,46 (с, 1H), 7,80 (с, 1H). ЖХ/МС; [M+H] рассчитано для C₁₃H₁₇N₅O₂; ожидаемое значение 276,14; экспериментально 276,10.

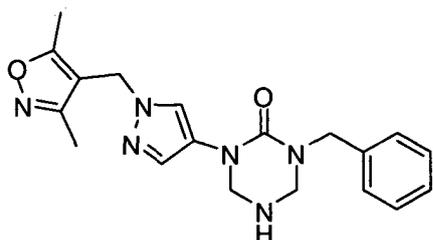
Пример 9-5b: 1-(3-хлорпропил)-3-(1-((3,5-диметилизоксазол-4-ил)метил)-1*H*-пиразол-4-ил)мочевина



1-((3,5-Диметилизоксазол-4-ил)метил)-1*H*-пиразол-4-амин (342 мг, 1,78 ммоль) и 2-хлорпропилизотиоцианат (213 мг, 1,78 ммоль) в ацетонитриле (5 мл) нагревали при 65°C в течение 16 часов. Реакционную смесь охлаждали до комнатной температуры, концентрировали и остаток растворяли в дихлорметане (5 мл) и очищали с помощью колоночной хроматографии на силикагеле (100%-90% дихлорметан в метаноле: 30-минутный градиент). Чистые фракции объединяли и концентрировали, затем растирали в порошок с этилацетатом/гексаном (1/9) и получали 1-(3-хлорпропил)-3-(1-((3,5-диметилизоксазол-4-ил)метил)-1*H*-пиразол-4-ил)мочевину (218 мг, 39%) в виде белого

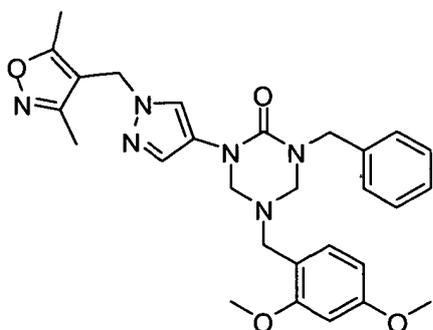
твердого вещества. ЖХ/МС; [М+Н] рассчитано для C₁₂H₁₆ClN₅O₂; ожидаемое значение 298,10; экспериментально 298,10.

Пример 9-6: 1-бензил-3-(1-((3,5-диметилизоксазол-4-ил)метил)-1*H*-пиразол-4-ил)-1,3,5-триазиан-2-он



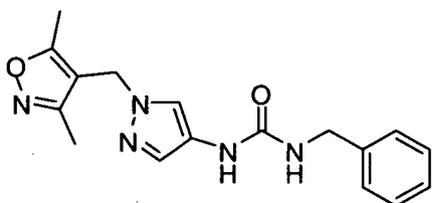
1-Бензил-5-(2,4-диметоксибензил)-3-(1-((3,5-диметилизоксазол-4-ил)метил)-1*H*-пиразол-4-ил)-1,3,5-триазиан-2-он (пример 9-6а) (44 мг, 0,09 ммоль), анизол (9 мг, 0,09 ммоль) и 50% раствор трифторуксусная кислота/дихлорметан (1 мл) в дихлорметане (1 мл) перемешивали при комнатной температуре в течение 2 часов. Реакционную смесь концентрировали, гасили насыщенным бикарбонатом натрия (50 мл), экстрагировали этилацетатом (2х, 50 мл) и промывали солевым раствором (50 мл). Объединенные органические экстракты сушили над сульфатом магния, фильтровали и концентрировали. Очистка с помощью колоночной хроматографии на силикагеле (100%-90% дихлорметан в метаноле: 30-минутный градиент) позволяла получить 1-бензил-3-(1-((3,5-диметилизоксазол-4-ил)метил)-1*H*-пиразол-4-ил)-1,3,5-триазиан-2-он (19 мг, 62%) в виде белого твердого вещества. ЖХ/МС; [М+Н] рассчитано для C₁₉H₂₂N₆O₂; ожидаемое значение 367,18; экспериментально 367,20. Как было показано, вышеназванное соединение ингибирует рецептор горького вкуса hT2R08 и имеет IC₅₀ 5,84 мкМ.

Пример 9-6а: 1-бензил-5-(2,4-диметоксибензил)-3-(1-((3,5-диметилизоксазол-4-ил)метил)-1*H*-пиразол-4-ил)-1,3,5-триазиан-2-он



1-Бензил-3-(1-((3,5-диметилизоксазол-4-ил)метил)-1*H*-пиразол-4-ил)мочевину (пример 9-6б) (50 мг, 0,15 ммоль), 2,4-метоксибензиламин (26 мг, 0,15 ммоль) и формальдегид (37% масс. в воде) (25 мг, 0,31 ммоль) нагревали при 100°C в течение 16 часов. Реакционную смесь охлаждали до комнатной температуры, разбавляли солевым раствором (50 мл) и экстрагировали дихлорметаном (2х, 50 мл). Объединенные органические экстракты сушили над сульфатом магния, фильтровали и концентрировали. Остаток очищали с помощью колоночной хроматографии на силикагеле (100%-90% дихлорметан в метаноле: 30-минутный градиент) с получением 1-бензил-5-(2,4-диметоксибензил)-3-(1-((3,5-диметилизоксазол-4-ил)метил)-1*H*-пиразол-4-ил)-1,3,5-триазиан-2-она (44 мг, 56%) в виде масла. ЖХ/МС; [М+Н] рассчитано для C₂₈H₃₂N₆O₄; ожидаемое значение 517,25; экспериментально 517,20.

Пример 9-6б: 1-бензил-3-(1-((3,5-диметилизоксазол-4-ил)метил)-1*H*-пиразол-4-ил)мочевина



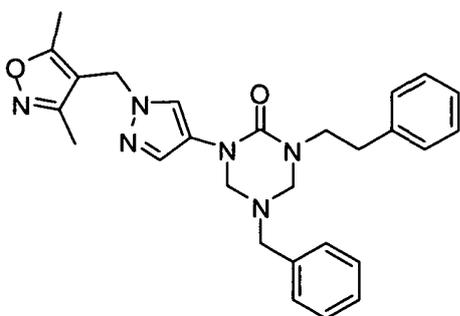
5

1-((3,5-Диметилизоксазол-4-ил)метил)-1*H*-пиразол-4-амин (287 мг, 1,49 ммоль) и бензилизотиоцианат (199 мг, 1,49 ммоль) в ацетонитриле (5 мл) нагревали при 65°C в течение 16 часов. Реакционную смесь охлаждали до комнатной температуры и концентрировали. Остаток очищали с помощью колоночной хроматографии на силикагеле (100%-90% дихлорметан в метаноле: 30-минутный градиент) и растирали в порошок с этилацетатом/гексаном (1/9) с получением 1-бензил-3-(1-((3,5-диметилизоксазол-4-ил)метил)-1*H*-пиразол-4-ил)мочевины (246 мг, 51%) в виде белого твердого вещества. ЖХ/МС; [M+H] рассчитано для C₁₇H₁₉N₅O₂; ожидаемое значение 326,15; экспериментально 326,10.

10

15

Пример 9-7: 5-бензил-1-(1-((3,5-диметилизоксазол-4-ил)метил)-1*H*-пиразол-4-ил)-3-фенетил-1,3,5-триазиан-2-он



20

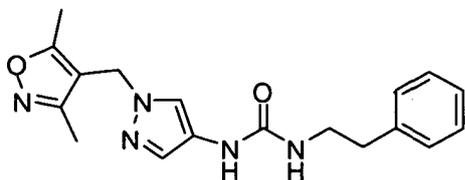
25

Получали как в примере 9-6а из 1-(1-((3,5-диметилизоксазол-4-ил)метил)-1*H*-пиразол-4-ил)-3-фенетилмочевины (пример 9-7а), формальдегида и бензиламин. Выход: 15%. ¹H ЯМР (ДМСО-*d*₆, 400 МГц): δ 2,11 (с, 3H), 2,37 (с, 3H), 2,69 (т, *J*=7,6 Гц, 2H), 3,39 (т, *J*=7,8 Гц, 2H), 3,81 (с, 2H), 4,16 (с, 2H), 4,42 (с, 2H), 5,05 (с, 2H), 7,17-7,32 (м, 10H), 7,42 (с, 1H), 7,78 (с, 1H). ЖХ/МС; [M+H] рассчитано для C₂₇H₃₀N₆O₂; ожидаемое значение 471,24; экспериментально 471,15. Как было показано, вышеназванное соединение ингибирует горький рецептор hT2R08 и имеет IC₅₀ 2,64 мкМ.

30

Пример 9-7а: 1-(1-((3,5-диметилизоксазол-4-ил)метил)-1*H*-пиразол-4-ил)-3-фенетилмочевина

35

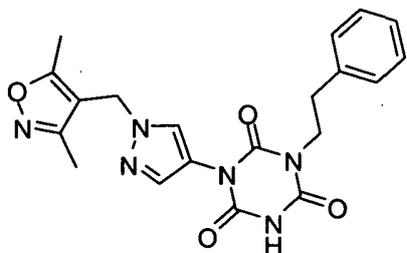


40

Получали как в примере 9-6b из 1-((3,5-диметилизоксазол-4-ил)метил)-1*H*-пиразол-4-амин и фенетилизотиоцианата. Выход: 29%. ¹H ЯМР (ДМСО-*d*₆, 400 МГц): δ 2,10 (с, 3H), 2,36 (с, 3H), 2,69 (т, *J*=7,2 Гц, 2H), 3,25 (кв, *J*=7,4 Гц, 2H), 5,02 (с, 2H), 6,00 (т, *J*=5,8 Гц, 1H), 7,16-7,30 (м, 6H), 7,68 (с, 1H), 8,13 (с, 1H). ЖХ/МС; [M+H] рассчитано для C₁₈H₂₁N₅O₂; ожидаемое значение 340,17; экспериментально 340,20.

45

Пример 9-8: 1-(1-((3,5-диметилизоксазол-4-ил)метил)-1*H*-пиразол-4-ил)-3-фенетил-1,3,5-триазиан-2,4,6-трион

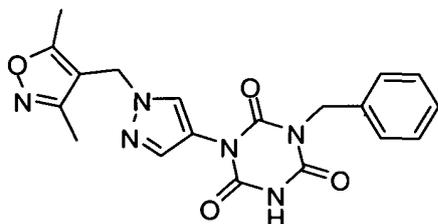


5

1-(1-((3,5-Диметилизоксазол-4-ил)метил)-1*H*-пиразол-4-ил)-3-фенетилмочевину (пример 9-7a) (100 мг, 0,29 ммоль) в ТГФ (2 мл) охлаждали до 0°C и медленно добавляли н-хлоркарбонилизоцианат (93 мг, 0,88 ммоль). После добавления реакционную смесь оставляли нагреваться до комнатной температуры и перемешивали в течение 1 часа. Реакционную смесь концентрировали и остаток очищали с помощью колоночной хроматографии на силикагеле (100%-90% дихлорметана в метаноле: 30-минутный градиент) с получением (1-(1-((3,5-диметилизоксазол-4-ил)метил)-1*H*-пиразол-4-ил)-3-фенетил-1,3,5-триазиан-2,4,6-триона (100 мг, 83%) в виде белого твердого вещества. ¹Н ЯМР (ДМСО-*d*₆, 400 МГц): δ 2,13 (с, 3Н), 2,39 (с, 3Н), 2,82 (т, *J*=5,8 Гц, 2Н), 3,88 (т, *J*=8,0 Гц, 2Н), 5,17 (с, 2Н), 7,19-7,31 (м, 5Н), 7,44 (с, 1Н), 7,89 (с, 1Н), 11,84 (с, 1Н). ЖХ/МС; [M+H] рассчитано для C₂₀H₂₀N₆O₄; ожидаемое значение 409,15; экспериментально 409,20. Как было показано, вышеназванное соединение ингибирует рецептор горького вкуса hT2R08 и имеет IC₅₀ 3,03 мкМ.

20

Пример 9-9: 1-бензил-3-(1-((3,5-диметилизоксазол-4-ил)метил)-1*H*-пиразол-4-ил)-1,3,5-триазиан-2,4,6-трион



25

1-Бензил-3-(1-((3,5-диметилизоксазол-4-ил)метил)-1*H*-пиразол-4-ил)мочевину (пример 95b) (100 мг, 0,31 ммоль) в ТГФ (2 мл) охлаждали до 0°C и медленно добавляли н-хлоркарбонилизоцианат (97 мг, 0,92 ммоль). После добавления реакционную смесь оставляли нагреваться до комнатной температуры и перемешивали в течение 1 часа. Реакционную смесь концентрировали и остаток очищали с помощью колоночной хроматографии на силикагеле (100%-90% дихлорметана в метаноле: 30-минутный градиент) с получением 1-бензил-3-(1-((3,5-диметилизоксазол-4-ил)метил)-1*H*-пиразол-4-ил)-1,3,5-триазиан-2,4,6-триона (112 мг, 93%) в виде белого твердого вещества. ¹Н ЯМР (ДМСО-*d*₆, 400 МГц): δ 2,12 (с, 3Н), 2,38(с, 3Н), 4,87 (с, 2Н), 5,16 (с, 2Н), 7,23-7,34 (м, 5Н), 7,45 (с, 1Н), 7,90 (с, 1Н), 11,93 (с, 1Н). ЖХ/МС; [M+H] рассчитано для C₁₉H₁₈N₆O₄; ожидаемое значение 395,14; экспериментально 395,15. Как было показано, вышеназванное соединение ингибирует рецептор горького вкуса hT2R08 и имеет IC₅₀ 1,14 мкМ.

30

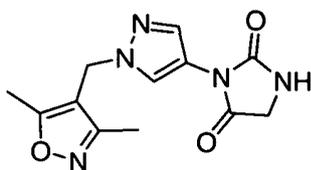
35

40

Пример 10. Антагонисты hT2R8: Получение соединений согласно изобретению

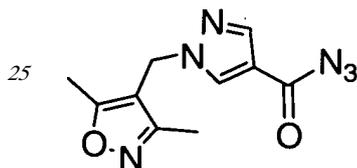
45

Пример 10-1: 3-(1-((3,5-диметилизоксазол-4-ил)метил)-1*H*-пиразол-4-ил)имидазолидин-2,4-дион



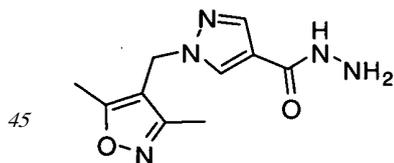
5 1-((3,5-Диметилизоксазол-4-ил)метил)-1Н-пиразол-4-карбонилазид (пример 10-1а)
 (6 г, 25,5 ммоль) в толуоле (100 мл) кипятили с обратным холодильником в течение 1
 часа и охлаждали до температуры окружающей среды в атмосфере азота. Добавляли
 гидрохлорид метилового эфира глицина (3,1 г, 26 ммоль) и триэтиламин (3,2 г, 32 ммоль),
 10 смесь кипятили с обратным холодильником в течение 16 часов. Реакционную смесь
 охлаждали и удаляли растворитель на роторном испарителе. Твердое вещество повторно
 растворяли в этилацетате (100 мл) и органическую фазу промывали 1N раствором HCl
 (2х, 150 мл). Водную фазу опять экстрагировали этилацетатом (2х, 75 мл), и
 объединенные органические экстракты сушили над сульфатом натрия и
 15 концентрировали. Образовавшееся твердое вещество растирали в порошок с
 этилацетатом/гексаном (1/9) и высушивали в глубоком вакууме с получением 3-(1-((3,5-
 диметилизоксазол-4-ил)метил)-1Н-пиразол-4-ил)имидазолидин-2,4-диона (5,2 г, 74%) в
 виде белого твердого вещества. ¹H ЯМР (DMCO-d₆, 400 МГц): δ 2,19 (с, 3H), 2,42 (с,
 3H), 4,09 (с, 2H), 5,06 (с, 2H), 5,68 (ушир.с, 1H), 7,90 (с, 1H), 8,05 (1H). Как было показано,
 20 вышеназванное соединение ингибирует рецептор горького вкуса hT2R08 и имеет IC₅₀
 1,7 мкМ.

Пример 10-1а: 1-((3,5-диметилизоксазол-4-ил)метил)-1Н-пиразол-4-карбонилазид



25 Нитрит натрия (450 мг, 6,5 ммоль, в H₂O) (10 мл) добавляли по каплям на протяжении
 10 минут к суспензии 1-((3,5-диметилизоксазол-4-ил)метил)-1Н-пиразол-4-карбогидразида
 30 (пример 10-1b) (1 г, 4,3 ммоль) в 10% водной уксусной кислоте (50 мл) и охлаждали до
 0°C с помощью бани с ледяной водой. Реакционную смесь перемешивали в течение
 дополнительных 15 минут, затем экстрагировали этилацетатом (3х, 75 мл).
 Объединенные органические экстракты промывали водным насыщенным карбонатом
 35 натрия (100 мл), а затем H₂O (100 мл). Объединенные органические экстракты сушили
 над сульфатом натрия, фильтровали и концентрировали. Твердый продукт растирали
 в порошок с этилацетатом/гексаном (1/9) и высушивали в вакууме с получением 1-((3,5-
 диметилизоксазол-4-ил)метил)-1Н-пиразол-4-карбонилазида (1 г, 93%) в виде белого
 40 твердого вещества. ¹H ЯМР (CDCl₃, 400 МГц): δ 2,20 (с, 3H), 2,44 (с, 3H), 5,07 (с, 2H),
 7,81 (с, 1H), 7,93 (с, 1H).

Пример 10-1b: 1-((3,5-диметилизоксазол-4-ил)метил)-1Н-пиразол-4-карбогидразид

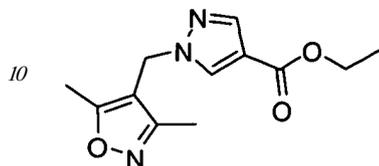


45 Этил-1-((3,5-диметилизоксазол-4-ил)метил)-1Н-пиразол-4-карбоксилат (пример 10-
 1с) (6 г, 24 ммоль) и гидразин (7,5 г, 240 ммоль) перемешивали в EtOH (100 мл) при

кипячении с обратным холодильником в течение 12 часов. Раствор концентрировали на роторном испарителе и твердый продукт растирали в порошок с этилацетатом/гексаном (1/9) и высушивали в глубоком вакууме с получением 1-((3,5-диметилизоксазол-4-ил)метил)-1Н-пиразол-4-карбогидразида (5,5 г, 97%) в виде чистого белого твердого

5 вещества. ^1H ЯМР (ДМСО- d_6 , 400 МГц): δ 2,11 (с, 3H), 2,39 (с, 3H), 5,15 (с, 2H), 7,81 (с, 1H), 8,17 (с, 1H), 9,31 (ушир.с, 1H).

Пример 10-1с: 1-((3,5-диметилизоксазол-4-ил)метил)-1Н-пиразол-4-карбоксилат



Этил-1Н-пиразол-4-карбоксилат (4,2 г, 30 ммоль), 4-(хлорметил)-3,5-диметилизоксазол (5,1 г, 35 ммоль) и карбонат цезия (9,8 г, 30 ммоль), в ДМФ (50 мл), перемешивали при

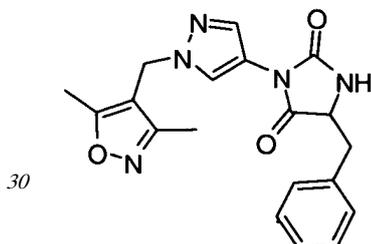
15 80°C в течение 12 часов. Реакционную смесь охлаждали до температуры окружающей среды, разбавляли 0,1 N HCl (150 мл) и экстрагировали этилацетатом (3х, 75 мл).

Объединенные органические экстракты сушили над сульфатом натрия и концентрировали на роторном испарителе. Твердый продукт растирали в порошок с этилацетатом/гексаном (1/9) и собирали с помощью фильтрования с получением этил-

20 1-((3,5-диметилизоксазол-4-ил)метил)-1Н-пиразол-4-карбоксилата (6 г, 80%) в виде белого твердого вещества. ^1H ЯМР (CDCl_3 , 400 МГц): δ 1,34 (т, $J=7,2$ Гц, 3H), 2,19 (с, 3H), 2,43 (с, 3H), 4,29 (кв, $J=7,2$ Гц, 2H), 5,06 (с, 2H), 7,77 (с, 1H), 7,91 (с, 1H).

Пример 10-2: 3-(1-((3,5-диметилизоксазол-4-ил)метил)-1Н-пиразол-4-ил)имидазолидин-2,4-дион

25

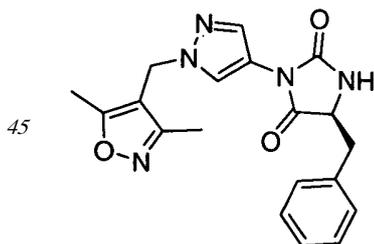


Получали как в примере 10-1 из гидрохлорида метилового эфира (+/-)-фенилаланина и 1-((3,5-диметилизоксазол-4-ил)метил)-1Н-пиразол-4-карбонилазида. Выход: 58%. ^1H

35 ЯМР (ацетон- d_6 , 400 МГц): δ 2,17 (с, 3H), 2,43 (с, 3H), 3,07 (дд, $J=14,4$, 6,4 Гц, 1H), 3,20 (дд, $J=14$, 4,4 Гц, 1H), 4,53 (т, $J=4,8$ Гц, 1H), 5,18 (с, 2H), 7,27-7,19 (м, 5H), 7,46 (ушир.с, 1H), 7,79 (с, 1H), 7,99 (с, 1H). МС М+Н рассчитано 366,15; экспериментально 366,1. Температура плавления: $169-171^\circ\text{C}$. Как было показано, вышеназванное соединение ингибирует рецептор горького вкуса hT2R08 и имеет IC_{50} 0,18 мкМ.

Пример 10-3: (S)-5-бензил-3-(1-((3,5-диметилизоксазол-4-ил)метил)-1Н-пиразол-4-ил)имидазолидин-2,4-дион

40

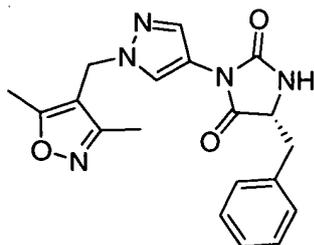


Получали как в примере 10-1 из гидрохлорида метилового эфира (S)-фенилаланина и 1-((3,5-диметилизоксазол-4-ил)метил)-1H-пиразол-4-карбонилазида (пример ба).

Выход: 13% выделено с помощью хиральной хроматографии. ^1H ЯМР (CDCl_3 , 400 МГц): δ 2,19 (с, 3H), 2,42 (с, 3H), 2,88 (дд, $J=13,6, 9,2$ Гц, 1H), 3,35 (дд, $J=13,6, 3,6$ Гц, 1H), 4,31-4,35 (м, 1H) 5,06 (с, 2H), 5,53 (ушир.с, 1H), 7,21-7,36 (м, 5H), 7,85 (с, 1H), 8,01 (с, 1H). ЖХ/МС; $[\text{M}+\text{H}]$ рассчитано для $\text{C}_{19}\text{H}_{19}\text{N}_5\text{O}_3$; ожидаемое значение 366,15;

экспериментально 366,1. $[\alpha]_{\text{D}}^{20} = (-) -136$, $c=0,1$, этанол. Как было показано, вышеназванное соединение ингибирует рецептор горького вкуса hT2R08 и имеет IC_{50} 0,12 мкМ.

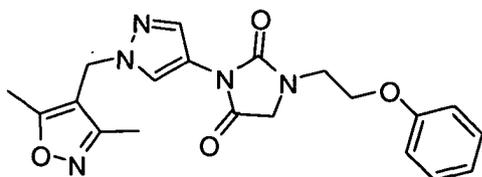
Пример 10-4: (R)-5-бензил-3-(1-((3,5-диметилизоксазол-4-ил)метил)-1H-пиразол-4-ил)имидазолидин-2,4-дион



Получали как в примере 10-1 из гидрохлорида метилового эфира (R)-фенилаланина и 1-((3,5-диметилизоксазол-4-ил)метил)-1H-пиразол-4-карбонилазида. Выход: 9%

выделено с помощью хиральной хроматографии ^1H ЯМР (CDCl_3 , 400 МГц): δ 2,19 (с, 3H), 2,42 (с, 3H), 2,88 (дд, $J=13,6, 9,2$ Гц, 1H), 3,35 (дд, $J=13,6, 3,6$ Гц, 1H), 4,31-4,35 (м, 1H) 5,06 (с, 2H), 5,53 (ушир.с, 1H), 7,21-7,36 (м, 5H), 7,85 (с, 1H), 8,01 (с, 1H). МС $\text{M}+\text{H}$ рассчитано 366,15; экспериментально 366,1. $[\alpha]_{\text{D}}^{20} = (+) -124$, $c=0,2$, этанол. Как было показано, вышеназванное соединение ингибирует рецептор горького вкуса hT2R08 и имеет IC_{50} 0,11 мкМ.

Пример 10-5: 3-(1-((3,5-диметилизоксазол-4-ил)метил)-1H-пиразол-4-ил)-1-(2-феноксиэтил)имидазолидин-2,4-дион

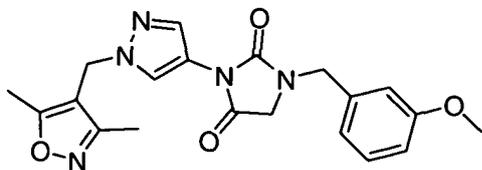


3-(1-((3,5-Диметилизоксазол-4-ил)метил)-1H-пиразол-4-ил)имидазолидин-2,4-дион (пример 10-1) (200 мг, 0,7 ммоль), (2-бромэтокси)бензол (200 мг, 1 ммоль) и карбонат цезия (325 мг, 1 ммоль) подвергали действию излучения в микроволновом реакторе при 85°C в течение 20 минут. Реакционную смесь охлаждали до комнатной температуры, разбавляли водным 1N HCl (100 мл) и экстрагировали этилацетатом (3x, 75 мл).

Объединенные органические экстракты сушили над сульфатом натрия, фильтровали и концентрировали. Остаток переносили в метанол (10 мл) и очищали методом обращенно-фазовой ВЭЖХ (5-95% ацетонитрил в H_2O : 25-минутный градиент). Чистые фракции объединяли, концентрировали, затем повторно растворяли в абсолютном этаноле и концентрировали на ротормном испарителе (4x) с получением 3-(1-((3,5-диметилизоксазол-4-ил)метил)-1H-пиразол-4-ил)-1-(2-феноксиэтил)имидазолидин-2,4-диона (150 мг, 54%) в виде белого твердого вещества. ^1H ЯМР (CDCl_3 , 400 МГц): δ 2,18 (с, 3H), 2,41 (с, 3H), 3,86 (т, $J=5,2$ Гц, 2H), 4,19 (т, $J=4,4$ Гц, 2H), 4,25 (с, 2H), 5,05 (с, 2H), 6,88 (дд, $J=9,2, 1,2$ Гц, 2H), 7,00 (дт, $J=7,6, 1,2$ Гц, 1H), 7,27-7,32 (м, 2H), 7,89 (с, 1H), 8,05

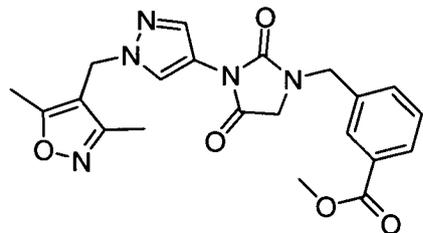
(с, 1H). МС М+Н рассчитано 396,17; экспериментально 396,1. Температура плавления: 117-118°C. Как было показано, вышеназванное соединение ингибирует рецептор горького вкуса hT2R08 и имеет IC₅₀ 0,06 мкМ.

Пример 10-6: 3-(1-((3,5-диметилизоксазол-4-ил)метил)-1H-пиразол-4-ил)-1-(3-метоксибензил)имидазолидин-2,4-дион



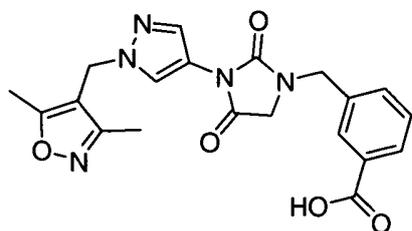
Получали как в примере 10-5 из 3-(1-((3,5-диметилизоксазол-4-ил)метил)-1H-пиразол-4-ил)имидазолидин-2,4-диона (пример 6) и 3-метоксибензилбромида. Выход: 55%. ¹H ЯМР (CDCl₃, 400 МГц): δ 2,19 (с, 3H), 2,42 (с, 3H), 3,81 (с, 3H), 3,85 (с, 2H), 4,58 (с, 2H), 5,06 (с, 2H), 6,81-6,88 (м, 3H), 7,26-7,31 (м, 1H), 7,92 (с, 1H), 8,08 (с, 1H). Как было показано, вышеназванное соединение ингибирует рецептор горького вкуса hT2R08 и имеет IC₅₀ 0,07 мкМ.

Пример 10-7: Метил 3-((3-(1-((3,5-диметилизоксазол-4-ил)метил)-1H-пиразол-4-ил)-2,4-диоксиимидазолидин-1-ил)метил)бензоат



Получали как в примере 10-5 из 3-(1-((3,5-диметилизоксазол-4-ил)метил)-1H-пиразол-4-ил)имидазолидин-2,4-диона и 3-метоксибензилбромида. Выход: 83%. ¹H ЯМР (CDCl₃, 400 МГц): δ 2,20 (с, 3H), 2,43 (с, 3H), 3,86 (с, 2H), 3,93 (с, 3H), 4,67 (с, 2H), 5,07 (с, 2H), 7,45-7,52 (м, 2H), 7,93 (с, 1H), 7,95 (с, 1H), 8,03 (дд, J=7,2, 1,6 Гц, 1H), 8,08 (с, 1H). Как было показано, вышеназванное соединение ингибирует рецептор горького вкуса hT2R08 и имеет IC₅₀ 0,09 мкМ.

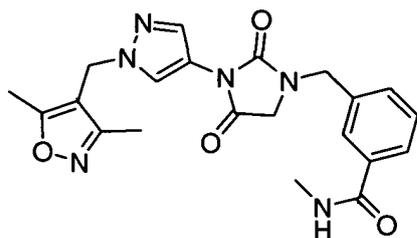
Пример 10-8: 3-((3-(1-((3,5-диметилизоксазол-4-ил)метил)-1H-пиразол-4-ил)-2,4-диоксиимидазолидин-1-ил)метил)бензойная кислота



3-(1-((3,5-Диметилизоксазол-4-ил)метил)-1H-пиразол-4-ил)имидазолидин-2,4-дион (500 мг, 1,8 ммоль) (пример 10-5), метил-3-(бромметил)бензоат (456 мг, 2 ммоль) и карбонат цезия (650 мг, 2 ммоль) перемешивали в ДМФ (4 мл) в микроволновом реакторе при 85°C в течение 20 минут. Реакционную смесь охлаждали, разбавляли 1N водным HCl (100 мл) и экстрагировали этилацетатом (3x, 75 мл). Объединенные органические экстракты сушили над сульфатом натрия, фильтровали и концентрировали. Неочищенный эфир растворяли в метаноле (5 мл) и добавляли водный NaOH (50 мл, 10% по масс.) и смесь перемешивали при температуре окружающей среды в течение 2

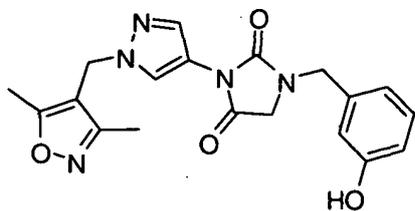
часов. Реакционную смесь подкисляли 1N HCl (150 мл) и экстрагировали этилацетатом (3х, 75 мл). Объединенные органические экстракты сушили над сульфатом натрия, фильтровали и концентрировали на роторном испарителе. Свободную кислоту растирали в порошок с этилацетатом/гексаном (1/9) и высушивали в вакууме с получением 3-((3-
 5 (1-((3,5-диметилизоксазол-4-ил)метил)-1H-пиразол-4-ил)-2,4-диоксоимидазолидин-1-ил)метил)бензойной кислоты (610. мг, 83%) в виде белого твердого вещества. ¹H ЯМР (DMCO-d₆, 400 МГц): δ 2,13 (с, 3H), 2,29 (с, 3H), 4,00 (с, 2H), 4,59 (с, 2H), 5,18 (с, 2H), 7,46-7,59 (м, 2H), 7,78 (с, 1H), 7,85-7,88 (м, 2H), 8,18 (с, 1H). Как было показано, вышеназванное
 10 соединение ингибирует рецептор горького вкуса hT2R08 и имеет IC₅₀ 1,8 мкМ.

Пример 10-9: 3-((3-((3,5-диметилизоксазол-4-ил)метил)-1H-пиразол-4-ил)-2,4-диоксоимидазолидин-1-ил)метил)-N-метилбензамид

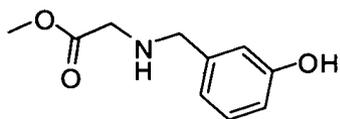


3-((3-((3,5-Диметилизоксазол-4-ил)метил)-1H-пиразол-4-ил)-2,4-
 20 диоксоимидазолидин-1-ил)метил)бензойную кислоту (100 мг, 0,24 ммоль) (пример 10-8), метиламина гидрохлорид (67 мг, 1 ммоль), триэтиламин (155 мг, 1,5 ммоль) и EDC (57 мг, 0,3 ммоль) в ацетонитриле (3 мл) подвергали действию излучения в микроволновом реакторе при 80°C в течение 10 минут. Реакционную смесь охлаждали,
 25 разбавляли водным 1N HCl (100 мл) и экстрагировали этилацетатом (3х, 75 мл). Объединенные органические экстракты сушили над сульфатом натрия, фильтровали и концентрировали. Неочищенный продукт растворяли в MeOH (3 мл) и очищали методом обращенно-фазовой ВЭЖХ (5-95% ацетонитрил в H₂O: 25-минутный градиент) с получением 3-((3-((3,5-диметилизоксазол-4-ил)метил)-1H-пиразол-4-ил)-2,4-
 30 диоксоимидазолидин-1-ил)метил)-N-метилбензамида (25 мг, 25%) в виде белого твердого вещества. MS M+H рассчитано 423,17; экспериментально 423,2. Как было показано, вышеназванное соединение ингибирует рецептор горького вкуса hT2R08 и имеет IC₅₀ 0,14 мкМ.

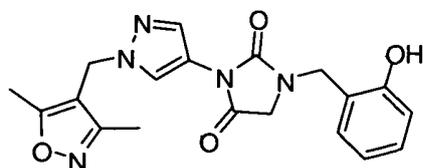
Пример 10-10: 3-((3-((3,5-диметилизоксазол-4-ил)метил)-1H-пиразол-4-ил)-1-(3-
 35 гидроксibenзил)имидазолидин-2,4-дион



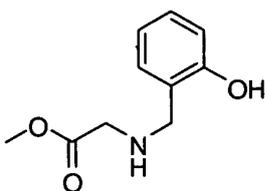
Получали как в примере 10-1 из 1-((3,5-диметилизоксазол-4-ил)метил)-1H-пиразол-4-карбонилазида (пример 10-1а) и метил-2-(3-гидроксibenзиламино)ацетата (пример
 10-10а). Выход: 24%. ¹H ЯМР (DMCO, 400 МГц): δ 2,15 (с, 3H), 2,41 (с, 3H), 3,99 (с, 2H),
 45 4,45 (с, 2H), 5,21 (с, 2H), 6,70 (м, 3H), 7,15 (м, H), 7,80 (с, 1H), 8,19 (с, H), 9,44 (с, H). ЖХ/МС; [M+H] ожидаемое значение 382,1; экспериментально 382,1. Температура плавления: 35-136°C. Как было показано, вышеназванное соединение ингибирует рецептор горького вкуса hT2R08 и имеет IC₅₀ 0,035 мкМ.

Пример 10-10а: метил-2-(3-гидроксибензиламино)ацетат

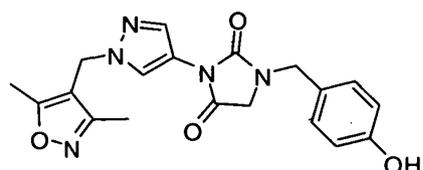
5 Метилловый эфир глицина (500 мг, 4 ммоль) и 3-гидроксибензальдегид (480 мг, 4 ммоль) растворяли в 5 мл смеси ТГФ/метанол (1:1). В реакционную смесь медленно добавляли уксусную кислоту (240 мг, 4 ммоль) и 1М цианборгидрид натрия в ТГФ (4,8 мл, 4,8 ммоль). Реакционную смесь подвергали действию излучения в микроволновом реакторе при 85°C в течение 15 минут, охлаждали до комнатной температуры и удаляли соли с помощью фильтрования. Прозрачный раствор концентрировали и остаток очищали методом обращенно-фазовой ВЭЖХ (10-95% ацетонитрил в H₂O: 25-минутный градиент) с получением вышеназванного соединения в виде прозрачного геля. Выход 45%. МС М+Н рассчитано 196,1; экспериментально 196,1.

Пример 10-11: 3-(1-((3,5-диметилизоксазол-4-ил)метил)-1Н-пиразол-4-ил)-1-(2-гидроксибензил)имидазолидин-2,4-дион

20 Получали как в примере 10-1 из 1-((3,5-диметилизоксазол-4-ил)метил)-1Н-пиразол-4-карбонилазида (пример 10-1а) и метил-2-(2-гидроксибензиламино)ацетата (пример 10-11а). Выход: 28%. ¹Н ЯМР (ДМСО, 400 МГц): δ 2,12 (с, 3Н), 2,38 (с, 3Н), 4,00 (с, 2Н), 4,45 (с, 2Н), 5,17 (с, 2Н), 6,83 (м, 2Н), 7,10 (м, 2Н), 7,78 (с, 1Н), 8,16 (с, Н), 9,66 (с, Н). ЖХ/МС; [М+Н] ожидаемое значение 382,1; экспериментально 382,2. Как было показано, вышеназванное соединение ингибирует рецептор горького вкуса hT2R08 и имеет IC₅₀ 0,07 мкМ.

Пример 10-11а: метил-2-(2-гидроксибензиламино)ацетат

30 Получали как в примере 10-10а из метилового эфира глицина и 2-гидроксибензальдегида. Выход 40%. МС М+Н рассчитано 196,1; экспериментально 196,1

Пример 10-12: 3-(1-((3,5-диметилизоксазол-4-ил)метил)-1Н-пиразол-4-ил)-1-(4-гидроксибензил)имидазолидин-2,4-дион

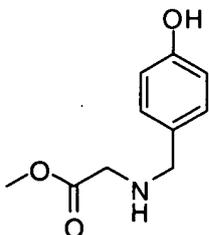
45 Получали как в примере 10-1 из 1-((3,5-диметилизоксазол-4-ил)метил)-1Н-пиразол-4-карбонилазида и метил-2-(4-гидроксибензиламино)ацетата (пример 10-12а). Выход 9%. ¹Н ЯМР (ДМСО, 400 МГц): δ 2,117 (с, 3Н), 2,383 (с, 3Н), 3,918 (с, 2Н), 4,387 (с, 2Н), 5,174 (с, 2Н), 6,719 (J=8,8, д, 2Н), 7,108 (J=8,8, м, 2Н), 7,761 (с, 1Н), 8,154 (с, Н), 9,399 (с,

Н). ЖХ/МС; [M+H] ожидаемое значение 382,1; экспериментально 382,2. Как было показано, вышеназванное соединение ингибирует рецептор горького вкуса hT2R08 и имеет IC₅₀ 0,06 мкМ.

Пример 10-12а: метил-2-(4-гидроксибензиламино)ацетат

5

10

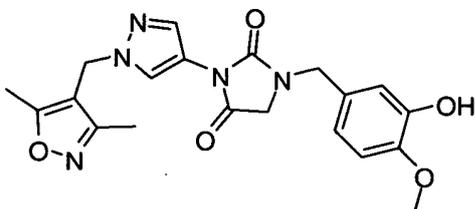


Получали как в примере 10-10а из метилового эфира глицина и 4-гидроксибензальдегида. Выход 40%. МС М+Н рассчитано 196,1; экспериментально 196,1

15

Пример 10-13: 3-(1-((3,5-диметилизоксазол-4-ил)метил)-1Н-пиразол-4-ил)-1-(3-гидрокси-4-метоксибензил)имидазолидин-2,4-дион

20



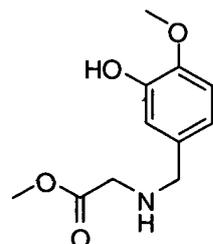
25

Получали как в примере 10-1 из 1-((3,5-диметилизоксазол-4-ил)метил)-1Н-пиразол-4-карбонилазида (пример 10-1а) и метил-2-(3-гидрокси-4-метоксибензиламино)ацетата (пример 10-13а). Выход 22%. ¹Н ЯМР (ДМСО, 400 МГц): δ 2,119 (с, 3Н), 2,383 (с, 3Н), 3,716 (с, 3Н), 3,923 (с, 2Н), 4,361 (с, 2Н), 5,117 (с, 2Н), 6,667 (м, 2Н), 6,863 (J=8,4, д, 1Н), 7,766 (с, Н), 8,159 (с, Н). МС М+Н рассчитано 412,1; экспериментально 412,1. Как было показано, вышеназванное соединение ингибирует рецептор горького вкуса hT2R08 и имеет IC₅₀ 0,1 мкМ.

30

Пример 10-13а: метил-2-(3-гидрокси-4-метоксибензиламино)ацетат

35

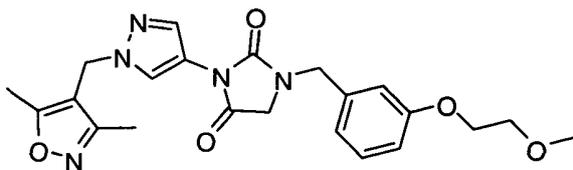


Получали как в примере 10-10а из метилового эфира глицина и 3-гидрокси-4-метоксибензальдегида. Выход 47%. МС М+Н рассчитано 226,1; экспериментально 226,1

40

Пример 10-14: 3-(1-((3,5-диметилизоксазол-4-ил)метил)-1Н-пиразол-4-ил)-1-(3-(2-метоксиэтокси)бензил)имидазолидин-2,4-дион

45

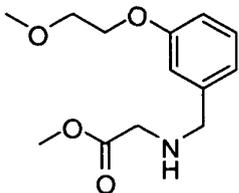


Получали как в примере 10-1 из 1-((3,5-диметилизоксазол-4-ил)метил)-1Н-пиразол-4-карбонилазида (пример 10-1а) и метил-2-(3-(2-метоксиэтокси)бензиламино)ацетата

(пример 10-14а). Выход 27%. ^1H ЯМР (ДМСО, 400 МГц): δ 2,12 (с, 3H), 2,38 (с, 3H), 3,26 (с, 3H), 3,62 (т, $J=4,4$, 2H), 3,98 (с, 2H), 4,06 (т, $J=4,4$, 2H), 4,48 (с, 2H), 5,18 (с, 2H), 6,86 (м, 3H), 7,24 (т, $J=8$, 1H), 7,78 (с, 1H), 8,17 (с, 1H). МС $M+N$ рассчитано 440,2;

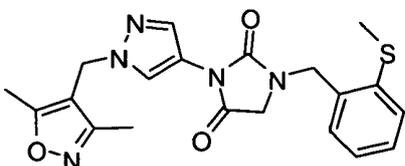
экспериментально 440,2. Как было показано, вышеназванное соединение ингибирует рецептор горького вкуса hT2R08 и имеет IC_{50} 0,07 мкМ.

Пример 10-14а: метил-2-(3-(2-метоксиэтокс)бензиламино)ацетат



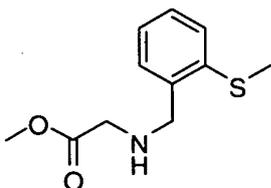
Получали как в примере 10-10а из метилового эфира глицина и 3-(2-метоксиэтокс)бензальдегид. Выход 55%. МС $M+N$ рассчитано 254,1; экспериментально 254,1

Пример 10-15: 3-(1-((3,5-диметилизоксазол-4-ил)метил)-1H-пиразол-4-ил)-1-(2-(метилтио)бензил)имидазолидин-2,4-дион



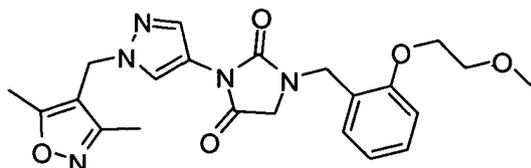
Получали как в примере 10-1 из 1-((3,5-диметилизоксазол-4-ил)метил)-1H-пиразол-4-карбонилазида (пример 10-1а) и метил-2-(2-(метилтио)бензиламино)ацетата (пример 10-15а). Выход 67%. ^1H ЯМР (ДМСО, 400 МГц): δ 2,12 (с, 3H), 2,39 (с, 3H), 2,48 (с, 3H), 3,98 (с, 2H), 4,54 (с, 2H), 5,19 (с, 2H), 7,18 (м, 1H), 7,30 (м, 3H), 7,79 (с, 1H), 8,18 (с, 1H). ЖХ/МС; $[M+N]$ ожидаемое значение 412,1; экспериментально 412,1. Как было показано, вышеназванное соединение ингибирует рецептор горького вкуса hT2R08 и имеет IC_{50} 0,03 мкМ.

Пример 10-15а: метил-2-(2-(метилтио)бензиламино)ацетат



Получали как в примере 10-10а из метилового эфира глицина и 2-(метилтио)бензальдегида. Выход 50%. МС $M+N$ рассчитано 226,1; экспериментально 226,1

Пример 10-16: 3-(1-((3,5-диметилизоксазол-4-ил)метил)-1H-пиразол-4-ил)-1-(2-(2-метоксиэтокс)бензил)имидазолидин-2,4-дион

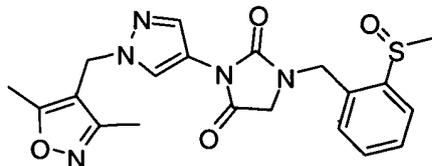


Получали как в примере 10-5 из 3-(1-((3,5-диметилизоксазол-4-ил)метил)-1H-пиразол-4-ил)-1-(2-гидроксибензил)имидазолидин-2,4-диола (пример 10-11) и 2-

бромэтилметилового эфира. Выход 19%. ^1H ЯМР (ДМСО, 400 МГц): δ 2,11 (с, 3H), 2,08 (с, 3H), 3,25 (с, 3H), 3,64 (т, $J=3,6$, 2H), 4,00 (с, 2H), 4,11 (т, $J=3,2$, 2H), 4,27 (с, 2H), 5,17 (с, 2H), 6,90 (м, 1H), 7,00 (м, 1H), 7,26 (м, 2H), 7,76 (с, 1H), 8,15 (с, 1H). Как было показано,

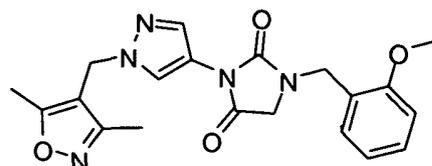
вышеназванное соединение ингибирует рецептор горького вкуса hT2R08 и имеет IC₅₀ 0,1 мкМ.

Пример 10-17: 3-(1-((3,5-диметилизоксазол-4-ил)метил)-1H-пиразол-4-ил)-1-(2-(метилсульфинил)бензил)имидазолидин-2,4-дион



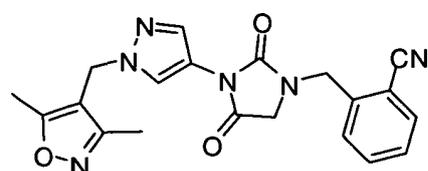
В 20-мл сосуде для применения в микроволновой системе растворяли 3-(1-((3,5-диметилизоксазол-4-ил)метил)-1H-пиразол-4-ил)-1-(2-(метилтио)бензил)имидазолидин-2,4-дион (пример 10-15) (70 мг, 0,17 ммоль) и м-ХПБК (м-хлорпербензойную кислоту) (58 мг, 0,34 ммоль) в дихлорметане при 0°C. Реакционную смесь перемешивали при 0°C и оставляли нагреваться до комнатной температуры в течение 4 часов. Растворитель реакции удаляли под вакуумом, и неочищенный продукт растворяли в 1 мл этанола и очищали методом ВЭЖХ Varian (10-95% ацетонитрил/вода; 25 минут). Очищенные фракции испаряли под вакуумом с получением вышеуказанного соединения. МС М+Н рассчитано 428,1; экспериментально 428,1. Как было показано, вышеуказанное соединение ингибирует рецептор горького вкуса hT2R08 и имеет IC₅₀ 0,4 мкМ. Выход: 12 мг, 17%.

Пример 10-18: 3-(1-((3,5-диметилизоксазол-4-ил)метил)-1H-пиразол-4-ил)-1-(2-метоксibenзил)имидазолидин-2,4-дион



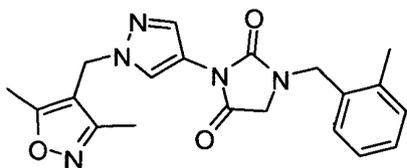
Получали как в примере 10-5 из 3-(1-((3,5-диметилизоксазол-4-ил)метил)-1H-пиразол-4-ил)имидазолидин-2,4-диона (пример 10-1) и 1-(бромметил)-2-метоксибензола (199 мг, 1 ммоль). Выход: 33%. МС М+Н рассчитано 396,1; экспериментально 396,1. Как было показано, вышеуказанное соединение ингибирует рецептор горького вкуса hT2R08 и имеет IC₅₀ 0,06 мкМ.

Пример 10-19: 2-((3-(1-((3,5-диметилизоксазол-4-ил)метил)-1H-пиразол-4-ил)-2,4-диоксиимидазолидин-1-ил)метил)бензонитрил



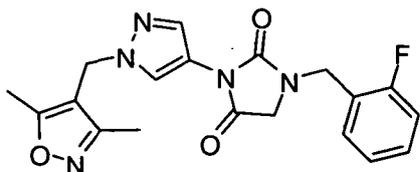
Получали как в примере 10-5 из 3-(1-((3,5-диметилизоксазол-4-ил)метил)-1H-пиразол-4-ил)имидазолидин-2,4-диона (пример 10-1) и 2-(бромметил)бензонитрила. Выход: 27%. МС М+Н рассчитано 391,1; экспериментально 391,1. Как было показано, вышеуказанное соединение ингибирует рецептор горького вкуса hT2R08 и имеет IC₅₀ 0,5 мкМ.

Пример 10-20: 3-(1-((3,5-диметилизоксазол-4-ил)метил)-1H-пиразол-4-ил)-1-(2-метилбензил)имидазолидин-2,4-дион



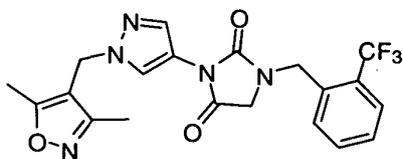
5 Получали как в примере 10-5 из 3-(1-((3,5-диметилизоксазол-4-ил)метил)-1H-пиразол-4-ил)имидазолидин-2,4-диона (пример 10-1) и 1-(бромметил)-2-метилбензола. Выход: 21%. МС М+Н рассчитано 380,1; экспериментально 380,1. Как было показано, вышеназванное соединение ингибирует рецептор горького вкуса hT2R08 и имеет IC₅₀ 0,1 мкМ.

10 **Пример 10-21: 3-(1-((3,5-диметилизоксазол-4-ил)метил)-1H-пиразол-4-ил)-1-(2-фторбензил)имидазолидин-2,4-дион**



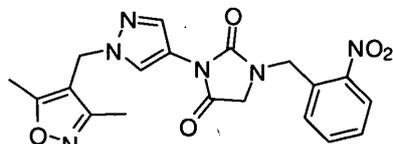
15 Получали как в примере 10-5 из 3-(1-((3,5-диметилизоксазол-4-ил)метил)-1H-пиразол-4-ил)имидазолидин-2,4-диона (пример 10-1) и 1-(бромметил)-2-фторбензола. Выход 42%. МС М+Н рассчитано 384,1; экспериментально 384,1. Как было показано, вышеназванное соединение ингибирует рецептор горького вкуса hT2R08 и имеет IC₅₀ 0,08 мкМ.

20 **Пример 10-22: 3-(1-((3,5-диметилизоксазол-4-ил)метил)-1H-пиразол-4-ил)-1-(2-(трифторметил)бензил)имидазолидин-2,4-дион**



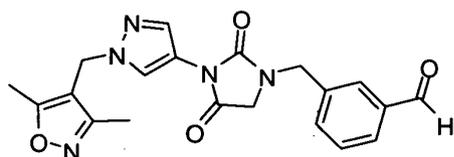
25 Получали как в примере 10-5 из 3-(1-((3,5-диметилизоксазол-4-ил)метил)-1H-пиразол-4-ил)имидазолидин-2,4-диона (пример 10-1) и 1-(бромметил)-2-(трифторметил)бензола. Выход: 37%. МС М+Н рассчитано 434,1; экспериментально 434,1. Как было показано, вышеназванное соединение ингибирует рецептор горького вкуса hT2R08 и имеет IC₅₀ 0,2 мкМ.

30 **Пример 10-23: 3-(1-((3,5-диметилизоксазол-4-ил)метил)-1H-пиразол-4-ил)-1-(2-нитробензил)имидазолидин-2,4-дион**



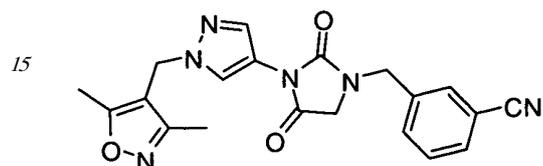
35 Получали как в примере 10-5 из 3-(1-((3,5-диметилизоксазол-4-ил)метил)-1H-пиразол-4-ил)имидазолидин-2,4-диона (пример 10-1) и 1-(бромметил)-2-нитробензола. Выход 22%. МС М+Н рассчитано 411,1; экспериментально 411,1. Как было показано, вышеназванное соединение ингибирует рецептор горького вкуса hT2R08 и имеет IC₅₀ 0,07 мкМ.

40 **Пример 10-24: 3-((3-(1-((3,5-диметилизоксазол-4-ил)метил)-1H-пиразол-4-ил)-2,4-диоксоимидазолидин-1-ил)метил)бензальдегид**



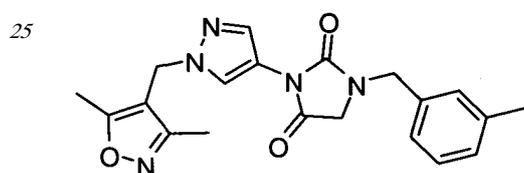
5 Получали как в примере 10-5 из 3-(1-((3,5-диметилизоксазол-4-ил)метил)-1Н-пиразол-4-ил)имидазолидин-2,4-диона (пример 10-1) и 3-(бромметил)бензальдегида. Выход: 35%.
¹Н ЯМР (ДМСО, 400 МГц): δ 2,123 (с, 3Н), 2,388 (с, 3Н), 4,035 (с, 2Н), 4,631 (с, 2Н), 5,186 (с, 2Н), 7,581 (м, 1Н), 7,643 (м, 1Н), 7,787 (м, 3Н), 8,178 (с, Н), 9,997 (с, Н). Как было
 10 показано, вышеназванное соединение ингибирует рецептор горького вкуса hT2R08 и имеет IC₅₀ 0,2 мкМ.

Пример 10-25: 3-((3-(1-((3,5-диметилизоксазол-4-ил)метил)-1Н-пиразол-4-ил)-2,4-диоксоимидазолидин-1-ил)метил)бензонитрил



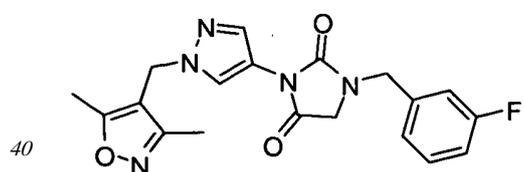
15 Получали как в примере 10-5 из 3-(1-((3,5-диметилизоксазол-4-ил)метил)-1Н-пиразол-4-ил)имидазолидин-2,4-диона (пример 10-1) и 3-(бромметил)бензонитрила. Выход 21%.
 20 МС М+Н рассчитано 411,1; экспериментально 411,1. Как было показано, вышеназванное соединение ингибирует рецептор горького вкуса hT2R08 и имеет IC₅₀ 1 мкМ.

Пример 10-26: 3-(1-((3,5-диметилизоксазол-4-ил)метил)-1Н-пиразол-4-ил)-1-(3-метилбензил)имидазолидин-2,4-дион



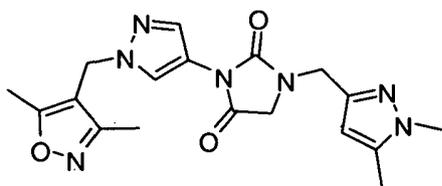
25 Получали как в примере 10-5 из 3-(1-((3,5-диметилизоксазол-4-ил)метил)-1Н-пиразол-4-ил)имидазолидин-2,4-диона (пример 10-1) и 1-(бромметил)-3-метилбензола. Выход
 30 25%. МС М+Н рассчитано 380,1; экспериментально 380,1. Как было показано, вышеназванное соединение ингибирует рецептор горького вкуса hT2R08 и имеет IC₅₀
 0,02 мкМ.

Пример 10-27: 3-(1-((3,5-диметилизоксазол-4-ил)метил)-1Н-пиразол-4-ил)-1-(3-фторбензил)имидазолидин-2,4-дион



35 Получали как в примере 10-5 из 3-(1-((3,5-диметилизоксазол-4-ил)метил)-1Н-пиразол-4-ил)имидазолидин-2,4-диона (пример 10-1) и 1-(бромметил)-3-фторбензола. Выход
 40 27%. МС М+Н рассчитано 384,1; экспериментально 384,1. Как было показано, вышеназванное соединение ингибирует рецептор горького вкуса hT2R08 и имеет IC₅₀
 45 0,06 мкМ.

Пример 10-28: 1-((1,5-диметил-1Н-пиразол-3-ил)метил)-3-(1-((3,5-диметилизоксазол-4-ил)метил)-1Н-пиразол-4-ил)имидазолидин-2,4-дион



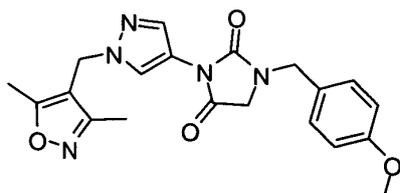
5

Получали как в примере 10-5 из 3-(1-((3,5-диметилизоксазол-4-ил)метил)-1Н-пиразол-4-ил)имидазолидин-2,4-диона (пример 10-1) и 3-(бромметил)-1,5-диметил-1Н-пиразола. Выход: 22%. МС М+Н рассчитано 384,1; экспериментально 384,1. Как было показано, вышеназванное соединение ингибирует рецептор горького вкуса hT2R08 и имеет IC₅₀

10

0,3 мкМ

Пример 10-29: 3-(1-((3,5-диметилизоксазол-4-ил)метил)-1Н-пиразол-4-ил)-1-(4-метоксибензил)имидазолидин-2,4-дион



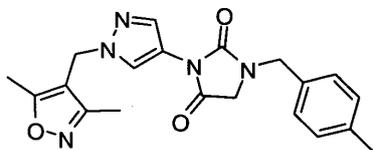
15

Получали как в примере 10-5 из 3-(1-((3,5-диметилизоксазол-4-ил)метил)-1Н-пиразол-4-ил)имидазолидин-2,4-диона (пример 10-1) и 1-(бромметил)-4-метоксибензола. Выход 19%. МС М+Н рассчитано 396,1; экспериментально 396,1. Как было показано, вышеназванное соединение ингибирует рецептор горького вкуса hT2R08 и имеет IC₅₀ 0,07 мкМ.

20

Пример 10-30: 3-(1-((3,5-диметилизоксазол-4-ил)метил)-1Н-пиразол-4-ил)-1-(4-метилбензил)имидазолидин-2,4-дион

25

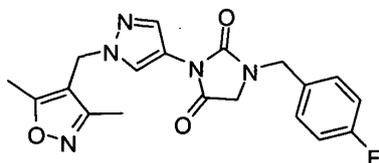


30

Получали как в примере 10-5 из 3-(1-((3,5-диметилизоксазол-4-ил)метил)-1Н-пиразол-4-ил)имидазолидин-2,4-диона (пример 10-1) и 1-(бромметил)-4-метилбензола. Выход 25%. МС М+Н рассчитано 380,1; экспериментально 380,1. Как было показано, вышеназванное соединение ингибирует рецептор горького вкуса hT2R08 и имеет IC₅₀ 0,06 мкМ.

35

Пример 10-31: 3-(1-((3,5-диметилизоксазол-4-ил)метил)-1Н-пиразол-4-ил)-1-(4-фторбензил)имидазолидин-2,4-дион

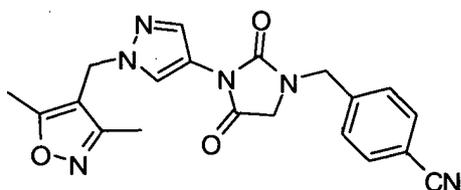


40

Получали как в примере 10-5 из 3-(1-((3,5-диметилизоксазол-4-ил)метил)-1Н-пиразол-4-ил)имидазолидин-2,4-диона (пример 10-1) и 1-(бромметил)-4-фторбензола. Выход 33%. МС М+Н рассчитано 384,1; экспериментально 384,1. Как было показано, вышеназванное соединение ингибирует рецептор горького вкуса hT2R08 и имеет IC₅₀ 0,05 мкМ.

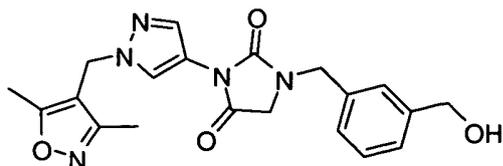
45

Пример 10-32: 4-((3-(1-((3,5-диметилизоксазол-4-ил)метил)-1Н-пиразол-4-ил)-2,4-диоксиимидазолидин-1-ил)метил)бензонитрил



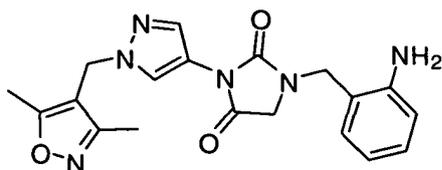
5 Получали как в примере 10-5 из 3-(1-((3,5-диметилизоксазол-4-ил)метил)-1Н-пиразол-4-ил)имидазолидин-2,4-диона (пример 10-1) и 4-(бромметил)бензонитрила. Выход 21%. МС М+Н рассчитано 391,1; экспериментально 391,2. Как было показано, вышеназванное соединение ингибирует рецептор горького вкуса hT2R08 и имеет IC₅₀ 0,05 мкМ.

10 **Пример 10-33: 3-(1-((3,5-диметилизоксазол-4-ил)метил)-1Н-пиразол-4-ил)-1-(3-(гидроксиметил)бензил)имидазолидин-2,4-дион**



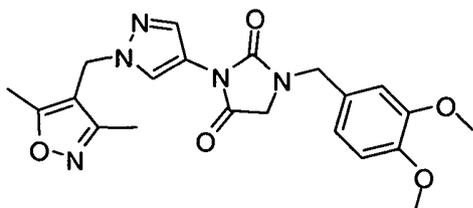
15 3-((3-(1-((3,5-Диметилизоксазол-4-ил)метил)-1Н-пиразол-4-ил)-2,4-диоксиимидазолидин-1-ил)метил)бензальдегид (пример 10-24) (131 мг, 0,3 ммоль) растворяли в 2 мл этанола. Раствор пропускали через аппарат H-Cube при комнатной температуре, применяя 10% Pd/C катализатор при скорости потока 1 мл/минута. Собранную фракцию концентрировали, повторно растворяли в 2 мл этанола и очищали методом ВЭЖХ (10-95% ацетонитрил/вода, 25 минут). Очищенные фракции объединяли и концентрировали с получением вышеназванного соединения. ¹Н ЯМР (ДМСО, 400 МГц): δ 2,123 (с, 3Н), 2,388 (с, 3Н), 3,978 (с, 2Н), 4,516 (с, 2Н), 5,182 (с, 2Н), 7,242 (м, 4Н), 7,779 (с, 1Н), 8,172 (с, 1Н), 8,505 (с, 1Н). МС М+Н рассчитано 396,1; экспериментально 396,1. Как было показано, вышеназванное соединение ингибирует рецептор горького вкуса hT2R08 и имеет IC₅₀ 0,3 мкМ. Выход: 24 мг, 18%.

30 **Пример 10-34: 1-(2-аминобензил)-3-(1-((3,5-диметилизоксазол-4-ил)метил)-1Н-пиразол-4-ил)имидазолидин-2,4-дион**



35 3-(1-((3,5-Диметилизоксазол-4-ил)метил)-1Н-пиразол-4-ил)-1-(2-нитробензил)имидазолидин-2,4-дион (пример 10-23) (126 мг, 0,3 ммоль) растворяли в 2 мл этанола. Раствор пропускали через аппарат H-Cube при комнатной температуре, применяя 10% Pd/C катализатор при скорости потока 1 мл/минута. Собранную фракцию концентрировали, повторно растворяли в 2 мл этанола и очищали методом ВЭЖХ (10-95% ацетонитрил/вода, 25 минут). Очищенные фракции объединяли и концентрировали с получением вышеназванного соединения. Выход 26%. МС М+Н рассчитано 381,1; экспериментально 381,1. Как было показано, вышеназванное соединение ингибирует рецептор горького вкуса hT2R08 и имеет IC₅₀ 0,02 мкМ.

45 **Пример 10-35: 1-(3,4-диметоксибензил)-3-(1-((3,5-диметилизоксазол-4-ил)метил)-1Н-пиразол-4-ил)имидазолидин-2,4-дион**



5

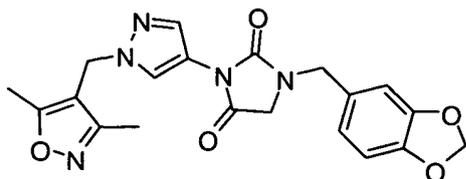
3-(1-((3,5-Диметилизоксазол-4-ил)метил)-1Н-пиразол-4-ил)имидазолидин-2,4-дион (пример 10-1) (275 мг, 1 ммоль), (3,4-диметоксифенил)метанол (201 мг, 1,2 ммоль), N,N,N,N-тетраметилазодикарбоксамид (344 мг, 2 ммоль) растворяли в 2 мл безводного ТГФ. Добавляли трибутилфосфин (404 мг, 2 ммоль) и помещали реакционную смесь в микроволновый реактор на 5 минут при 90°C. Реакционную смесь фильтровали, концентрировали и очищали методом ВЭЖХ (10-95% ацетонитрил/вода, 25 минут) с получением вышеназванного соединения. Выход: 25 мг, 6%. ¹Н ЯМР (ДМСО, 400 МГц): δ 2,119 (с, 3Н), 2,385 (с, 3Н), 3,724 (*J*=6,4 д, 6Н), 3,946 (с, 2Н), 4,435 (с, 2Н), 5,178 (с, 2Н), 6,885 (м, 3Н), 7,776 (с, 1Н), 8,166 (с, 1Н). МС М+Н рассчитано 426,1; экспериментально 426,1. Как было показано, вышеназванное соединение ингибирует рецептор горького вкуса hT2R08 и имеет IC₅₀ 0,06 мкМ.

10

15

Пример 10-36: 1-(бензо[d][1,3]диоксол-5-илметил)-3-(1-((3,5-диметилизоксазол-4-ил)метил)-1Н-пиразол-4-ил)имидазолидин-2,4-дион

20



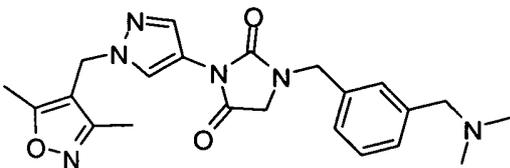
25

30

Получали как в примере 10-35 из 3-(1-((3,5-диметилизоксазол-4-ил)метил)-1Н-пиразол-4-ил)имидазолидин-2,4-диона (пример 10-1) и бензо[d][1,3]диоксол-5-илметанола. Выход: 19%. ¹Н ЯМР (ДМСО, 400 МГц): δ 2,143 (с, 3Н), 2,408 (с, 3Н), 3,977 (с, 2Н), 4,440 (с, 2Н), 5,202 (с, 2Н), 6,003 (с, 2Н), 6,897 (м, 3Н), 7,788 (с, 1Н), 8,181 (с, 1Н). МС М+Н рассчитано 410,1; экспериментально 410,1. Как было показано, вышеназванное соединение ингибирует рецептор горького вкуса hT2R08 и имеет IC₅₀ 0,07 мкМ.

Пример 10-37: 1-(3-((диметиламино)метил)бензил)-3-(1-((3,5-диметилизоксазол-4-ил)метил)-1Н-пиразол-4-ил)имидазолидин-2,4-дион

35



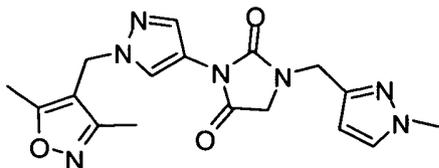
40

45

3-(1-((3,5-диметилизоксазол-4-ил)метил)-1Н-пиразол-4-ил)имидазолидин-2,4-дион (пример 10-1) (275 мг, 1 ммоль), 1,3-бис(бромметил)бензол (263 мг, 1 ммоль) и карбонат цезия (325 мг, 1 ммоль) растворяли в 2 мл ДМФ и облучали в микроволновом реакторе при 165°C в течение 5 минут. Реакционную смесь охлаждали до комнатной температуры и удаляли осадок в виде соли с помощью фильтрования. Прозрачный раствор, содержащий неочищенный продукт, концентрировали и повторно растворяли в этилацетате. Органический раствор дважды промывали водой, а затем соевым раствором. Органическую фазу сушили над сульфатом натрия и испаряли с получением неочищенного продукта, который переносили на следующую стадию без дальнейшей очистки или анализа. 1-(3-(Бромметил)бензил)-3-(1-((3,5-диметилизоксазол-4-ил)метил)-1Н-пиразол-4-ил)имидазолидин-2,4-дион (пример 42а) (152 мг, 0,3 ммоль), диметиламин

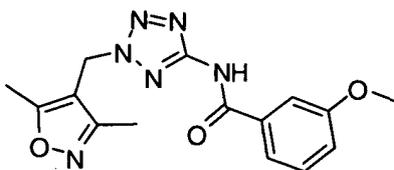
(2 М раствор в ТГФ) (1,5 мл, 3 ммоль) и гидрид натрия (9 мг, 0,36 ммоль) растворяли в 1 мл безводного ТГФ. Реакционную смесь помещали в микроволновый реактор на 5 минут при 120°C. Неочищенный продукт повторно растворяли в 2 мл этанола и очищали методом ВЭЖХ (10-95% ацетонитрил/вода, 25 минут) с получением 1-(3-((диметиламино)метил)бензил)-3-(1-((3,5-диметилизоксазол-4-ил)метил)-1Н-пиразол-4-ил)имидазолидин-2,4-диона (16 мг, 13%). МС М+Н рассчитано 423,1; экспериментально 423,1. Как было показано, вышеназванное соединение ингибирует рецептор горького вкуса hT2R08 и имеет IC₅₀ 1,2 мкМ.

Пример 10-38: 3-(1-((3,5-диметилизоксазол-4-ил)метил)-1Н-пиразол-4-ил)-1-((1-метил-1Н-пиразол-3-ил)метил)имидазолидин-2,4-дион



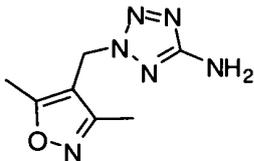
Получали как в примере 10-5 из 3-(1-((3,5-диметилизоксазол-4-ил)метил)-1Н-пиразол-4-ил)имидазолидин-2,4-диона (пример 10-1) и 3-(бромметил)-1-метил-1Н-пиразола. Выход 19%. МС М+Н рассчитано 370,1; экспериментально 370. Как было показано, вышеназванное соединение ингибирует рецептор горького вкуса hT2R08 и имеет IC₅₀ 0,4 мкМ.

Пример 10-39: N-(2-((3,5-диметилизоксазол-4-ил)метил)-2Н-тетразол-5-ил)-3-метоксибензамид



2-((3,5-Диметилизоксазол-4-ил)метил)-2Н-тетразол-5-амин (пример 10-39а) (102 мг, 0,528 ммоль), 3-метоксибензоил хлорид (0,065 мл, 0,528 ммоль) и пиридин (0,043 мл, 0,528 ммоль) в ацетонитриле (3 мл) перемешивали при 100°C в течение одного часа. Реакционную смесь разбавляли дихлорметаном (30 мл) и промывали солевым раствором (30 мл). Органические вещества сушили над сульфатом натрия, концентрировали и очищали методом обращенно-фазовой ВЭЖХ (система растворителей: ацетонитрил/вода, 10%-100% градиент, 25-минутная серия), получая N-(2-((3,5-диметилизоксазол-4-ил)метил)-2Н-тетразол-5-ил)-3-метоксибензамид в виде белого кристаллического твердого вещества (60 мг, 35% выход) МС М+Н рассчитано 329,1, экспериментально 329. ¹Н ЯМР (400 МГц, ДМСО-d₆): δ 2,02 (с, 3Н), 2,46 (с, 3Н), 3,81 (с, 3Н), 5,78 (с, 2Н), 7,16 (м, 1Н), 7,42 (т, J=8 Гц, 2Н), 7,54 (м, 1Н), 11,3 (с, 1Н). IC₅₀ для указанного соединения при ингибировании рецептора горького вкуса hT2R8 составила 1,87 мкМ.

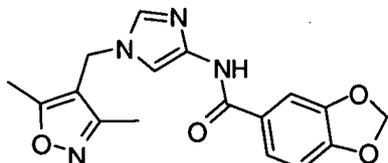
Пример 10-39а: 2-((3,5-диметилизоксазол-4-ил)метил)-2Н-тетразол-5-амин



2Н-тетразол-5-амин (1,29 г, 12,5 ммоль), 4-(хлорметил)-3,5-диметилизоксазол (1,56 мл, 12,5 ммоль) и карбонат калия (1,73 г, 15,5 ммоль) в ДМФ (20 мл) нагревали до 80°C при перемешивании в течение 16 часов. Реакционную смесь охлаждали до комнатной температуры, разбавляли дихлорметаном (100 мл) и промывали последовательно

солевым раствором и водой. Органические вещества сушили над сульфатом натрия и концентрировали с помощью роторного испарителя. Неочищенный продукт очищали методом хроматографии на силикагеле (0-10% градиент этилацетат/дихлорметан), получая 2-((3,5-диметилизоксазол-4-ил)метил)-2H-тетразол-5-амин в виде белого кристаллического твердого вещества (970 мг, 40% выход). МС М+Н рассчитано 195,1, экспериментально 195.

Пример 10-40: N-(1-((3,5-диметилизоксазол-4-ил)метил)-1H-имидазол-4-ил)бензо[d][1,3]диоксол-5-карбоксамид



1-((3,5-Диметилизоксазол-4-ил)метил)-1H-имидазол-4-амин (пример 10-40а) (110 мг, 0,57 ммоль), бензо[d][1,3]диоксол-5-карбонил хлорид (105 мг, 0,57 ммоль) и триэтиламин (90 мкл, 0,69 ммоль) в дихлорметане перемешивали в течение 16 часов. Реакционную смесь разбавляли дихлорметаном (30 мл) и промывали последовательно солевым раствором и водой. Органические вещества сушили над сульфатом натрия и концентрировали путем роторного испарения. Неочищенный продукт очищали методом обращенно-фазовой ВЭЖХ (система растворителей: ацетонитрил/вода, 10%-100% градиент, 25-минутная серия) с получением N-(1-((3,5-диметилизоксазол-4-ил)метил)-1H-имидазол-4-ил)бензо[d][1,3]диоксол-5-карбоксамид в виде белого кристаллического твердого вещества (32 мг, 15% выход). МС М+Н рассчитано 341,3, экспериментально 341,3. ¹H ЯМР (400 МГц, ДМСО-d₆): δ 2,08 (с, 3H), 2,41 (с, 3H), 5,02 (с, 2H), 6,07 (с, 2H), 6,95 (д, J=8,4 Гц, 1H), 7,27 (д, J=1,6 Гц, 1H), 7,54 (м, 3H), 10,6 (с, 1H). IC₅₀ для указанного соединения при ингибировании рецептора горького вкуса hT2R8 составила 12,1 мкМ.

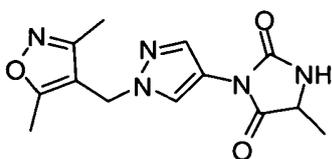
Пример 10-40а: 1-((3,5-диметилизоксазол-4-ил)метил)-1H-имидазол-4-амин

3,5-Диметил-4-((4-нитро-1H-имидазол-1-ил)метил)изоксазол (пример 10-40b) (1,0 г, 4,5 ммоль) и 10% палладий-на-древесном угле (200 мг) в метаноле (40 мл) встряхивали на аппарате для встряхивания Парра при давлении водорода 2,5 бар в течение 2 часов. После фильтрования через слой целита с последующим роторным испарением получали 1-((3,5-диметилизоксазол-4-ил)метил)-1H-имидазол-4-амин в виде желтовато-красного твердого вещества (800 мг, 93% выход). МС М+Н рассчитано 193, экспериментально 193.

Пример 10-40b: 3,5-диметил-4-((4-нитро-1H-имидазол-1-ил)метил)изоксазол

3,5-Диметил-4-((4-нитро-1H-имидазол-1-ил)метил)изоксазол получали способом, аналогичным описанному в примере 10-41с, путем алкилирования 4-нитро-1H-имидазола, получая 3,5-диметил-4-((4-нитро-1H-имидазол-1-ил)метил)изоксазол в виде белого кристаллического твердого вещества (5,0 г, 80% выход). МС М+Н рассчитано 223, экспериментально 223. ¹H ЯМР (400 МГц, ДМСО-d₆): δ, млн. частей: 2,09 (с, 3H), 2,43 (с, 3H), 5,15 (с, 2H), 7,90 (д, J=1,6 Гц, 1H), 8,35 (д, J=1,9 Гц, 1H).

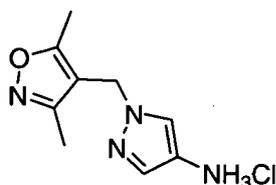
Пример 10-41: 3-(1-((3,5-диметилизоксазол-4-ил)метил)-1H-пиразол-4-ил)-5-метилимидазолидин-2,4-дион



1-((3,5-Диметилизоксазол-4-ил)метил)-1H-пиразол-4-амина гидрохлорид (пример 10-

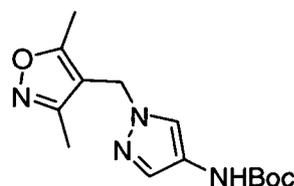
41a) (1,0 г, 5,20 ммоль), этил-2-изоцианатпропионат (0,745 г, 5,20 ммоль) и триэтиламин (1,5 мл, 10,4 ммоль) смешивали в EtOH (20 мл). Реакционную смесь кипятили с обратным холодильником в течение 12 часов и затем оставляли охлаждаться до комнатной температуры. Растворитель удаляли под вакуумом, при этом через некоторое время формировались кристаллы. Кристаллы собирали и промывали гексаном с получением 3-(1-((3,5-диметилизоксазол-4-ил)метил)-1H-пиразол-4-ил)-5-метилимидазолидин-2,4-диона при 80% выходе в виде белого твердого вещества. ^1H ЯМР (ДМСО- d_6 , 400 МГц): δ 1,53-1,51 (д, 3H), 2,19 (с, 3H), 2,42 (с, 3H), 4,21-4,19 (м, 1H), 5,06 (с, 2H), 6,00 (ушир.с, 1H), 7,90 (с, 1H), 8,05 (с, 1H). Как было показано, вышеназванное соединение ингибирует рецептор горького вкуса hT2R08 и имеет IC_{50} 1,3 мкМ.

Пример 10-41a: 1-((3,5-диметилизоксазол-4-ил)метил)-1H-пиразол-4-амин гидрохлорид



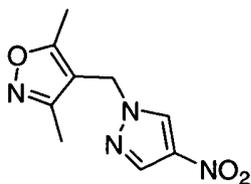
Трет-бутил-1-((3,5-диметилизоксазол-4-ил)метил)-1H-пиразол-4-илкарбамат (пример 10-41b) (592 мг, 2 ммоль) перемешивали в растворе 4N HCl в диоксане (20 мл) при температуре окружающей среды в течение 2 часов. Растворитель удаляли, и остаток растворяли в 1/1 смеси этилацетат/гексан (30 мл) и дважды концентрировали. Твердое вещество растирали в порошок с гексаном и собирали с помощью фильтрования, получая 1-((3,5-диметилизоксазол-4-ил)метил)-1H-пиразол-4-амин гидрохлорид (500 мг, 99%) в виде белого твердого вещества. ^1H ЯМР (ДМСО- d_6 , 400 МГц): δ 2,11 (с, 3H), 2,38 (с, 3H), 5,16 (с, 2H), 7,51 (с, 1H), 8,03 (с, 1H), 10,27 (ушир.с, 3H).

Пример 10-41b: трет-бутил 1-((3,5-диметилизоксазол-4-ил)метил)-1H-пиразол-4-илкарбамат



3,5-Диметил-4-((4-нитро-1H-пиразол-1-ил)метил)изоксазол (пример 10-41c) (12 г, 53,8 ммоль) и ВОС ангидрид (12,8 г, 64 ммоль) растворяли в 3/1/1 смеси MeOH/EtOH/ТГФ (300 мл) в реакционной колбе Парра, а затем добавляли 10% Pd/C (1,5 г). Смесь встряхивали в гидрогенизаторе Парра при 2 атмосферах водорода в течение 3 часов. Смесь фильтровали через 3-дюймовый слой целита и концентрировали на роторном испарителе. Масло розового цвета очищали методом хроматографии на силикагеле (25% этилацетат в гексане) с получением трет-бутил-1-((3,5-диметилизоксазол-4-ил)метил)-1H-пиразол-4-илкарбамата (12,6 г, 80%) в виде розового/красного масла, которое затвердевало при стоянии с образованием светло-розового твердого вещества. ^1H ЯМР (CDCl_3 , 400 МГц): δ 1,41 (с, 9H), 2,10 (с, 3H), 2,32 (с, 3H), 4,90 (с, 2H), 6,19 (ушир.с, 1H), 7,19 (с, 1H), 7,50 (с, 1H).

Пример 10-41c: 3,5-диметил-4-((4-нитро-1H-пиразол-1-ил)метил)изоксазол



5

1H-пиразол (10 г, 147 ммоль) добавляли маленькими порциями к концентрированной H₂SO₄ (100 мл), охлаждали до 0°C с помощью бани лед/вода, поддерживая температуру внутри сосуда ниже 40°C. Осторожно по каплям добавляли к реакционной смеси концентрированную HNO₃ (10 мл), поддерживая температуру внутри сосуда ниже 55°C.

10

Затем реакционную смесь нагревали до 55°C и перемешивали в течение 5 часов. Смесь охлаждали до 0°C и осторожно подщелачивали (pH~8) водным раствором NaOH (110 г NaOH в 150 мл H₂O) до образования белого осадка, тщательно поддерживая температуру раствора ниже 40°C. Белое твердое вещество собирали с помощью

15

фильтрования и промывали этилацетатом/гексаном (1/3), затем высушивали в вакууме с получением 4-нитро-1H-пиразола (7 г, 42% выход выделенного продукта). ¹³C ЯМР

(ДМСО-d₆, 137,0, 126,4. К 4-нитро-1H-пиразолу (9 г, 80 ммоль) в ДМФ (100 мл, 100

МГц) δ добавляли карбонат цезия (26 г, 80 ммоль), а затем добавляли 4-(хлорметил)-

3,5-диметилизоксазол (12,3 г, 85 ммоль). Реакционную смесь перемешивали в ДМФ

20

(100 мл) при 80°C в течение 30 минут, затем охлаждали, разбавляли H₂O (150 мл) и

экстрагировали этилацетатом (3x, 75 мл). Объединенные органические фазы сушили

над сульфатом натрия, фильтровали и концентрировали. Остаток переносили в

этилацетат (200 мл) и промывали H₂O (2x, 100 мл). Органическую фазу сушили над

25

сульфатом натрия, фильтровали и концентрировали. Твердый продукт растирали в

порошок с этилацетатом/гексаном (1/9) и собирали посредством фильтрации. Продукт

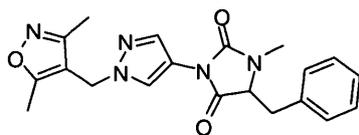
высушивали в глубоком вакууме с получением 3,5-диметил-4-((4-нитро-1H-пиразол-1-

ил)метил)изоксазола (12 г, 67%) в виде светло-желтого твердого вещества. ¹H ЯМР

(CDCl₃, 400 МГц): δ 2,23 (с, 3H), 2,46 (с, 3H), 5,08 (с, 2H), 8,02 (с, 1H), 8,08 (с, 1H).

30

Пример 10-42: 5-бензил-3-(1-((3,5-диметилизоксазол-4-ил)метил)-1H-пиразол-4-ил)-1-метилимидазолидин-2,4-дион



35

Получали как в примере 10-5 из 5-бензил-3-(1-((3,5-диметилизоксазол-4-ил)метил)-

1H-пиразол-4-ил)имидазолидин-2,4-диона (пример 10-2) и йодметана. Выход: 95%. ¹H

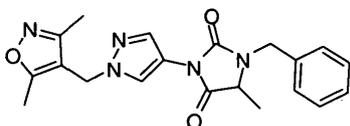
ЯМР (CDCl₃, 400 МГц): δ 2,04 (с, 3H), 2,15 (с, 3H), 2,96 (с, 3H), 3,24-3,23 (м, 2 H, J=4,0

40

Гц), 4,23-4,21 (м, 1H), 5,00 (с, 2H), 7,24-7,23 (м, 5H, J=4,0 Гц), 7,70 (с, 1H), 7,87 (с, 1H).

Как было показано, вышеназванное соединение ингибирует рецептор горького вкуса hT2R08 и имеет IC₅₀ 0,15 мкМ.

Пример 10-43: 1-бензил-3-(1-((3,5-диметилизоксазол-4-ил)метил)-1H-пиразол-4-ил)-5-метилимидазолидин-2,4-дион

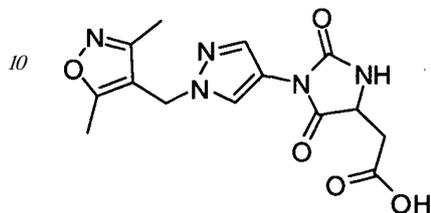


45

Получали как в примере 10-5 из 3-(1-((3,5-диметилизоксазол-4-ил)метил)-1H-пиразол-

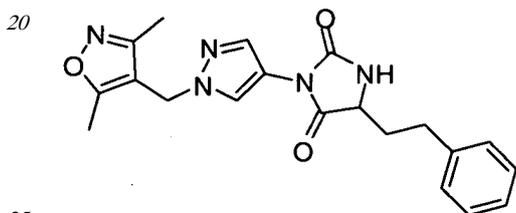
4-ил)-5-метилимидазолидин-2,4-диона (пример 10-41) и бензилбромида. Выход: 50%.
 ^1H ЯМР (CDCl_3 , 400 МГц): δ 1,44 (с, 3H), 2,19 (с, 3H), 3,88 (с, 3H), 4,18 (д, $J=8$ Гц, 2H),
 4,22 (т, 1H, $J=4$ Гц), 5,06 (с, 2H), 7,39-7,29 (м, 5H), 7,94 (с, 1H), 8,10 (с, 1H). Как было
 5 показано, вышеназванное соединение ингибирует рецептор горького вкуса hT2R08 и
 имеет IC_{50} 0,02 мкМ.

**Пример 10-44: 2-(1-(1-((3,5-диметилизоксазол-4-ил)метил)-1H-пиразол-4-ил)-2,5-
 диоксоимидазолидин-4-ил)уксусная кислота**



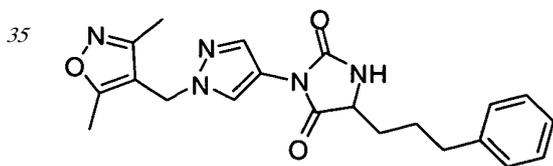
15 Получали как в примере 10-1 из 1-((3,5-диметилизоксазол-4-ил)метил)-1H-пиразол-
 4-карбонилазида (пример 10-1а) и Н-Asp-ОМе. Выход: 85%. МС М+Н рассчитано 334,1;
 экспериментально 334,1

**Пример 10-45: 3-(1-((3,5-диметилизоксазол-4-ил)метил)-1H-пиразол-4-ил)-5-
 фенетилимидазолидин-2,4-дион**



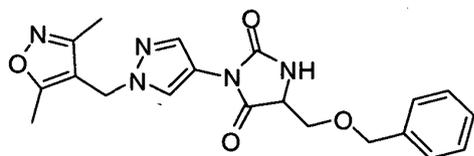
25 Получали как в примере 10-1 из 1-((3,5-диметилизоксазол-4-ил)метил)-1H-пиразол-
 4-карбонилазида (пример 10-1а) и метил-2-амино-4-фенилбутаноата. Выход: 15%. ^1H
 ЯМР (CDCl_3 , 400 МГц): δ 2,09-2,02 (м, 2H), 2,19 (с, 3H), 2,41 (с, 3H), 2,83-2,78 (м, 2H),
 4,13-4,09 (т, 1H, $J=8$ Гц), 5,05 (с, 2H), 5,95 (ушир.с, 1H), 7,30-7,19 (м, 5H), 7,95 (с, 1H), 8,03
 30 (с, 1H). Как было показано, вышеназванное соединение ингибирует рецептор горького
 вкуса hT2R08 и имеет IC_{50} 0,22 мкМ.

**Пример 10-46: 3-(1-((3,5-диметилизоксазол-4-ил)метил)-1H-пиразол-4-ил)-5-(3-
 фенилпропил)имидазолидин-2,4-дион**



40 Получали как в примере 10-1 из 1-((3,5-диметилизоксазол-4-ил)метил)-1H-пиразол-
 4-карбонилазида (пример 10-1а) и метил-2-амино-5-фенилпентаноата. Выход: 20%. ^1H
 ЯМР (CDCl_3 , 400 МГц): δ 1,72-1,68 (м, 1H), 1,85-1,78 (м, 2H), 1,99-1,91 (м, 1H), 2,19 (с,
 3H), 2,41 (с, 3H), 2,69-2,63 (т, $J=8$ Гц, 2H), 4,13 (ушир.с, 1H), 5,05 (с, 2H), 5,95 (ушир.с, 1H),
 7,30-7,19 (м, 5H), 7,95 (с, 1H), 8,03 (с, 1H). Как было показано, вышеназванное соединение
 45 ингибирует рецептор горького вкуса hT2R08 и имеет IC_{50} 0,17 мкМ.

**Пример 10-47: 5-(бензилоксиметил)-3-(1-((3,5-диметилизоксазол-4-ил)метил)-1H-пиразол-
 4-ил)имидазолидин-2,4-дион**

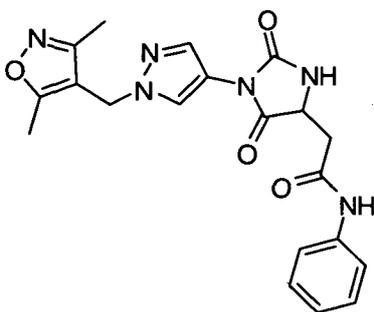


5

Получали как в примере 10-1 из 1-((3,5-диметилизоксазол-4-ил)метил)-1Н-пиразол-4-карбонилазида (пример 10-1а) и метил-2-амино-3-(бензилокси)пропаноата. Выход: 32%. ^1H ЯМР (CDCl_3 , 400 МГц): δ 2,19 (с, 3H), 2,43 (с, 3H), 3,70-3,67 (м, 1H), 3,89-3,86 (м, 1H), 4,31-4,30 (м, 1H), 4,56-4,32 (д, $J=1,6$ Гц, 2H), 5,05 (с, 2H), 5,62 (ушир.с, 1H), 7,35-7,29 (м, 5H), 7,88 (с, 1H), 8,04 (с, 1H). Как было показано, вышеназванное соединение ингибирует рецептор горького вкуса hT2R08 и имеет IC_{50} 0,76 мкМ.

10

Пример 10-48: 2-(1-(1-((3,5-диметилизоксазол-4-ил)метил)-1Н-пиразол-4-ил)-2,5-диоксиимидазолидин-4-ил)-N-фенилацетамид



15

20

3-(1-(1-((3,5-Диметилизоксазол-4-ил)метил)-1Н-пиразол-4-ил)-2,5-диоксиимидазолидин-4-ил)уксусную кислоту (пример 10-44) (100 мг, 0,3 ммоль), анилин (33 мг, 0,36 ммоль), РувОР (гексафторфосфат бензотриазол-1-ил-гидрокси-триспирролидино-фосфония) (187 мг, 0,36 ммоль) и триэтиламин (0,05 мл, 0,36 ммоль) смешивали в ДМФ (1 мл). Реакционную смесь перемешивали при 65°C в течение 4 часов. Реакционную смесь оставляли охлаждаться до комнатной температуры и затем разбавляли этилацетатом (2 мл). Органическую фазу промывали насыщенным раствором бикарбоната натрия (2х, 2 мл) и затем насыщенным раствором NaCl (1 мл). Органическую фазу экстрагировали, сушили над безводным Na_2SO_4 и фильтровали. Неочищенный продукт повторно суспендировали в MeOH (1 мл) и очищали методом обращенно-фазовой ВЭЖХ (5-95% ацетонитрил в H_2O ; 16-минутный градиент). Чистые фракции объединяли и удаляли растворитель на ротонном испарителе с получением 2-(1-(1-((3,5-диметилизоксазол-4-ил)метил)-1Н-пиразол-4-ил)-2,5-диоксиимидазолидин-4-ил)-N-фенилацетамида в виде белого твердого вещества (50%). ^1H ЯМР (CDCl_3 , 400 МГц): δ 2,18 (с, 3H), 2,40 (с, 3H), 2,72 (м, 1H), 3,14-3,13 (д, 1H, $J=4$ Гц), 4,54-4,51 (д, $J=8$ Гц 1H), 5,04 (с, 2H), 6,53 (ушир.с, 1H), 7,15-7,13 (м, 1H), 7,33-7,22 (м, 2H), 7,47-7,45 (д, $J=8$ Гц, 2H), 7,78 (ушир.с, 1H), 7,09 (с, 1H), 8,05 (с, 1H). Как было показано, вышеназванное соединение ингибирует рецептор горького вкуса hT2R08 и имеет IC_{50} 0,75 мкМ.

25

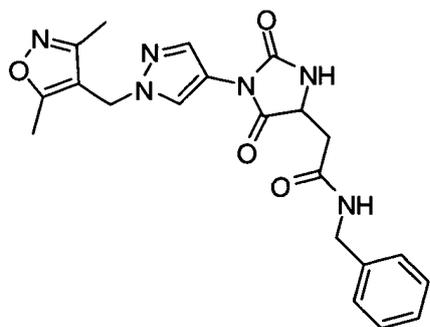
30

35

40

Пример 10-49: N-бензил-2-(1-(1-((3,5-диметилизоксазол-4-ил)метил)-1Н-пиразол-4-ил)-2,5-диоксиимидазолидин-4-ил)ацетамид

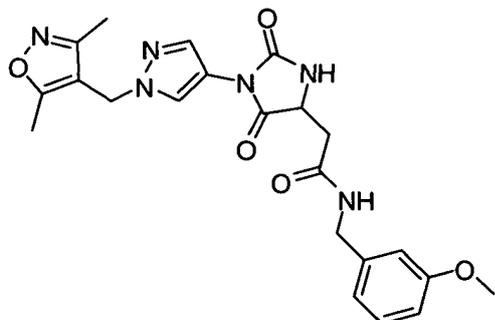
45



10 Получали как в примере 10-48 из 3-(1-(1-((3,5-диметилизоксазол-4-ил)метил)-1Н-пиразол-4-ил)-2,5-диоксиимидазолидин-4-ил)уксусной кислоты (пример 10-44) и бензиламина. Выход: 30%. ¹H ЯМР (CDCl₃, 400 МГц): δ 2,18 (с, 3H), 2,41 (с, 3H), 2,56-2,52 (м, 1H, J=16 Гц), 2,56-2,52 (м, 1H), 3,00-2,96 (м, 1H), 4,45-4,44 (д, J=5,6 Гц, 2H), 5,04 (с, 2H), 5,96 (ушир.с, 1H), 6,36 (ушир.с, 1H), 7,36-7,25 (м, 5H), 7,90 (с, 1H), 8,05 (с, 1H). Как

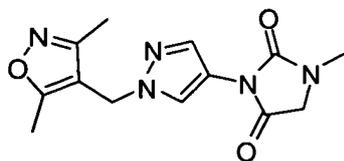
15 было показано, вышеназванное соединение ингибирует рецептор горького вкуса hT2R08 и имеет IC₅₀ 1,3 мкМ.

Пример 10-50: 2-(1-(1-((3,5-диметилизоксазол-4-ил)метил)-1Н-пиразол-4-ил)-2,5-диоксиимидазолидин-4-ил)-N-(3-метоксибензил)ацетамид



30 Получали как в примере 10-48 из 3-(1-(1-((3,5-диметилизоксазол-4-ил)метил)-1Н-пиразол-4-ил)-2,5-диоксиимидазолидин-4-ил)уксусной кислоты (пример 10-44) и (3-метоксифенил)метанамина. Выход: 50%. ЖХ/МС; ожидаемое значение 453; экспериментально 453,1. Как было показано, вышеназванное соединение ингибирует рецептор горького вкуса hT2R08 и имеет IC₅₀ 1,7 мкМ.

Пример 10-51: 3-(1-(1-((3,5-диметилизоксазол-4-ил)метил)-1Н-пиразол-4-ил)-1-метилимидазолидин-2,4-дион

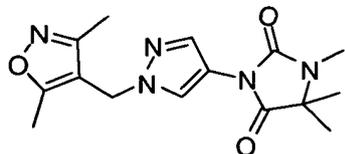


40 3-(1-(1-((3,5-Диметилизоксазол-4-ил)метил)-1Н-пиразол-4-ил)имидазолидин-2,4-дион (пример 10-1) (50 мг, 0,182 ммоль) и карбонат цезия (60 мг, 0,185 ммоль) смешивали в ДМФ (1 мл) в течение 15 минут в атмосфере азота при комнатной температуре. Затем добавляли йодметан (14 мг, 0,185 ммоль) и продолжали перемешивать реакционную смесь в течение дополнительных 2 часов. Добавляли Н₂О (2 мл) и экстрагировали

45 продукт этилацетатом (1 мл, 2х). Органическую фазу собирали и промывали насыщенным раствором бикарбоната натрия (2 мл, 2х), высушивали и фильтровали. Растворитель удаляли в потоке азота и затем дополнительно высушивали в глубоком вакууме с получением 3-(1-(1-((3,5-диметилизоксазол-4-ил)метил)-1Н-пиразол-4-ил)-1-

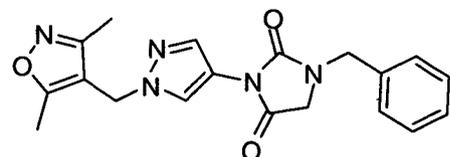
метилимидазолидин-2,4-диона в виде белого твердого вещества (42 мг, 80%). Выход: 80%. ^1H ЯМР (CDCl_3 , 400 МГц): δ 2,18 (с, 3H), 2,41 (с, 3H), 3,06 (с, 3H), 3,95 (с, 2H), 5,05 (с, 2H), 7,89 (с, 1H), 8,05 (с, 1H). Как было показано, вышеназванное соединение ингибирует рецептор горького вкуса hT2R08 и имеет IC_{50} 0,58 мкМ.

Пример 10-52: 3-(1-((3,5-диметилизоксазол-4-ил)метил)-1H-пиразол-4-ил)-1,5,5-триметилимидазолидин-2,4-дион



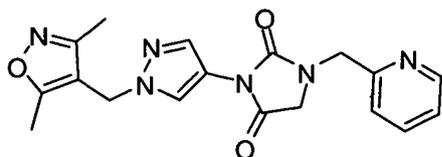
3-(1-((3,5-Диметилизоксазол-4-ил)метил)-1H-пиразол-4-ил)-5-метилимидазолидин-2,4-дион (пример 10-41) (50 мг, 0,173 ммоль) и 60% NaH (8 мг, 0,190 ммоль) смешивали в ДМФ (1 мл) в течение 30 минут. Добавляли MeI (0,04 мл, 0,190 ммоль) и реакционную смесь перемешивали дополнительные 4 часа. Реакционную смесь подкисляли 1N HCl и разбавляли этилацетатом (2 мл). Органическую фазу высушивали, фильтровали и удаляли растворитель в потоке азота. Неочищенный продукт повторно суспендировали в MeOH (1 мл) и очищали методом обращенно-фазовой ВЭЖХ (5-95% ацетонитрил в H_2O : 16-минутный градиент). Чистые фракции объединяли и удаляли растворитель под вакуумом с получением 3-(1-((3,5-диметилизоксазол-4-ил)метил)-1H-пиразол-4-ил)-1,5,5-триметилимидазолидин-2,4-диона в виде белого твердого вещества (25 мг, 50%). ^1H ЯМР (CDCl_3 , (CDCl_3 , 400 МГц): δ 1,45 (с, 6H), 2,19 (с, 3H), 2,42 (с, 3H), 2,94 (с, 3H), 5,05 (с, 2H), 7,92 (с, 1H), 8,08 (с, 1H). Как было показано, вышеназванное соединение ингибирует рецептор горького вкуса hT2R08 и имеет IC_{50} 0,80 мкМ.

Пример 10-53: 1-бензил-3-(1-((3,5-диметилизоксазол-4-ил)метил)-1H-пиразол-4-ил)имидазолидин-2,4-дион



Получали как в примере 10-5 из 3-(1-((3,5-диметилизоксазол-4-ил)метил)-1H-пиразол-4-ил)имидазолидин-2,4-диона (пример 10-1) и бензилбромидом. Выход: 40%. ^1H ЯМР (CDCl_3 , 400 МГц): δ 2,18 (с, 3H), 2,42 (с, 3H), 3,84 (с, 2H), 4,61 (с, 2H), 5,06 (с, 2H), 7,40-7,27 (м, 5H), 7,92 (с, 1H), 8,08 (с, 1H). Как было показано, вышеназванное соединение ингибирует рецептор горького вкуса hT2R08 и имеет IC_{50} 0,09 мкМ.

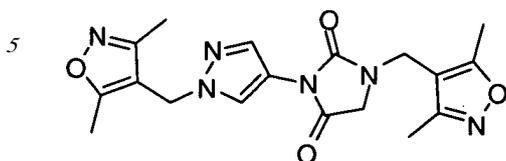
Пример 10-54: 3-(1-((3,5-диметилизоксазол-4-ил)метил)-1H-пиразол-4-ил)-1-(пиридин-2-илметил)имидазолидин-2,4-дион



Получали как в примере 10-5 из 3-(1-((3,5-диметилизоксазол-4-ил)метил)-1H-пиразол-4-ил)имидазолидин-2,4-диона и 2-(бромметил)пиридина. Выход: 50%. ^1H ЯМР (CDCl_3 , 400 МГц): δ 2,19 (с, 3H), 2,41 (с, 3H), 4,12 (с, 2H), 4,71 (с, 2H), 5,05 (с, 2H), 7,72-7,23 (м, 4H), 7,92 (с, 1H), 8,08 (с, 1H). Как было показано, вышеназванное соединение ингибирует

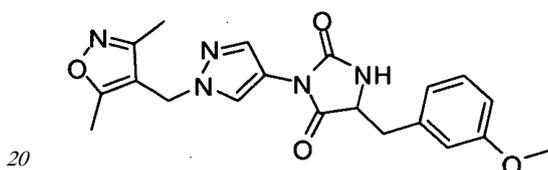
рецептор горького вкуса hT2R08 и имеет IC₅₀ 0,68 мкМ.

Пример 10-55: 1-((3,5-диметилизоксазол-4-ил)метил)-3-(1-((3,5-диметилизоксазол-4-ил)метил)-1Н-пиразол-4-ил)имидазолидин-2,4-дион



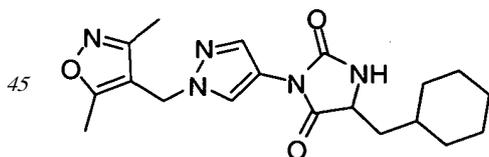
Получали как в примере 10-5 из 3-(1-((3,5-диметилизоксазол-4-ил)метил)-1Н-пиразол-4-ил)имидазолидин-2,4-диона и 4-(хлорметил)-3,5-диметилизоксазола. Выход: 50%. ¹Н ЯМР (CDCl₃, 400 МГц): δ 2,19 (с, 3Н), 2,27 (с, 3Н), 2,43-2,42 (д, J=5,2 Гц, 6Н), 3,82 (с, 2Н), 4,40 (с, 2Н), 5,05 (с, 2Н), 7,92 (с, 1Н), 8,05 (с, 1Н). Как было показано, вышеназванное соединение ингибирует рецептор горького вкуса hT2R08 и имеет IC₅₀ 0,04 мкМ.

Пример 10-56: 3-(1-((3,5-диметилизоксазол-4-ил)метил)-1Н-пиразол-4-ил)-5-(3-метоксибензил)имидазолидин-2,4-дион



1-((3,5-Диметилизоксазол-4-ил)метил)-1Н-пиразол-4-амина гидрохлорид (400 мг, 2,08 ммоль), дипиридин-2-ил карбонат (450 мг, 2,08 ммоль) и триэтиламин (0,290 мл, 2,08 ммоль) перемешивали в дихлорметане (7 мл) в течение 12 часов при комнатной температуре. Реакционную смесь концентрировали под вакуумом с получением 4-((4-изоцианато-1Н-пиразол-1-ил)метил)-3,5-диметилизоксазола в виде грязно-белого твердого вещества при количественном выходе. Добавляли этанол (1 мл) вместе с метил-2-амино-3-(3-метоксифенил)пропаноатом (68 мг, 0,327 ммоль) и триэтиламином (0,064 мл, 0,461 ммоль). Реакционную смесь перемешивали при кипячении с обратным холодильником в течение 12 часов, затем оставляли охлаждаться до комнатной температуры. Растворитель удаляли в потоке азота. Неочищенный продукт повторно суспендировали в MeOH (1 мл) и очищали методом обращенно-фазовой ВЭЖХ (5-95% ацетонитрил в H₂O: 16-минутный градиент). Чистые фракции объединяли и удаляли растворитель под вакуумом с получением 3-(1-((3,5-диметилизоксазол-4-ил)метил)-1Н-пиразол-4-ил)-5-(3-метоксибензил)имидазолидин-2,4-диона в виде белого твердого вещества, выход: 50%. ¹Н ЯМР (CDCl₃, 400 МГц): δ 2,19 (с, 3Н), 2,41 (с, 3Н), 3,34-3,33 (д, J=3,2 Гц, 1Н), 3,31-3,29 (д, J=8 Гц, 1Н), 3,76 (с, 3Н), 4,33-4,30 (м, 1Н), 5,05 (с, 2Н), 5,95 (ушир.с, 1Н), 7,25-7,21 (т, 1Н), 6,82-6,78 (м, 3Н), 7,85 (с, 1Н), 7,99 (с, 1Н). Как было показано, вышеназванное соединение ингибирует рецептор горького вкуса hT2R08 и имеет IC₅₀ 0,13 мкМ.

Пример 10-57: 5-(циклогексилметил)-3-(1-((3,5-диметилизоксазол-4-ил)метил)-1Н-пиразол-4-ил)имидазолидин-2,4-дион

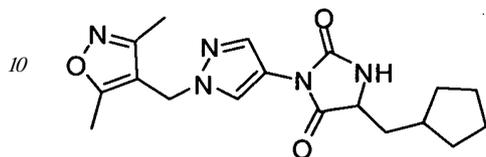


Получали как в примере 10-56 из 1-((3,5-диметилизоксазол-4-ил)метил)-1Н-пиразол-

4-амина гидрохлорида (пример 10-41а) и метил-2-амино-3-циклогексилпропаноата.

Выход: 30%. ¹H ЯМР (CDCl₃, 400 МГц): δ 1,06-0,95 (м, 2H), 1,29-1,15 (м, 3H), 1,60-1,50 (1H) 1,77-1,67 (7 H), 1,91-1,85 (м, 1H), 2,19 (с, 3H), 2,41 (с, 3H), 4,19-4,15 (м, 1H), 5,05 (с, 2H), 6,01 (ушир.с, 1H), 7,91 (с, 1H), 8,05 (с, 1H). Как было показано, вышеназванное соединение ингибирует рецептор горького вкуса hT2R08 и имеет IC₅₀ 0,96 мкМ.

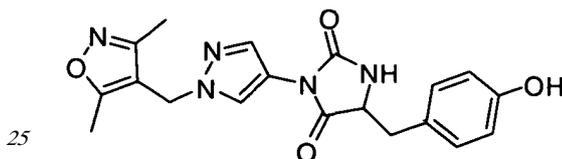
Пример 10-58: 5-(циклопентилметил)-3-(1-((3,5-диметилизоксазол-4-ил)метил)-1H-пиразол-4-ил)имидазолидин-2,4-дион



Получали как в примере 10-56 из 1-((3,5-диметилизоксазол-4-ил)метил)-1H-пиразол-4-амина гидрохлорида (пример 10-41а) и метил-2-амино-3-циклопентилпропаноата.

15 Выход: 50%. ¹H ЯМР (CDCl₃, 400 МГц): δ 1,20-1,14 (м, 3H), 1,68-1,55 (м, 6H), 2,04-1,92 (м, 2H), 2,19 (с, 3H), 2,42 (с, 3H), 4,14-4,11 (м, 1H), 5,05 (с, 2H), 5,52 (ушир.с, 1H), 7,90 (с, 1H), 8,06 (с, 1H). Как было показано, вышеназванное соединение ингибирует рецептор горького вкуса hT2R08 и имеет IC₅₀ 0,31 мкМ.

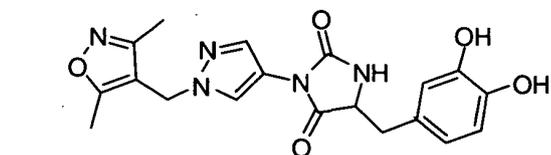
20 **Пример 10-59: 3-(1-((3,5-диметилизоксазол-4-ил)метил)-1H-пиразол-4-ил)-5-(4-гидроксифенил)имидазолидин-2,4-дион**



Получали как в примере 10-56 из 1-((3,5-диметилизоксазол-4-ил)метил)-1H-пиразол-4-амина гидрохлорида (пример 10-41а) и метил-2-амино-3-(4-гидроксифенил)пропаноата.

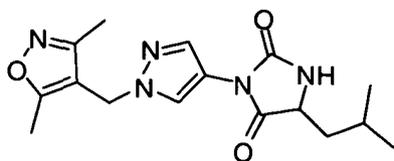
30 Выход: 50%. ¹H ЯМР (CDCl₃, 400 МГц): δ 2,41 (с, 3H), 2,85 (с, 3H), 3,26-3,25 (д, 1H, J=4 Гц), 3,23-3,22 (д, J=4 Гц, 1H) 4,31-4,28 (м, 1H), 5,04 (с, 2H), 5,77-5,74 (ушир.с, 1H), 7,07-7,04 (д, J=12 Гц, 2H), 6,75-6,73 (д, J=8 Гц, 2H), 7,06 (с, 1H), 7,97 (с, 1H), 9,43 (ушир.с, 1H). Как было показано, вышеназванное соединение ингибирует рецептор горького вкуса hT2R08 и имеет IC₅₀ 0,33 мкМ.

35 **Пример 10-60: 5-(3,4-дигидроксифенил)-3-(1-((3,5-диметилизоксазол-4-ил)метил)-1H-пиразол-4-ил)имидазолидин-2,4-дион**



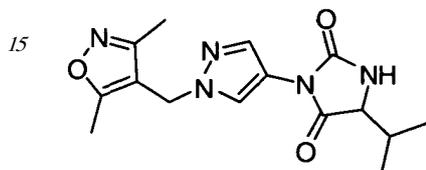
45 Получали как в примере 10-56 из 1-((3,5-диметилизоксазол-4-ил)метил)-1H-пиразол-4-амина гидрохлорида (пример 10-41а) и метил-2-амино-3-(3,4-дигидроксифенил)пропаноата. Выход: 50%. МС М+Н рассчитано 398,1; экспериментально 398,1. Как было показано, вышеназванное соединение ингибирует рецептор горького вкуса hT2R08 и имеет IC₅₀ 0,51 мкМ.

Пример 10-61: 3-(1-((3,5-диметилизоксазол-4-ил)метил)-1H-пиразол-4-ил)-5-изобутилимидазолидин-2,4-дион



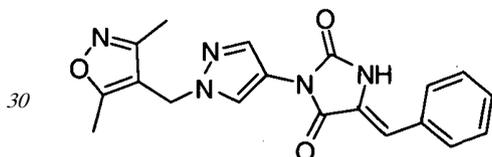
5 Получали как в примере 10-41 из 1-((3,5-диметилизоксазол-4-ил)метил)-1Н-пиразол-4-амина гидрохлорида (пример 10-41а) и этил-2-изоцианато-4-метилпентаноата. Выход: 50%. ¹Н ЯМР (CDCl₃, 400 МГц): δ 1,01-0,98 (м, 8Н), 1,87-1,82 (м, 1Н), 2,19 (с, 3Н), 2,41 (с, 3Н), 4,13-4,12 (т, 1Н), (5,05 (с, 2Н), 5,70 (ушир.с, 1Н), 7,90 (с, 1Н), 8,05 (с, 1Н). Как было
10 показано, вышеназванное соединение ингибирует рецептор горького вкуса hT2R08 и имеет IC₅₀ 1,0 мкМ.

Пример 10-62: 3-(1-((3,5-диметилизоксазол-4-ил)метил)-1Н-пиразол-4-ил)-5-изопропилимидазолидин-2,4-дион



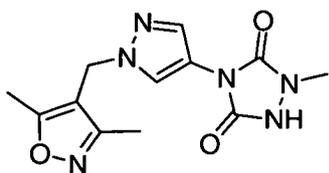
15 Получали как в примере 10-41 из 1-((3,5-диметилизоксазол-4-ил)метил)-1Н-пиразол-4-амина гидрохлорида (пример 10-41а) и этил-2-изоцианато-3-метилбутаноата. Выход: 30%. ¹Н ЯМР (CDCl₃, 400 МГц): δ 0,96-0,94 (д, 3Н, J=7,2 Гц), 1,09-1,07 (д, 3Н, J=8 Гц), 2,19 (с, 3Н), 2,26-2,22 (м, 1Н), 2,40 (с, 3Н), 4,02 (с, 1Н), 5,05 (с, 2Н), 5,53 (ушир.с, 1Н), 7,90 (с, 1Н), 8,05 (с, 1Н). Как было показано, вышеназванное соединение ингибирует рецептор
20 горького вкуса hT2R08 и имеет IC₅₀ 1,1 мкМ.

Пример 10-63: (Z)-5-бензилиден-3-(1-((3,5-диметилизоксазол-4-ил)метил)-1Н-пиразол-4-ил)имидазолидин-2,4-дион



30 3-(1-((3,5-Диметилизоксазол-4-ил)метил)-1Н-пиразол-4-ил)имидазолидин-2,4-дион (пример 10-1) (275 мг, 1 ммоль), бензальдегид (140 мг, 1,3 ммоль) и ацетат натрия (205 мг, 2,5 ммоль) в ледяной уксусной кислоте (3 мл) подвергали действию излучения в
35 микроволновом реакторе в течение 7 часов при 185°C. После охлаждения смесь разбавляли H₂O (100 мл) и экстрагировали этилацетатом (3×, 50 мл). Объединенные органические экстракты промывали насыщенным водным раствором карбоната натрия, сушили над сульфатом натрия, фильтровали и концентрировали. Твердый продукт
40 растирали в порошок с этилацетатом/гексаном (1/1) и высушивали в глубоком вакууме с получением (Z)-5-бензилиден-3-(1-((3,5-диметилизоксазол-4-ил)метил)-1Н-пиразол-4-ил)имидазолидин-2,4-диона (173 мг, 48%) в виде светло-желтого твердого вещества. ¹Н ЯМР (DMCO-d₆, 400 МГц): δ 2,14 (с, 3Н), 2,40 (с, 3Н), 6,59 (с, 1Н), 5,20 (с, 2Н), 7,33-7,40 (м, 3Н), 7,66 (с, 2Н), 7,81 (с, 1Н), 8,21 (с, 1Н), 11,01 (ушир.с, 1Н). Как было показано,
45 вышеназванное соединение ингибирует рецептор горького вкуса hT2R08 и имеет IC₅₀ 0,34 мкМ.

Пример 10-64: 4-(1-((3,5-диметилизоксазол-4-ил)метил)-1Н-пиразол-4-ил)-1-метил-1,2,4-триазазолидин-3,5-дион

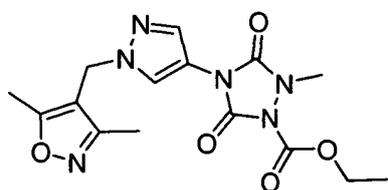


5

Этил-4-(1-((3,5-диметилизоксазол-4-ил)метил)-1H-пиразол-4-ил)-2-метил-3,5-диоксо-1,2,4-триазолидин-1-карбоксилат (3,2 г, 8,8 ммоль) перемешивали в (1/1) смеси MeOH/1N водный NaOH (100 мл) при температуре окружающей среды в течение 30 минут. Смесь подкисляли водным 1N HCl (150 мл), экстрагировали этилацетатом (3×, 100 мл),
 10 высушивали над сульфатом натрия, фильтровали и концентрировали с получением 4-(1-((3,5-диметилизоксазол-4-ил)метил)-1H-пиразол-4-ил)-1-метил-1,2,4-триазолидин-3,5-диона (2,3 г, 89%) в виде желтого твердого вещества. ¹H ЯМР (DMCO-d₆, 400 МГц): δ 2,18 (с, 3H), 2,44 (с, 3H), 3,05 (с, 3H), 5,17 (с, 2H), 7,94 (с, 1H), 8,13 (с, 1H).

15

Пример 10-64а: Этил-4-(1-((3,5-диметилизоксазол-4-ил)метил)-1H-пиразол-4-ил)-2-метил-3,5-диоксо-1,2,4-триазолидин-1-карбоксилат

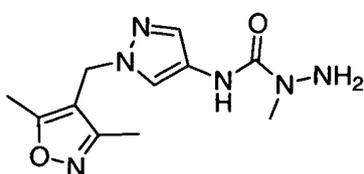


20

Этилхлорформат (1,3 г, 12 ммоль) добавляли в смесь N-(1-((3,5-диметилизоксазол-4-ил)метил)-1H-пиразол-4-ил)-1-метилгидразинкарбоксамида (пример 10-64b) (2,5 г, 9 ммоль) и триэтиламина (1,2 г, 12 ммоль) в ацетонитриле (100 мл). Смесь кипятили с
 25 обратным холодильником в течение 1 часа, охлаждали, затем разбавляли 1N водным HCl (150 мл) и экстрагировали этилацетатом (3×, 75 мл). Объединенные органические экстракты сушили над сульфатом натрия, фильтровали и концентрировали на роторном испарителе. Твердое вещество растирали в порошок с этилацетатом/гексаном (1/3) и высушивали в глубоком вакууме с получением этил-4-(1-((3,5-диметилизоксазол-4-ил)
 30 метил)-1H-пиразол-4-ил)-2-метил-3,5-диоксо-1,2,4-триазолидин-1-карбоксилата (3,2 г, 94%) в виде белого твердого вещества. ¹H ЯМР (DMCO-d₆, 400 МГц): δ 1,28 (т, J=7,2 Гц, 3H), 2,13 (с, 3H), 2,40 (с, 3H), 3,24 (с, 3H), 4,30 (т, J=7,2 Гц, 2H), 5,21 (с, 2H), 7,73 (м, 1H), 8,16 (с, 1H).

35

Пример 10-64b: N-(1-((3,5-диметилизоксазол-4-ил)метил)-1H-пиразол-4-ил)-1-метилгидразинкарбоксамид

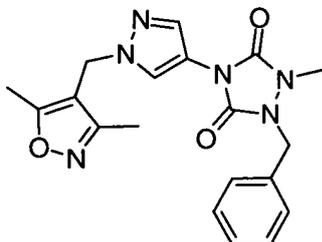


40

1-((3,5-Диметилизоксазол-4-ил)метил)-1H-пиразол-4-карбонилазид (пример 10-1а) (1,25 г, 5,3 ммоль) перемешивали в толуоле (30 мл) при температуре кипячения с обратным холодильником в течение 40 минут. Смесь охлаждали до температуры
 45 окружающей среды и добавляли метилгидразин (0,3 мл, 260 мг, 5,6 ммоль) и смесь кипятили с обратным холодильником в течение 30 минут. После охлаждения реакции до комнатной температуры растворитель удаляли на роторном испарителе и твердый продукт растирали в порошок с этилацетатом/гексаном (2/5) и высушивали в глубоком вакууме с получением N-(1-((3,5-диметилизоксазол-4-ил)метил)-1H-пиразол-4-ил)-1-

метилгидразинкарбоксамида (1,1 г, 79%) в виде белого твердого вещества. ^1H ЯМР (ДМСО- d_6 , 400 МГц): δ 2,09 (с, 3H), 2,36 (с, 3H), 2,98 (с, 3H), 4,61 (с, 2H), 5,02 (с, 2H), 7,42 (с, 1H), 7,72 (м, 1H), 8,78 (с, 1H).

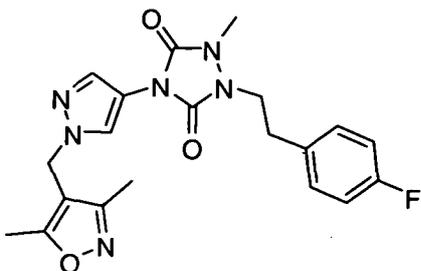
Пример 10-65: 1-Бензил-4-(1-((3,5-диметилизоксазол-4-ил)метил)-1H-пиразол-4-ил)-2-метил-1,2,4-триаколидин-3,5-дион



4-(1-((3,5-Диметилизоксазол-4-ил)метил)-1H-пиразол-4-ил)-1-метил-1,2,4-триаколидин-3,5-дион (пример 10-64) (785 мг, 2,7 ммоль) растворяли в ацетонитриле (50 мл).

Добавляли триэтиламин (1 г, 10 ммоль) и бензилбромид (510 мг, 3 ммоль) и реакцию смесь перемешивали при температуре окружающей среды в течение 12 часов. Затем смесь концентрировали на роторном испарителе, растворяли в метаноле (5 мл) и очищали методом обращенно-фазовой ВЭЖХ (5-95% ацетонитрила в H_2O : 25-минутный градиент). Чистые фракции объединяли и концентрировали и продукт перекристаллизовывали из этанола с получением 1-бензил-4-(1-((3,5-диметилизоксазол-4-ил)метил)-1H-пиразол-4-ил)-2-метил-1,2,4-триаколидин-3,5-диона (210 мг, 20%) в виде белого твердого вещества. ^1H ЯМР (ДМСО- d_6 , 400 МГц): δ 2,13 (с, 3H), 2,39 (с, 3H), 3,09 (с, 3H), 4,81 (с, 2H), 5,18 (с, 2H), 7,30-7,35 (м, 5H), 7,76 (с, 1H), 8,18 (с, 1H). МС М+Н рассчитано 381,1; экспериментально 381,1. Температура плавления: 124-126°C. Как было показано, вышеназванное соединение ингибирует рецептор горького вкуса hT2R08 и имеет IC_{50} 0,02 мкМ.

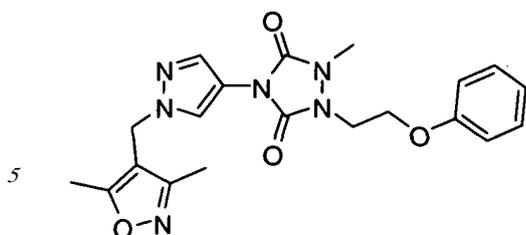
Пример 10-66: 1-Бензил-4-(1-((3,5-диметилизоксазол-4-ил)метил)-1H-пиразол-4-ил)-2-метил-1,2,4-триаколидин-3,5-дион



Получали как в примере 10-65 из 4-(1-((3,5-диметилизоксазол-4-ил)метил)-1H-пиразол-4-ил)-1-метил-1,2,4-триаколидин-3,5-диона (пример 10-64) и 1-(2-бромэтил)-4-

фторбензола. Выход: 14%. ^1H ЯМР (CDCl_3 , 400 МГц): δ 2,18 (с, 3H), 2,40 (с, 3H), 2,87 (т, $J=6,8$ Гц, 2H), 3,14 (с, 3H), 3,83 (т, $J=7,2$ Гц, 2H), 5,03 (с, 2H), 6,95 (т, $J=8,4$ Гц, 2H), 7,14 (т, $J=8$ Гц, 2H), 7,77 (с, 1H), 7,95 (с, 1H). Как было показано, вышеназванное соединение ингибирует рецептор горького вкуса hT2R08 и имеет IC_{50} 0,01 мкМ.

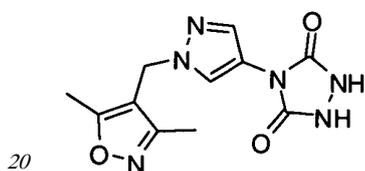
Пример 10-67: 4-(1-((3,5-диметилизоксазол-4-ил)метил)-1H-пиразол-4-ил)-1-метил-2-(2-феноксипропил)-1,2,4-триаколидин-3,5-дион



Получали как в примере 10-65 из 4-(1-((3,5-диметилизоксазол-4-ил)метил)-1Н-пиразол-4-ил)-1-метил-1,2,4-триаколидин-3,5-диона (пример 10-64) и (2-бромэтокси)бензола.

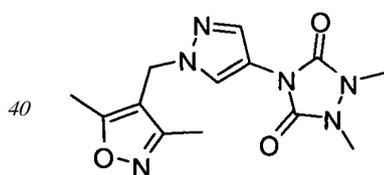
10 Выход: 20%. ¹Н ЯМР (ДМСО-d₆, 400 МГц): δ 2,13 (с, 3Н), 2,40 (с, 3Н), 3,15 (с, 3Н), 3,99 (т, J=4,4 Гц, 2Н), 4,13 (т, J=4,8 Гц, 2Н), 5,20 (с, 2Н), 6,80 (д, J=8 Гц, 2Н), 6,90 (т, J=7,1 Гц, 1Н), 7,22 (т, J=8 Гц, 2Н), 7,75 (с, 1Н), 8,17 (с, 1Н). Как было показано, вышеназванное соединение ингибирует рецептор горького вкуса hT2R08 и имеет IC₅₀ 0,031 мкМ.

15 **Пример 10-68: 4-(1-((3,5-диметилизоксазол-4-ил)метил)-1Н-пиразол-4-ил)-1,2,4-триаколидин-3,5-дион**



1-((3,5-Диметилизоксазол-4-ил)метил)-1Н-пиразол-4-карбонилазид (пример 10-1а) (1 г, 4,1 ммоль) кипятили с обратным холодильником в толуоле (100 мл) в течение одного часа. Реакционную смесь охлаждали до комнатной температуры и добавляли этилгидразинкарбоксилат (0,45 г, 43 ммоль). Реакционную смесь нагревали до кипения с обратным холодильником и перемешивали в течение 1 часа, затем охлаждали и концентрировали на роторном испарителе. Остаток переносили в этанол (100 мл) и добавляли карбонат калия (100 мг). Смесь кипятили с обратным холодильником в течение 12 часов, затем фильтровали, охлаждали до температуры окружающей среды и нейтрализовали уксусной кислотой (примерно 7 капель). Растворитель удаляли на роторном испарителе и образовавшееся твердое вещество растирали в порошок с этилацетатом/гексаном (1/9) с получением 4-(1-((3,5-диметилизоксазол-4-ил)метил)-1Н-пиразол-4-ил)-1,2,4-триаколидин-3,5-диона (0,98 г, 85%) в виде грязно-белого твердого вещества. ¹Н ЯМР (CDCl₃, 400 МГц): δ 2,18 (с, 3Н), 2,41 (с, 3Н), 4,98 (с, 2Н) 7,16 (с, 1Н), 7,38 (с, 1Н).

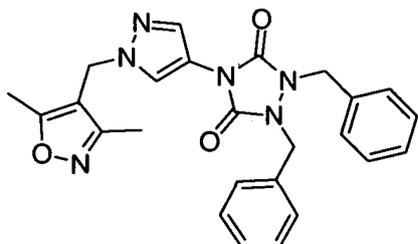
35 **Пример 10-69: 4-(1-((3,5-диметилизоксазол-4-ил)метил)-1Н-пиразол-4-ил)-1,2-диметил-1,2,4-триаколидин-3,5-дион**



4-((3,5-Диметилизоксазол-4-ил)метил)-1Н-пиразол-4-ил)-1,2,4-триаколидин-3,5-дион (пример 10-68) (100 мг, 0,36 ммоль), метилиодид (141 мг, 1 ммоль) и карбонат цезия (325 мг, 1 ммоль) перемешивали в 2/1 смеси ацетонитрил/ДМФ (5 мл) при температуре окружающей среды в течение 2 часов. Смесь разбавляли водным 1N HCl (100 мл) и экстрагировали этилацетатом (3×, 50 мл). Объединенные органические экстракты сушили над сульфатом натрия, концентрировали, и неочищенный остаток переносили в MeOH и очищали методом обращенно-фазовой ВЭЖХ (5-95%

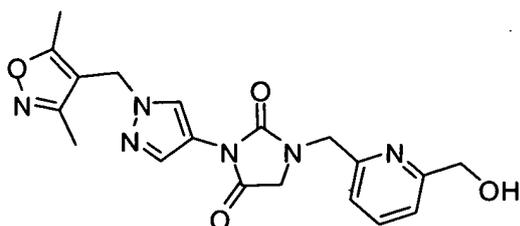
ацетонитрила в H₂O: 25-минутный градиент). Чистые фракции объединяли и концентрировали с получением 4-(1-((3,5-диметилизоксазол-4-ил)метил)-1H-пиразол-4-ил)-1,2-диметил-1,2,4-триазаолидин-3,5-диона (89 мг, 80%) в виде прозрачного полутвердого вещества. ¹H ЯМР (CDCl₃, 400 МГц): δ 2,18 (с, 3H), 2,41 (с, 3H), 3,22 (с, 6H), 5,04 (с, 2H), 7,88 (с, 1H), 8,03 (с, 1H). Как было показано, вышеназванное соединение ингибирует рецептор горького вкуса hT2R08 и имеет IC₅₀ 0,6 мкМ.

Пример 10-70: 1,2-добензил-4-(1-((3,5-диметилизоксазол-4-ил)метил)-1H-пиразол-4-ил)-1,2,4-триазаолидин-3,5-дион



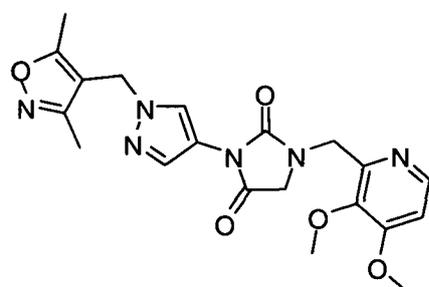
Получали как в примере 10-65 из 4-(1-((3,5-диметилизоксазол-4-ил)метил)-1H-пиразол-4-ил)-1,2-диметил-1,2,4-триазаолидин-3,5-диона (пример 10-69) и бензилбромидом. Выход: 69%. ¹H ЯМР (CDCl₃, 400 МГц): δ 2,14 (с, 3H), 2,36 (с, 3H), 4,65 (с, 4H), 4,99 (с, 2H), 7,06-7,08 (м, 4H), 7,19-7,25 (м, 6H), 7,86 (с, 1H), 8,02 (с, 1H). Как было показано, вышеназванное соединение ингибирует рецептор горького вкуса hT2R08 и имеет IC₅₀ 0,8 мкМ.

Пример 10-71: 3-(1-((3,5-диметилизоксазол-4-ил)метил)-1H-пиразол-4-ил)-1-((6-(гидроксиметил)пиридин-2-ил)метил)имидазолидин-2,4-дион



Получали как в примере 10-5 из 3-(1-((3,5-диметилизоксазол-4-ил)метил)-1H-пиразол-4-ил)имидазолидин-2,4-диона и 6-бромметил-2-пиридинметанола. Выход: 35%. МС М+Н рассчитано 397,2; экспериментально 397,2. Как было показано, вышеназванное соединение ингибирует рецептор горького вкуса hT2R08 и имеет IC₅₀ 0,72 мкМ.

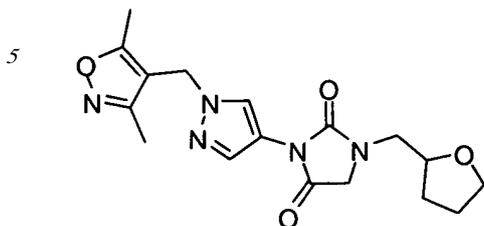
Пример 10-72: 1-((3,4-диметоксипиридин-2-ил)метил)-3-(1-((3,5-диметилизоксазол-4-ил)метил)-1H-пиразол-4-ил)имидазолидин-2,4-дион



Получали как в примере 10-5 из 3-(1-((3,5-диметилизоксазол-4-ил)метил)-1H-пиразол-4-ил)имидазолидин-2,4-диона и 3,4-диметокси-2-хлорметилпиридина гидрохлорида. Выход: 26%. МС М+Н рассчитано 360,2; экспериментально 360,2. Как было показано, вышеназванное соединение ингибирует рецептор горького вкуса hT2R08 и имеет IC₅₀

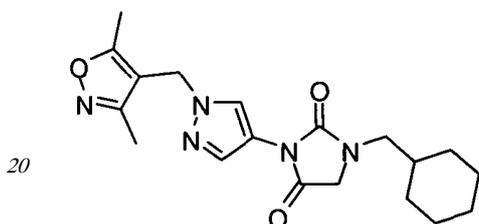
1,0 мкМ.

Пример 10-73: 3-(1-((3,5-диметилизоксазол-4-ил)метил)-1*H*-пиразол-4-ил)-1-((6-(тетрагидрофуран-2-ил)метил)имидазолидин-2,4-дион



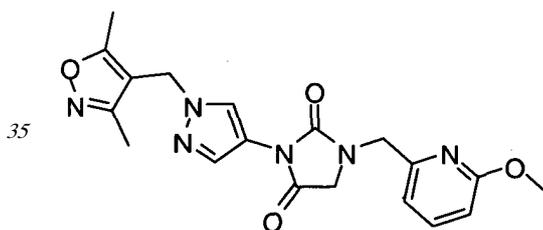
Получали как в примере 10-52 из 3-(1-((3,5-диметилизоксазол-4-ил)метил)-1*H*-пиразол-4-ил)имидазолидин-2,4-диона и тетрагидрофурурилбромида. Выход: 28%. МС М+Н рассчитано 427,2; экспериментально 427,2. Как было показано, вышеназванное соединение ингибирует рецептор горького вкуса hT2R08 и имеет IC₅₀ 1,4 мкМ.

Пример 10-74: 1-(циклогексилметил)-3-(1-((3,5-диметилизоксазол-4-ил)метил)-1*H*-пиразол-4-ил)имидазолидин-2,4-дион



Получали как в примере 10-52 из 3-(1-((3,5-диметилизоксазол-4-ил)метил)-1*H*-пиразол-4-ил)имидазолидин-2,4-диона (пример 10-1) и бромметилциклогексана. Выход: 20%. ¹H ЯМР (ДМСО-*d*₆, 400 МГц): δ 0,88 (кв, *J*=10,4 Гц, 2H), 1,09-1,19 (м, 3H), 1,58-1,65 (м, 6H), 2,12 (с, 3H), 2,38 (с, 3H), 3,13 (д, *J*=7,2 Гц, 2H), 4,06 (с, 2H), 5,17 (с, 2H), 7,75 (с, 1H), 8,14 (с, 1H). МС М+Н рассчитано 372,2; экспериментально 372,1. Как было показано, вышеназванное соединение ингибирует рецептор горького вкуса hT2R08 и имеет IC₅₀ 0,28 мкМ.

Пример 10-75: 3-(1-((3,5-диметилизоксазол-4-ил)метил)-1*H*-пиразол-4-ил)-1-((6-метоксипиридин-2-ил)метил)имидазолидин-2,4-дион

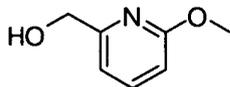


3-(1-((3,5-Диметилизоксазол-4-ил)метил)-1*H*-пиразол-4-ил)имидазолидин-2,4-дион (100 мг, 0,4 ммоль), (6-метоксипиридин-2-ил)метанол (пример 10-75а) (101 мг, 0,7 ммоль), трибутилфосфин (147 мг, 0,7 ммоль) и 1,1''-азобис(*N,N*-диметилформаид) (125 мг, 0,7 ммоль) растворяли в ТГФ (5 мл) и перемешивали при комнатной температуре в течение 15 часов. Реакционную смесь разбавляли солевым раствором (100 мл) и экстрагировали этилацетатом (2х, 100 мл). Объединенные органические экстракты сушили над сульфатом магния, фильтровали и концентрировали на роторном испарителе. Остаток переносили в метанол (5 мл) и очищали методом обращенно-фазовой ВЭЖХ (5-95% ацетонитрил в H₂O: 25-минутный градиент). Чистые фракции объединяли, концентрировали, затем повторно растворяли в этилацетате/гексане (1:9). Раствор охлаждали при 5°C в течение 15 часов, при этом образовалось белое твердое вещество. Осадок собирали с получением

45

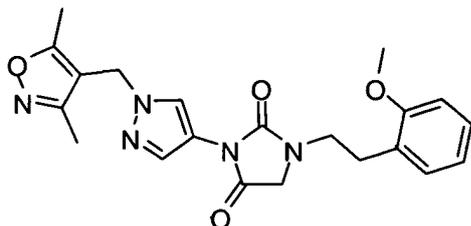
3-(1-((3,5-диметилизоксазол-4-ил)метил)-1*H*-пиразол-4-ил)-1-((6-метоксипиридин-2-ил)метил)имидазолидин-2,4-диона (5 мг, 4%) в виде белого твердого вещества. ¹H ЯМР (ДМСО-*d*₆, 400 МГц): δ 2,11 (с, 3H), 2,37 (с, 3H), 3,74 (с, 3H), 4,17 (с, 2H), 4,54 (с, 2H), 5,17 (с, 2H), 6,69 (д, *J*=7,6 Гц, 1H), 6,96 (д, *J*=6,8 Гц, 1H), 7,67 (д, *J*=6,8 Гц, 1H), 7,76 (с, 1H), 8,17 (с, 1H). МС М+Н рассчитано 397,2; экспериментально 397,2. Как было показано, вышеназванное соединение ингибирует рецептор горького вкуса hT2R08 и имеет IC₅₀ 0,23 мкМ.

Пример 10-75а: (6-метоксипиридин-2-ил)метанол



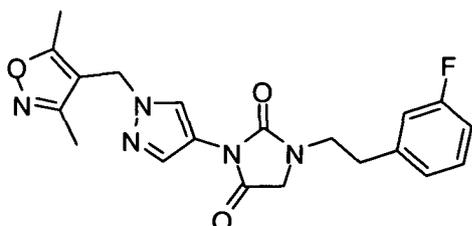
Метил-6-метоксипиридин-2-карбоксилат (2 г, 11,96 ммоль) в безводном метаноле (20 мл) охлаждали до 0°C в атмосфере азота и к раствору медленно добавляли боргидрид натрия (1,36 г, 35,89 ммоль). Реакционную смесь оставляли при перемешивании при 0°C на 30 минут, затем оставляли нагреваться до комнатной температуры в течение 1 часа. Реакционную смесь гасили водой и концентрировали на роторном испарителе. Реакционную смесь разбавляли солевым раствором (100 мл) и экстрагировали раствором дихлорметан/2-пропанол (2:1) (3×, 150 мл). Объединенные органические экстракты сушили над сульфатом магния, фильтровали и концентрировали на роторном испарителе с получением (6-метоксипиридин-2-ил)метанола (500 мг, 30%) в виде масла. МС М+Н рассчитано 140,1; экспериментально 140,1.

Пример 10-76: 3-(1-((3,5-диметилизоксазол-4-ил)метил)-1*H*-пиразол-4-ил)-1-(2-метоксифенетил)имидазолидин-2,4-дион



Получали как в примере 10-52 из 3-(1-((3,5-диметилизоксазол-4-ил)метил)-1*H*-пиразол-4-ил)имидазолидин-2,4-диона (пример 6) и 2-метоксифенетилбромидом. Выход: 52%. ¹H ЯМР (ДМСО-*d*₆, 400 МГц): δ 2,11 (с, 3H), 2,38 (с, 3H), 2,80 (т, *J*=7,2 Гц, 2H), 3,51 (т, *J*=7,2 Гц, 2H), 3,75 (с, 3H), 4,03 (с, 2H), 5,17 (с, 2H), 6,85 (т, *J*=7,2 Гц, 1H), 6,95 (д, *J*=8,4 Гц, 1H), 7,16-7,21 (м, 2H), 7,73 (с, 1H), 8,13 (с, 1H). МС М+Н рассчитано 410,2; экспериментально 410,1. Температура плавления: 97-98°C. Как было показано, вышеназванное соединение ингибирует рецептор горького вкуса hT2R08 и имеет IC₅₀ 0,14 мкМ.

Пример 10-77: 3-(1-((3,5-диметилизоксазол-4-ил)метил)-1*H*-пиразол-4-ил)-1-(3-фторфенетил)имидазолидин-2,4-дион



Получали как в примере 10-52 из 3-(1-((3,5-диметилизоксазол-4-ил)метил)-1*H*-пиразол-4-ил)имидазолидин-2,4-диона (пример 10-1) и 3-фторфенетилбромидом. Выход: 22%. ¹H

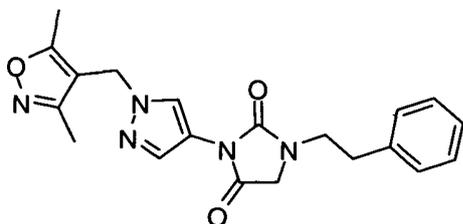
ЯМР (ДМСО- d_6 , 400 МГц): δ 2,11 (с, 3H), 2,38 (с, 3H), 2,80 (т, $J=7,2$ Гц, 2H), 3,57 (т, $J=7,2$ Гц, 2H), 4,06 (с, 2H), 5,17 (с, 2H), 6,85 (дт, $J=8,4$, 2,0 Гц, 1H), 7,11 (т, $J=8,4$ Гц, 2H), 7,32 (кв, $J=7,8$ Гц, 1H), 7,73 (с, 1H), 8,12 (с, 1H). МС М+Н рассчитано 398,2; экспериментально 398,1. Температура плавления: 110-111°C. Как было показано, вышеназванное

5

соединение ингибирует рецептор горького вкуса hT2R08 и имеет IC_{50} 0,06 мкМ.

Пример 10-78: 3-(1-((3,5-диметилизоксазол-4-ил)метил)-1H-пиразол-4-ил)-1-фенилимидазолидин-2,4-дион

10



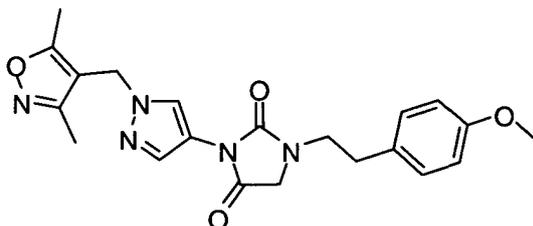
Получали как в примере 10-52 из 3-(1-((3,5-диметилизоксазол-4-ил)метил)-1H-пиразол-4-ил)имидазолидин-2,4-диона (пример 10-1) и фенилбромида. Выход: 37%. 1H ЯМР (ДМСО- d_6 , 400 МГц): δ 2,11 (с, 3H), 2,38 (с, 3H), 2,83 (т, $J=6,4$ Гц, 2H), 3,55 (т, $J=7,4$ Гц, 2H), 4,03 (с, 2H), 5,17 (с, 2H), 7,18-7,30 (м, 5H), 7,73 (с, 1H), 8,13 (с, 1H). МС М+Н рассчитано 380,2; экспериментально 380,1. Температура плавления: 95-96°C. Как было

20

показано, вышеназванное соединение ингибирует рецептор горького вкуса hT2R08 и имеет IC_{50} 0,14 мкМ.

Пример 10-79: 3-(1-((3,5-диметилизоксазол-4-ил)метил)-1H-пиразол-4-ил)-1-(4-метоксифенетил)имидазолидин-2,4-дион

25



30

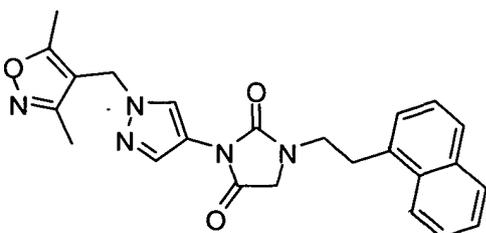
Получали как в примере 10-52 из 3-(1-((3,5-диметилизоксазол-4-ил)метил)-1H-пиразол-4-ил)имидазолидин-2,4-диона (пример 10-1) и 4-метоксифенетилбромида. Выход: 32%. 1H ЯМР (ДМСО- d_6 , 400 МГц): δ 2,11 (с, 3H), 2,38 (с, 3H), 2,78 (т, $J=7,4$ Гц, 2H), 3,50 (т, $J=7,4$ Гц, 2H), 3,69 (с, 3H), 4,02 (с, 2H), 5,16 (с, 2H), 6,84 (д, $J=8,4$ Гц, 2H), 7,15 (д, $J=8,4$ Гц, 2H), 7,73 (с, 1H), 8,12 (с, 1H). МС М+Н рассчитано 410,18; экспериментально 410,2. Как было

35

показано, вышеназванное соединение ингибирует рецептор горького вкуса hT2R08 и имеет IC_{50} 0,04 мкМ.

Пример 10-80: 3-(1-((3,5-диметилизоксазол-4-ил)метил)-1H-пиразол-4-ил)-1-(2-нафталин-1-ил)этил)имидазолидин-2,4-дион

40

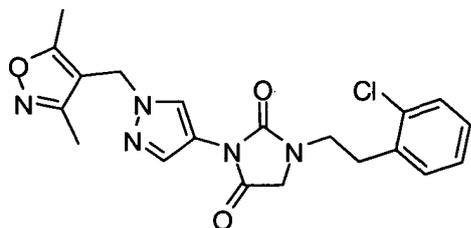


45

Получали как в примере 10-52 из 3-(1-((3,5-диметилизоксазол-4-ил)метил)-1H-пиразол-4-ил)имидазолидин-2,4-диона (пример 10-1) и 1-(2-бромэтил)нафталина. Выход: 20%. МС М+Н рассчитано 430,18; экспериментально 430,2. Как было показано,

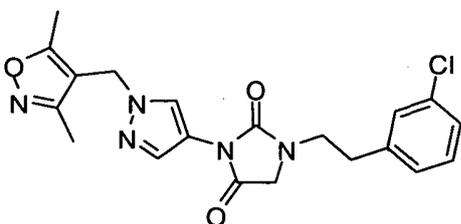
вышеназванное соединение ингибирует рецептор горького вкуса hT2R08 и имеет IC₅₀ 1,27 мкМ.

Пример 10-81: 1-(2-хлорфенетил)-3-(1-((3,5-диметилизоксазол-4-ил)метил)-1*H*-пиразол-4-ил)имидазолидин-2,4-дион



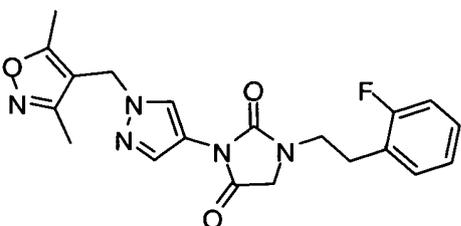
Получали как в примере 10-52 из 3-(1-((3,5-диметилизоксазол-4-ил)метил)-1*H*-пиразол-4-ил)имидазолидин-2,4-диона (пример 10-1) и 2-хлорфенетилбромида. Выход: 25%. МС М+Н рассчитано 414,13; экспериментально 414,2. Как было показано, вышеуказанное соединение ингибирует рецептор горького вкуса hT2R08 и имеет IC₅₀ 0,25 мкМ.

Пример 10-82: 1-(3-хлорфенетил)-3-(1-((3,5-диметилизоксазол-4-ил)метил)-1*H*-пиразол-4-ил)имидазолидин-2,4-дион



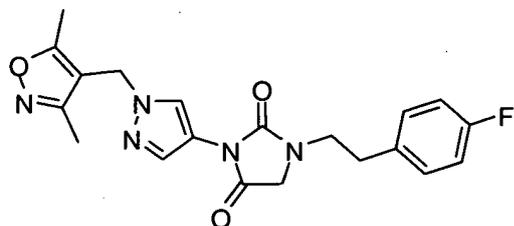
Получали как в примере 10-52 из 3-(1-((3,5-диметилизоксазол-4-ил)метил)-1*H*-пиразол-4-ил)имидазолидин-2,4-диона (пример 10-1) и 3-хлорфенетилбромида. Выход: 27%. МС М+Н рассчитано 414,13; экспериментально 414,2. Как было показано, вышеуказанное соединение ингибирует рецептор горького вкуса hT2R08 и имеет IC₅₀ 0,20 мкМ.

Пример 10-83: 3-(1-((3,5-диметилизоксазол-4-ил)метил)-1*H*-пиразол-4-ил)-1-(2-фторфенетил)имидазолидин-2,4-дион



Получали как в примере 10-52 из 3-(1-((3,5-диметилизоксазол-4-ил)метил)-1*H*-пиразол-4-ил)имидазолидин-2,4-диона (пример 10-1) и 2-фторфенетилбромида. Выход: 24%. МС М+Н рассчитано 398,16; экспериментально 398,1. Как было показано, вышеуказанное соединение ингибирует рецептор горького вкуса hT2R08 и имеет IC₅₀ 0,13 мкМ.

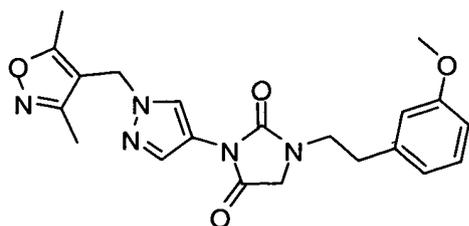
Пример 10-84: 3-(1-((3,5-диметилизоксазол-4-ил)метил)-1*H*-пиразол-4-ил)-1-(4-фторфенетил)имидазолидин-2,4-дион



Получали как в примере 10-52 из 3-(1-((3,5-диметилизоксазол-4-ил)метил)-1*H*-пиразол-

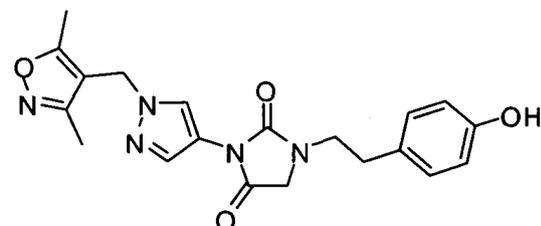
4-ил)имидазолидин-2,4-диона (пример 10-1) и 4-фторфенетилбромида. Выход: 34%. МС М+Н рассчитано 398,16; экспериментально 398,1. Как было показано, вышеназванное соединение ингибирует рецептор горького вкуса hT2R08 и имеет IC₅₀ 0,01 мкМ.

Пример 10-85: 3-(1-((3,5-диметилизоксазол-4-ил)метил)-1*H*-пиразол-4-ил)-1-(3-метоксифенетил)имидазолидин-2,4-дион



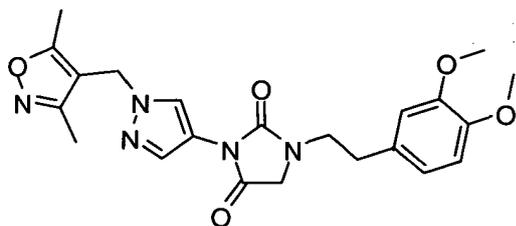
Получали как в примере 10-52 из 3-(1-((3,5-диметилизоксазол-4-ил)метил)-1*H*-пиразол-4-ил)имидазолидин-2,4-диона (пример 10-1) и 3-метоксифенетилбромида. Выход: 34%. МС М+Н рассчитано 410,18; экспериментально 410,1. Как было показано, вышеназванное соединение ингибирует рецептор горького вкуса hT2R08 и имеет IC₅₀ 0,16 мкМ.

Пример 10-86: 3-(1-((3,5-диметилизоксазол-4-ил)метил)-1*H*-пиразол-4-ил)-1-(4-гидроксифенетил)имидазолидин-2,4-дион



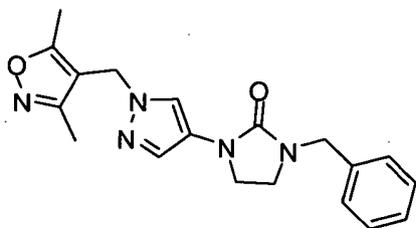
Получали как в примере 10-52 из 3-(1-((3,5-диметилизоксазол-4-ил)метил)-1*H*-пиразол-4-ил)имидазолидин-2,4-диона (пример 10-1) и 4-гидроксифенетилбромида. Выход: 31%. МС М+Н рассчитано 396,16; экспериментально 396,1. Как было показано, вышеназванное соединение ингибирует рецептор горького вкуса hT2R08 и имеет IC₅₀ 0,41 мкМ.

Пример 10-87: 1-(3,4-диметоксифенетил)-3-(1-((3,5-диметилизоксазол-4-ил)метил)-1*H*-пиразол-4-ил)имидазолидин-2,4-дион



Получали как в примере 10-52 из 3-(1-((3,5-диметилизоксазол-4-ил)метил)-1*H*-пиразол-4-ил)имидазолидин-2,4-диона (пример 10-1) и 3,4-диметоксифенетилбромида. Выход: 36%. МС М+Н рассчитано 440,19; экспериментально 440,2. Как было показано, вышеназванное соединение ингибирует рецептор горького вкуса hT2R08 и имеет IC₅₀ 0,26 мкМ.

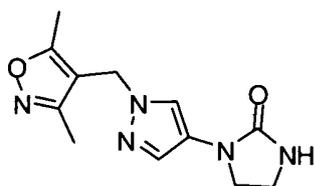
Пример 10-88: 1-бензил-3-(1-((3,5-диметилизоксазол-4-ил)метил)-1*H*-пиразол-4-ил)имидазолидин-2-он



5

1-(1-((3,5-Диметилизоксазол-4-ил)метил)-1H-пиразол-4-ил)имидазолидин-2-он (пример 10-88a) (50 мг, 0,19 ммоль) и 60% гидрид натрия (8 мг, 0,21 ммоль) в ДМФ (3 мл) перемешивали при комнатной температуре в течение 15 минут, затем охлаждали до 10 0°C. К смеси добавляли бензилбромид (33 мг, 0,19 ммоль) и оставляли нагреваться при комнатной температуре в течение 2 часов. Реакцию гасили метанолом и концентрировали на роторном испарителе. Реакционную смесь разбавляли солевым раствором (50 мл) и экстрагировали дихлорметаном (2х, 50 мл). Объединенные органические экстракты сушили над сульфатом магния, фильтровали и концентрировали на роторном 15 испарителе. Остаток очищали с помощью колоночной хроматографии на силикагеле (100%-90% дихлорметана в метаноле: 30-минутный градиент) с получением 1-бензил-3-(1-((3,5-диметилизоксазол-4-ил)метил)-1H-пиразол-4-ил)имидазолидин-2-она (21 мг, 31%) в виде белого твердого вещества. МС М+Н рассчитано 352,17; экспериментально 352,2. Как было показано, вышеназванное соединение ингибирует рецептор горького 20 вкуса hT2R08 и имеет IC₅₀ 0,71 мкМ.

Пример 10-88a: 1-(1-((3,5-диметилизоксазол-4-ил)метил)-1H-пиразол-4-ил)имидазолидин-2-он

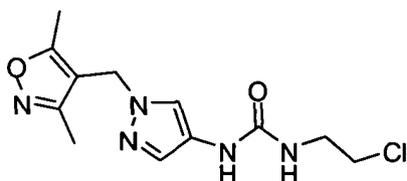


25

1-(2-Хлорэтил)-3-(1-((3,5-диметилизоксазол-4-ил)метил)-1H-пиразол-4-ил)мочевину (пример 10-88b) (115 мг, 0,39 ммоль) и 60% гидрид натрия (17 мг, 0,42 ммоль) в ДМФ 30 (2 мл) перемешивали при 0°C в течение 15 минут, затем оставляли нагреваться до комнатной температуры при перемешивании в течение 2 часов. Реакцию гасили метанолом и концентрировали на роторном испарителе. Реакционную смесь разбавляли солевым раствором (50 мл) и экстрагировали дихлорметаном (2х, 50 мл). Объединенные органические экстракты сушили над сульфатом магния, фильтровали и концентрировали 35 на роторном испарителе. Остаток очищали с помощью колоночной хроматографии на силикагеле (100%-90% дихлорметан в метаноле: 30-минутный градиент) с получением 1-(1-((3,5-диметилизоксазол-4-ил)метил)-1H-пиразол-4-ил)имидазолидин-2-она (98 мг, 97%) в виде белого твердого вещества. ¹H ЯМР (ДМСО-*d*₆, 400 МГц): δ 2,10 (с, 3H), 2,37 (с, 3H), 3,35-3,39 (м, 2H), 3,61 (д, *J*=8,8 Гц, 1H), 3,63 (д, *J*=10,4 Гц, 1H), 5,07 (с, 2H), 40 6,71 (с, 1H), 7,42 (с, 1H), 7,74 (с, 1H). МС М+Н рассчитано 262,12; экспериментально 262,1.

Пример 10-88b: 1-(2-хлорэтил)-3-(1-((3,5-диметилизоксазол-4-ил)метил)-1H-пиразол-4-ил)мочевина

45



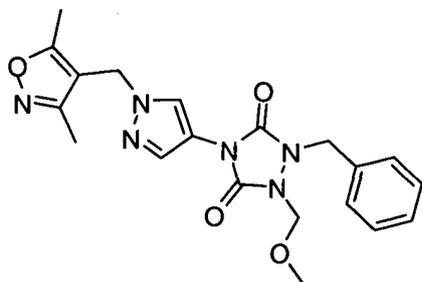
5

1-((3,5-Диметилизоксазол-4-ил)метил)-1H-пиразол-4-амин (419 мг, 2,18 ммоль) и 2-хлорэтилизоцианат (230 мг, 2,18 ммоль) в ацетонитриле (5 мл) нагревали при 65°C в течение 16 часов. Реакционную смесь охлаждали до комнатной температуры и концентрировали на роторном испарителе. Остаток очищали с помощью колоночной хроматографии на силикагеле (100%-90% дихлорметана в метаноле: 30-минутный градиент), высушивали и растирали в порошок с этилацетатом/гексаном (1/9) с получением 1-(2-хлорэтил)-3-(1-((3,5-диметилизоксазол-4-ил)метил)1H-пиразол-4-ил) мочевины (258 мг, 40%) в виде желтого твердого вещества. МС М+Н рассчитано 298,10; экспериментально 298,1

10

15

Пример 10-89: 1-бензил-4-(1-((3,5-диметилизоксазол-4-ил)метил)-1H-пиразол-4-ил)-2-(метоксиметил)-1,2,4-триаколидин-3,5-дион



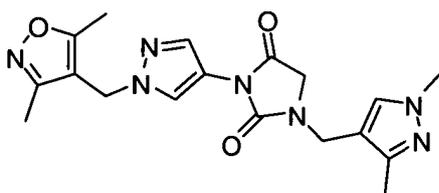
20

25

Получали как в примере 10-91 из 1-бензил-4-(1-((3,5-диметилизоксазол-4-ил)метил)-1H-пиразол-4-ил)-1,2,4-триаколидин-3,5-диона (пример 10-91a) и бромметилметилового эфира. Выход: 18%. МС М+Н рассчитано 411,17; экспериментально 411,2. Как было показано, вышеназванное соединение ингибирует рецептор горького вкуса hT2R08 и имеет IC₅₀ 0,02 мкМ.

30

Пример 10-90: 1-((1,3-диметил-1H-пиразол-4-ил)метил)-3-(1-((3,5-диметилизоксазол-4-ил)метил)-1H-пиразол-4-ил)имидазолидин-2,4-дион



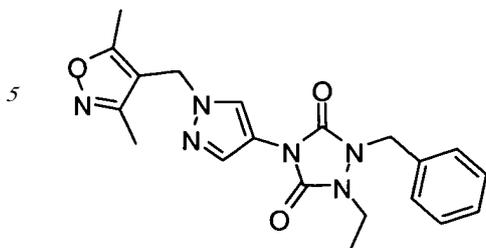
35

40

45

3-(1-((3,5-Диметилизоксазол-4-ил)метил)-1H-пиразол-4-ил)имидазолидин-2,4-дион (10a) (200 мг, 0,7 ммоль), 4-(хлорметил)-1,3-диметил-1H-пиразол (144 мг, 1 ммоль) и карбонат цезия (325 мг, 1 ммоль) растворяли в 2 мл ДМФ и подвергали действию излучения в микроволновом реакторе при 165°C в течение 5 минут. Реакционную смесь охлаждали до комнатной температуры, и удаляли осадок в виде соли с помощью фильтрования. Получали прозрачный раствор, содержащий неочищенный продукт, и очищали методом ВЭЖХ (10-95% ацетонитрил/вода; 25 минут) с получением 1-((1,3-диметил-1H-пиразол-5-ил)метил)-3-(1-((3,5-диметилизоксазол-4-ил)метил)-1H-пиразол-4-ил)имидазолидин-2,4-диона (150 мг, 53%) в виде светло-коричневого твердого вещества. ¹H ЯМР (ДМСО, 400 МГц): δ 2,09 (с, 3H), 2,14 (с, 3H), 2,20 (с, 3H), 3,70 (с, 3H), 3,99 (с, 2H), 4,55 (с, 2H), 5,19 (с, 2H), 6,06 (с, H), 7,77 (с, H), 8,17 (с, H). МС М+Н рассчитано 384,2; экспериментально 384,2. Температура плавления: 145-146°C.

Пример 10-91: 1-бензил-4-(1-((3,5-диметилизоксазол-4-ил)метил)-1*H*-пиразол-4-ил)-2-этил-1,2,4-триазолидин-3,5-дион



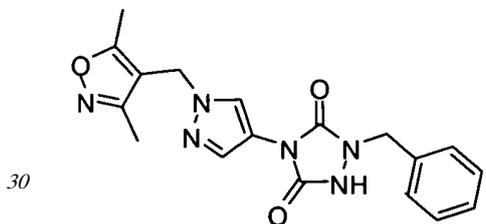
10 1-Бензил-4-(1-((3,5-диметилизоксазол-4-ил)метил)-1*H*-пиразол-4-ил)-1,2,4-триазолидин-3,5-дион (100 мг, 0,27 ммоль), бромэтан (149 мг, 1,36 ммоль) и карбонат цезия (355 мг, 1,1 ммоль) в ДМФ (5 мл) нагревали при 80°C в течение 15 часов. Реакционную смесь охлаждали до комнатной температуры, разбавляли солевым раствором (50 мл) и экстрагировали этилацетатом (2×, 50 мл). Объединенные органические экстракты

15 сушили над сульфатом магния, фильтровали и концентрировали на роторном испарителе. Остаток очищали методом ВЭЖХ (5-95% ацетонитрил в H₂O: 25-минутный градиент) с получением 1-бензил-4-(1-((3,5-диметилизоксазол-4-ил)метил)-1*H*-пиразол-4-ил)-2-этил-1,2,4-триазолидин-3,5-диона (40 мг, 37%) в виде масла. ¹H ЯМР (ДМСО-*d*₆, 400 МГц): δ 0,97 (т, *J*=7,2 Гц, 3H), 2,13 (с, 3H), 2,39 (с, 3H), 3,58 (кв, *J*=6,8 Гц, 2H), 4,80 (с, 2H), 5,18 (с, 2H), 7,28-7,36 (м, 5H), 7,77 (с, 1H), 8,19 (с, 1H). МС М+Н рассчитано 395,18; экспериментально 395,2. Как было показано, вышеназванное соединение ингибирует

20 рецептор горького вкуса hT2R08 и имеет IC₅₀ 0,04 мкМ.

Пример 10-91а: 1-бензил-4-(1-((3,5-диметилизоксазол-4-ил)метил)-1*H*-пиразол-4-ил)-1,2,4-триазолидин-3,5-дион

25



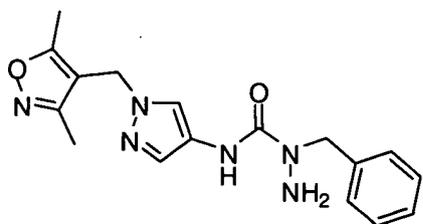
1-Бензил-*N*-(1-((3,5-диметилизоксазол-4-ил)метил)-1*H*-пиразол-4-ил) гидразинкарбоксамид (2,00 г, 5,88 ммоль), этилхлорформиат (6,38 г, 58,77 ммоль) и триэтиламин (1,78 г, 17,63 ммоль) в ацетонитриле (50 мл) нагревали при 100°C в течение

35 48 часов. Смесь охлаждали до 80°C, добавляли 1 М NaOH (водный) (5 мл) и перемешивали реакцию в течение 1 часа. Реакционную смесь охлаждали до комнатной температуры и концентрировали на роторном испарителе. Остаток растворяли в дихлорметане и фильтровали для удаления солей, и раствор концентрировали с

40 получением 1-бензил-4-(1-((3,5-диметилизоксазол-4-ил)метил)-1*H*-пиразол-4-ил)-1,2,4-триазолидин-3,5-диона (1,28 г, 60%) в виде желтого масла. МС М+Н рассчитано 367,14; экспериментально 367,2.

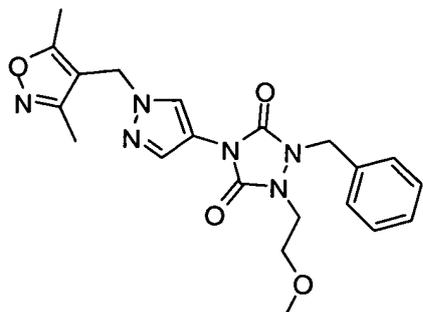
Пример 10-91b: 1-бензил-*N*-(1-((3,5-диметилизоксазол-4-ил)метил)-1*H*-пиразол-4-ил) гидразинкарбоксамид

45



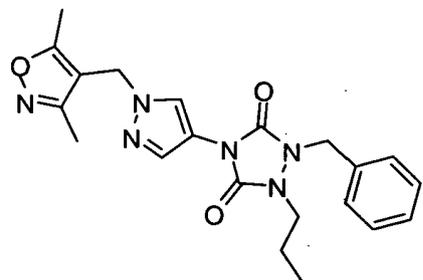
1-((3,5-Диметилизоксазол-4-ил)метил)-1*H*-пиразол-4-карбонилазид (2,79 г, 11,33 ммоль) в толуоле (70 мл) нагревали при кипячении с обратным холодильником в течение 4 часов с получением 4-((4-изоцианато-1*H*-пиразол-1-ил)метил)-3,5-диметилизоксазола *in situ*. К смеси добавляли бензилгидразина дигидрохлорид (2,44 г, 12,45 ммоль) и триэтиламин (2,29 г, 22,64 ммоль). Смесь нагревали при 100°C в течение дополнительных 4 часов. Реакционную смесь охлаждали до комнатной температуры, разбавляли этилацетатом (150 мл) и фильтровали через целит. Затем маточный раствор промывали соевым раствором (150 мл) и органическую фазу сушили над сульфатом магния, фильтровали и концентрировали. Остаток очищали с помощью колоночной хроматографии на силикагеле (100%-90% дихлорметана в метаноле: 30-минутный градиент) с получением 1-бензил-*N*-(1-((3,5-диметилизоксазол-4-ил)метил)-1*H*-пиразол-4-ил)гидразинкарбоксамид (2,00 г, 52%) в виде масла. МС М+Н рассчитано 341,16; экспериментально 341,2.

20 **Пример 10-92: 1-бензил-4-(1-((3,5-диметилизоксазол-4-ил)метил)-1*H*-пиразол-4-ил)-2-(2-метоксиэтил)-1,2,4-триазолидин-3,5-дион**



30 Получали как в примере 10-91 из 1-бензил-4-(1-((3,5-диметилизоксазол-4-ил)метил)-1*H*-пиразол-4-ил)-1,2,4-триазолидин-3,5-диона (пример 10-91а) и 2-бромэтилметилового эфира. Выход: 20%. МС М+Н рассчитано 425,19; экспериментально 425,2. Как было показано, вышеназванное соединение ингибирует рецептор горького вкуса hT2R08 и имеет IC₅₀ 0,06 мкМ.

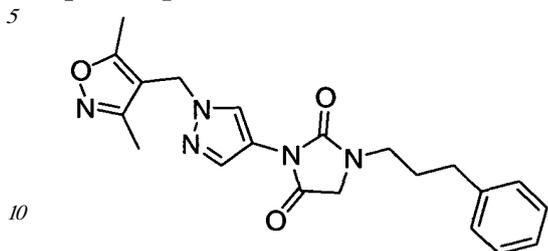
35 **Пример 10-93: 1-бензил-4-(1-((3,5-диметилизоксазол-4-ил)метил)-1*H*-пиразол-4-ил)-2-пропил-1,2,4-триазолидин-3,5-дион**



45 Получали как в примере 10-91 из 1-бензил-4-(1-((3,5-диметилизоксазол-4-ил)метил)-1*H*-пиразол-4-ил)-1,2,4-триазолидин-3,5-диона (пример 10-91а) и 1-бромпропана. Выход: 38%. МС М+Н рассчитано 409,19; экспериментально 409,2. Как было показано,

вышеназванное соединение ингибирует рецептор горького вкуса hT2R08 и имеет IC₅₀ 0,06 мкМ.

Пример 10-94: 3-(1-((3,5-диметилизоксазол-4-ил)метил)-1H-пиразол-4-ил)-1-(3-фенилпропил)имидазолидин-2,4-дион

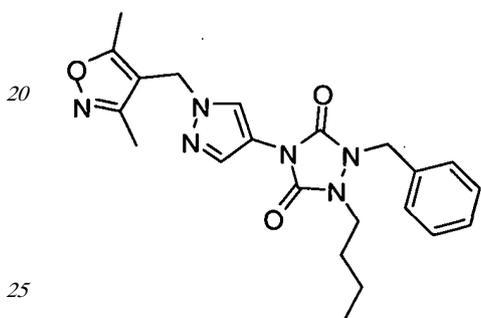


Получали как в примере 10-52 из 3-(1-((3,5-диметилизоксазол-4-ил)метил)-1H-пиразол-4-ил)имидазолидин-2,4-диона (пример 10-1) и (3-бромпропил)бензола. Выход: 36%. МС М+Н рассчитано 394,2; экспериментально 394,2. Как было показано, вышеназванное

15

соединение ингибирует рецептор горького вкуса hT2R08 и имеет IC₅₀ 0,26 мкМ.

Пример 10-95: 1-бензил-2-бутил-4-(1-((3,5-диметилизоксазол-4-ил)метил)-1H-пиразол-4-ил)-1,2,4-триазолидин-3,5-дион

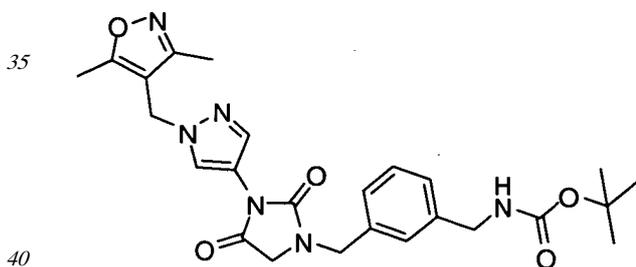


Получали как в примере 10-91 из 1-бензил-4-(1-((3,5-диметилизоксазол-4-ил)метил)-1H-пиразол-4-ил)-1,2,4-триазолидин-3,5-диона (пример 10-91a) и 1-бромбутана. Выход: 22%. МС М+Н рассчитано 423,21; экспериментально 423,15. Как было показано,

30

вышеназванное соединение ингибирует рецептор горького вкуса hT2R08 и имеет IC₅₀ 0,41 мкМ.

Пример 10-96: трет-бутил 3-((3-(1-((3,5-диметилизоксазол-4-ил)метил)-1H-пиразол-4-ил)-2,4-диоксиимидазолидин-1-ил)метил)бензилкарбамат



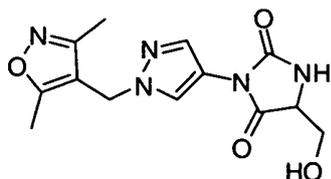
3-(1-((3,5-Диметилизоксазол-4-ил)метил)-1H-пиразол-4-ил)имидазолидин-2,4-дион (пример 10-1) (0,70 мг, 0,254 ммоль), трет-бутил 3-(гидроксиметил)бензилкарбамат (0,254 ммоль, 60 мг), диэтилазодикарбоксилат (0,50 ммоль, 86 мг) и P-tBu₃ (125 мл, 0,50 ммоль) перемешивали в ТГФ (1 мл) в течение 4 часов. Реакционную смесь разбавляли

45

этилацетатом (1,5 мл) и промывали насыщенным раствором бикарбоната натрия (2х, 1,5 мл). Собирали органическую фазу и концентрировали смесь в потоке азота. Неочищенный продукт очищали методом колоночной хроматографии на силикагеле, применяя этилацетат в качестве элюента. Чистые фракции объединяли и удаляли

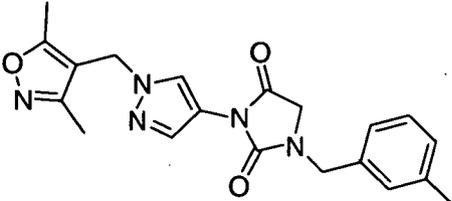
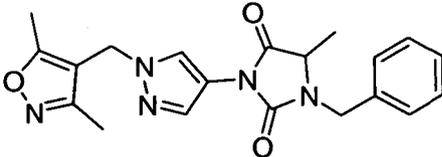
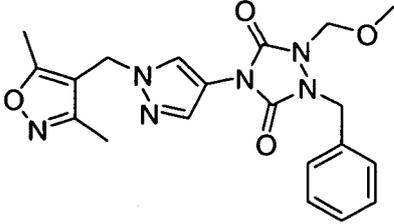
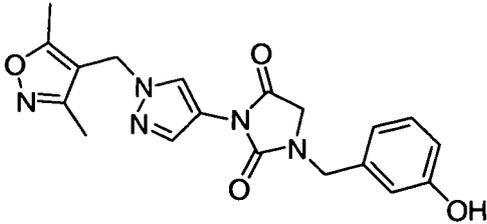
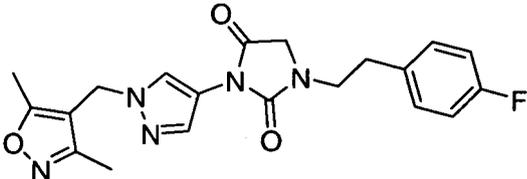
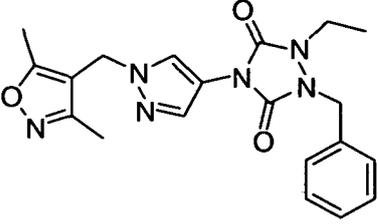
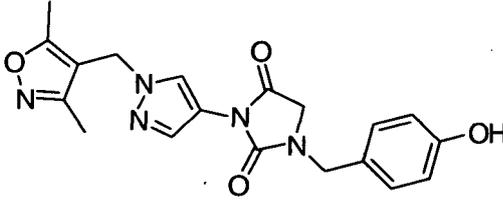
растворители на роторном испарителе с получением трет-бутил-3-((3-(1-((3,5-
 диметилизоксазол-4-ил)метил)-1H-пиразол-4-ил)-2,4-диоксиимидазолидин-1-ил)метил)
 бензилкарбамата в виде белого твердого вещества (112 мг, 90%). ¹H ЯМР (CDCl₃, 400
 МГц): δ 1,44 (с, 9H), 2,19 (с, 3H), 2,42 (с, 3H), 3,48 (ушир.с, 1H), 3,84 (с, 2H), 4,31-4,30 (д,
 J=6 Гц, 1H), 4,60 (с, 2H), 4,87 (ушир.с, 1H), 5,06 (с, 2H), 7,36-7,16 (м, 4H), 7,92 (с, 1H), 8,08
 (с, 1H). Как было показано, вышеназванное соединение ингибирует рецептор горького
 вкуса hT2R08 и имеет IC₅₀ 0,90 мкМ.

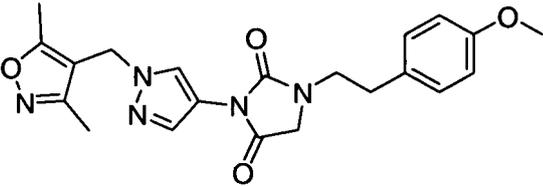
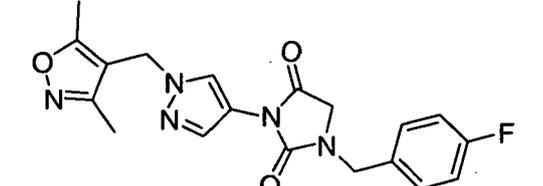
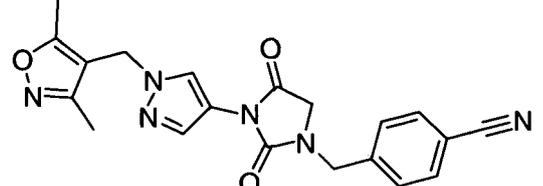
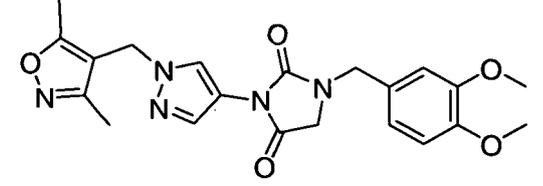
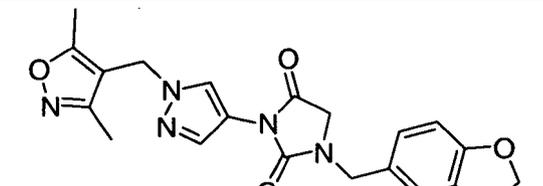
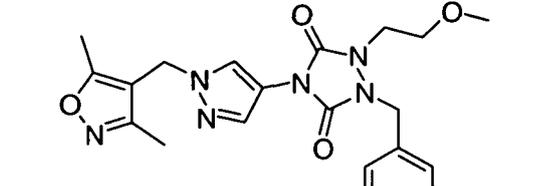
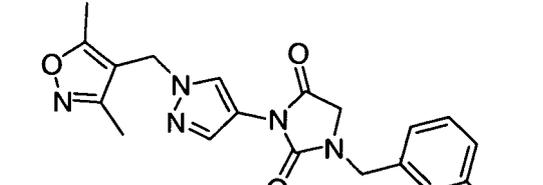
Пример 10-97: 3-(1-((3,5-диметилизоксазол-4-ил)метил)-1H-пиразол-4-ил)-5-
 (гидроксиметил)имидазолидин-2,4-дион

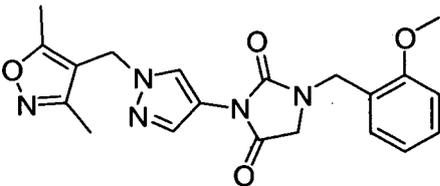
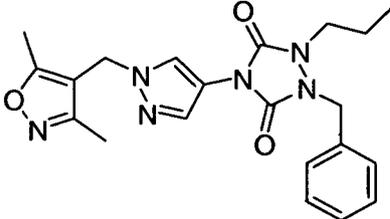
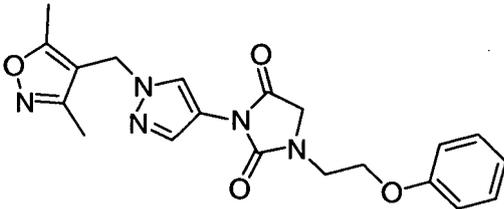
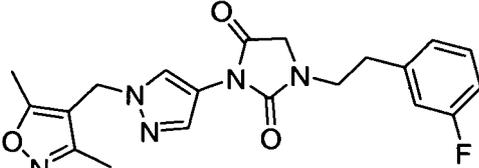
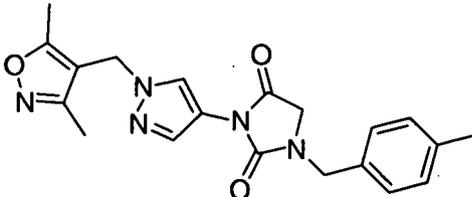
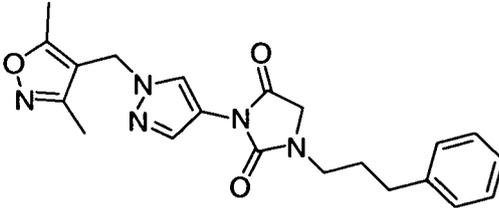
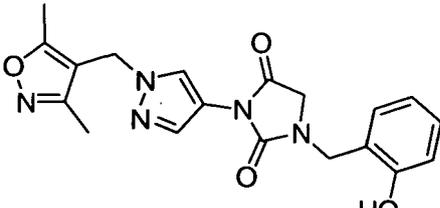


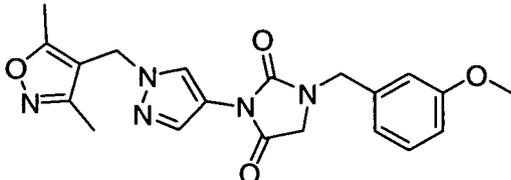
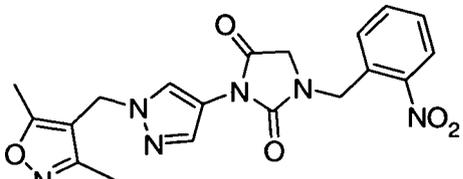
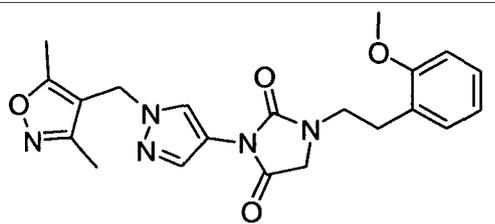
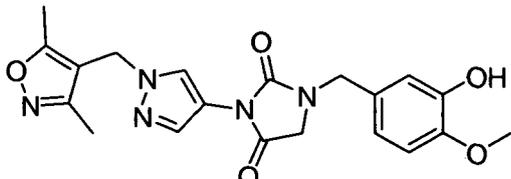
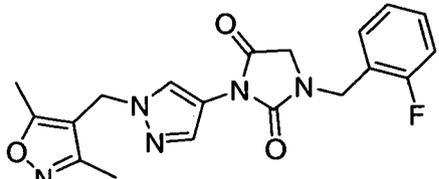
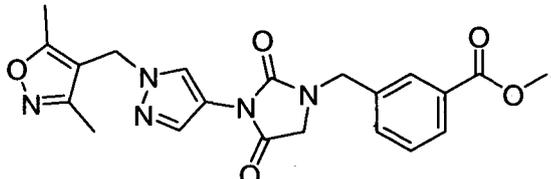
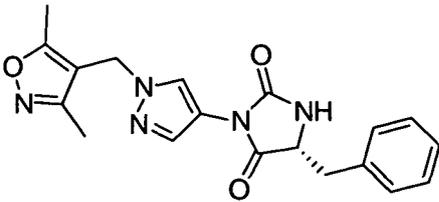
4-((4-Изоцианат-1H-пиразол-1-ил)метил)-3,5-диметилизоксазол (пример 10-1) (784
 мг, 3,6 ммоль), гидрохлорид метилового эфира серина (672 мг, 4,32 ммоль) и триэтиламин
 (1 мл, 7,2 ммоль) кипятили с обратным холодильником в толуоле (16 мл) в течение 8
 часов. Реакционную смесь оставляли охлаждаться до комнатной температуры и затем
 раствор концентрировали на роторном испарителе. Продукт очищали методом
 обращенно-фазовой ВЭЖХ (5-95% ацетонитрила в H₂O: 16-минутный градиент) с
 получением 3-(1-((3,5-диметилизоксазол-4-ил)метил)-1H-пиразол-4-ил)-5-(гидроксиметил)
 имидазолидин-2,4-диона в виде белого твердого вещества (60 мг, 25%). ¹H ЯМР (CDCl₃,
 400 МГц): δ (с, 3H), 2,40 (с, 3H), 3,13-3,07 (м, 1H), 3,94-3,93 (д, J=4 Гц, 2H), 4,21-4,19 (т,
 J=4 Гц, 1H), 5,03 (с, 2H), 6,68 (ушир.с, 1H), 7,87 (с, 1H), 7,99 (с, 1H). Как было показано,
 вышеназванное соединение ингибирует рецептор горького вкуса hT2R08 и имеет IC₅₀
 3 мкМ.

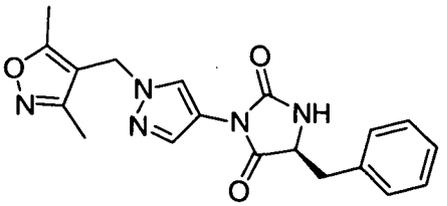
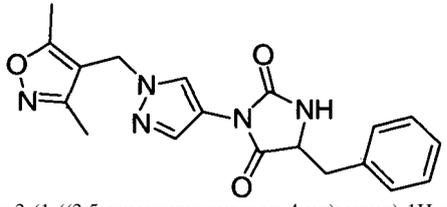
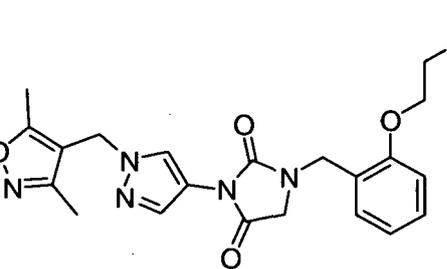
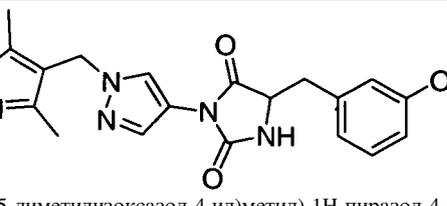
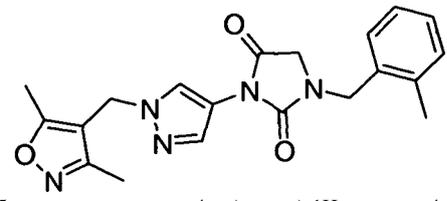
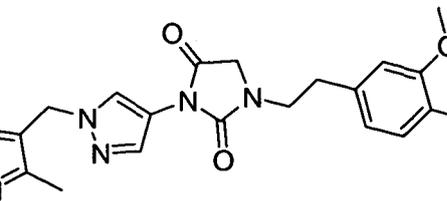
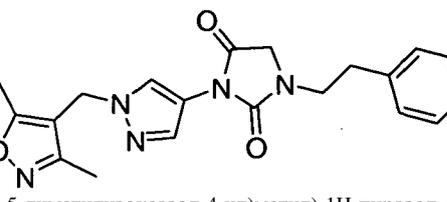
№ соединения	Соединение	hT2R8 IC ₅₀ (мкМ)
10-66	 4-(1-((3,5-диметилизоксазол-4-ил)метил)-1H-пиразол-4-ил)-1-(4- фторфенетил)-2-метил-1,2,4-триазолидин-3,5-дион	0,012
10-15	 3-(1-((3,5-диметилизоксазол-4-ил)метил)-1H-пиразол-4-ил)-1-(2- (метилтио)бензил)имидазолидин-2,4-дион	0,016
10-42	 5-бензил-3-(1-((3,5-диметилизоксазол-4-ил)метил)-1H-пиразол- 4-ил)-1-метилимидазолидин-2,4-дион	0,017

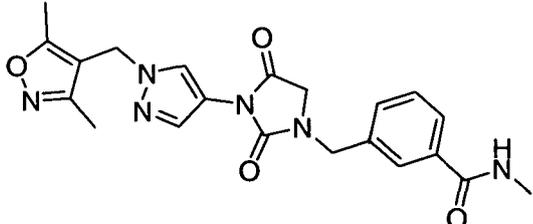
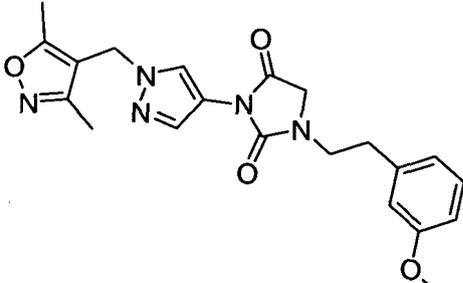
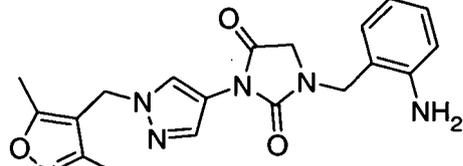
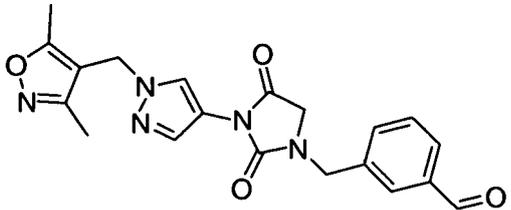
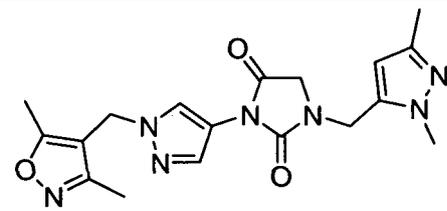
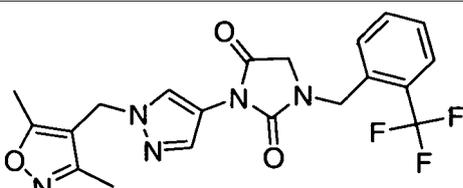
5	10-26		0,019
10	10-43		0,020
15	10-89		0,024
20	10-10		0,026
30	10-84		0,027
35	10-91		0,041
45	10-12		0,043

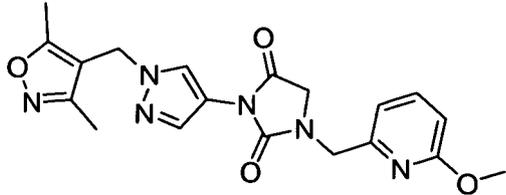
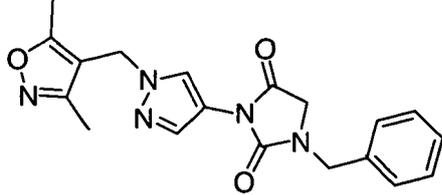
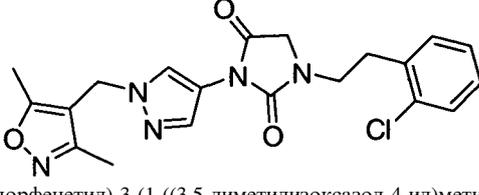
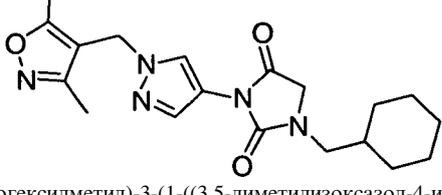
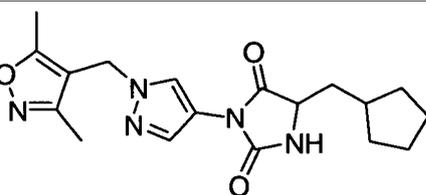
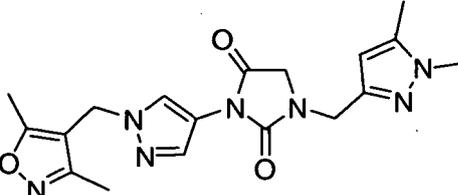
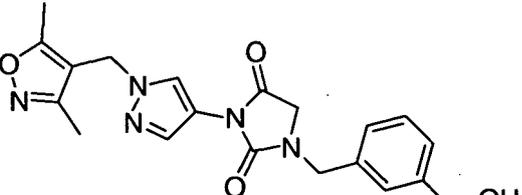
5	<p>гидроксibenзил)имидазолидин-2,4-дион</p>  <p>3-(1-((3,5-диметилизоксазол-4-ил)метил)-1H-пиразол-4-ил)-1-(4-метоксибензил)имидазолидин-2,4-дион</p>	0,044
10	 <p>3-(1-((3,5-диметилизоксазол-4-ил)метил)-1H-пиразол-4-ил)-1-(4-фторбензил)имидазолидин-2,4-дион</p>	0,045
15	 <p>4-((3-(1-((3,5-диметилизоксазол-4-ил)метил)-1H-пиразол-4-ил)-2,4-диоксоимидазолидин-1-ил)метил)бензонитрил</p>	0,048
20	 <p>1-(3,4-диметоксибензил)-3-(1-((3,5-диметилизоксазол-4-ил)метил)-1H-пиразол-4-ил)имидазолидин-2,4-дион</p>	0,051
30	 <p>1-(бензо[d][1,3]диоксол-5-илметил)-3-(1-((3,5-диметилизоксазол-4-ил)метил)-1H-пиразол-4-ил)имидазолидин-2,4-дион</p>	0,053
35	 <p>1-бензил-4-(1-((3,5-диметилизоксазол-4-ил)метил)-1H-пиразол-4-ил)-2-(2-метоксиэтил)-1,2,4-триазолидин-3,5-дион</p>	0,057
45	 <p>3-(1-((3,5-диметилизоксазол-4-ил)метил)-1H-пиразол-4-ил)-1-(3-фторбензил)имидазолидин-2,4-дион</p>	0,058

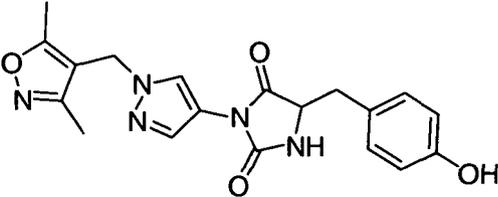
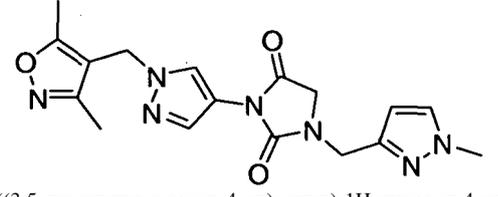
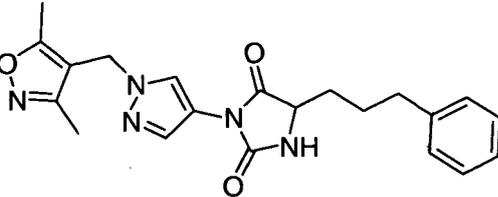
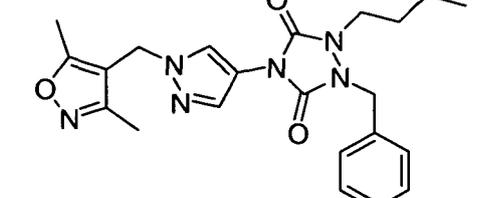
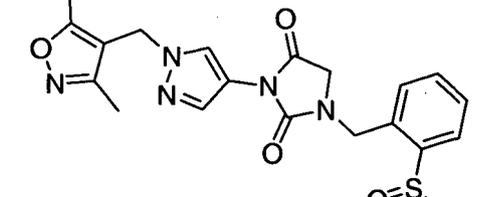
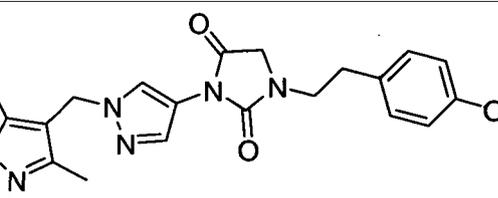
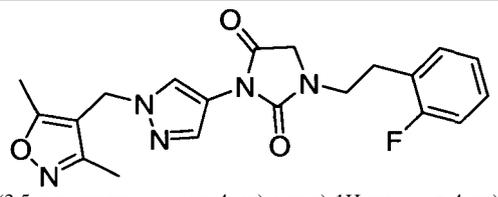
	фторбензил)имидазолидин-2,4-дион	
5	 <p>10-18</p> <p>3-(1-((3,5-диметилизоксазол-4-ил)метил)-1H-пиразол-4-ил)-1-(2-метоксibenзил)имидазолидин-2,4-дион</p>	0,060
10	 <p>10-93</p> <p>1-бензил-4-(1-((3,5-диметилизоксазол-4-ил)метил)-1H-пиразол-4-ил)-2-пропил-1,2,4-триазиолидин-3,5-дион</p>	0,062
15		
20	 <p>10-5</p> <p>3-(1-((3,5-диметилизоксазол-4-ил)метил)-1H-пиразол-4-ил)-1-(2-феноксизтил)имидазолидин-2,4-дион</p>	0,063
25	 <p>10-77</p> <p>3-(1-((3,5-диметилизоксазол-4-ил)метил)-1H-пиразол-4-ил)-1-(3-фторфенетил)имидазолидин-2,4-дион</p>	0,064
30	 <p>10-30</p> <p>3-(1-((3,5-диметилизоксазол-4-ил)метил)-1H-пиразол-4-ил)-1-(4-метилбензил)имидазолидин-2,4-дион</p>	0,065
35		
40	 <p>10-94</p> <p>3-(1-((3,5-диметилизоксазол-4-ил)метил)-1H-пиразол-4-ил)-1-(3-фенилпропил)имидазолидин-2,4-дион</p>	0,068
45	 <p>10-11</p> <p>3-(1-((3,5-диметилизоксазол-4-ил)метил)-1H-пиразол-4-ил)-1-(2-</p>	0,069

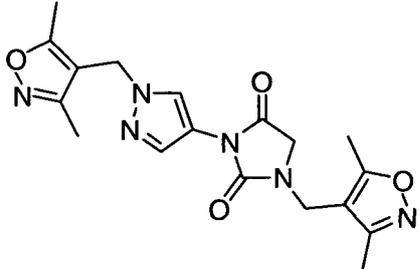
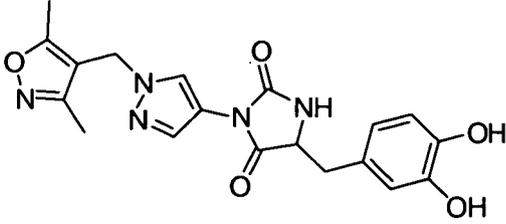
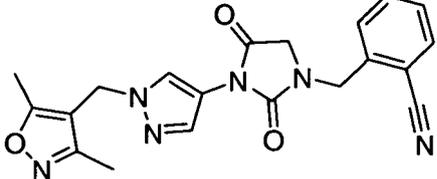
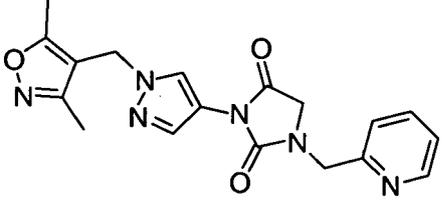
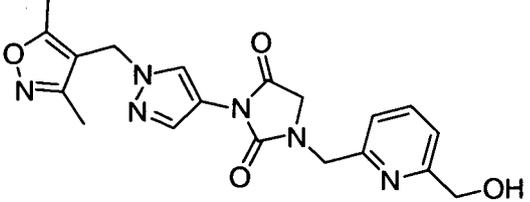
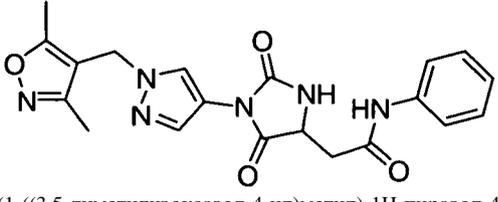
		гидроксibenзил)имидазолидин-2,4-дион	
5	10-6	 <p>3-(1-((3,5-диметилизоксазол-4-ил)метил)-1H-пиразол-4-ил)-1-(3-метоксибензил)имидазолидин-2,4-дион</p>	0,073
10	10-23	 <p>3-(1-((3,5-диметилизоксазол-4-ил)метил)-1H-пиразол-4-ил)-1-(2-нитробензил)имидазолидин-2,4-дион</p>	0,081
15	10-76	 <p>3-(1-((3,5-диметилизоксазол-4-ил)метил)-1H-пиразол-4-ил)-1-(2-метоксифенетил)имидазолидин-2,4-дион</p>	0,097
20	10-13	 <p>3-(1-((3,5-диметилизоксазол-4-ил)метил)-1H-пиразол-4-ил)-1-(3-гидрокси-4-метоксибензил)имидазолидин-2,4-дион</p>	0,087
25	10-21	 <p>3-(1-((3,5-диметилизоксазол-4-ил)метил)-1H-пиразол-4-ил)-1-(2-фторбензил)имидазолидин-2,4-дион</p>	0,090
30	10-7	 <p>метил 3-((3-(1-((3,5-диметилизоксазол-4-ил)метил)-1H-пиразол-4-ил)-2,4-диоксоимидазолидин-1-ил)метил)бензоат</p>	0,102
35	10-4	 <p>(R)-5-бензил-3-(1-((3,5-диметилизоксазол-4-ил)метил)-1H-пиразол-4-ил)имидазолидин-2,4-дион</p>	0,112

5	10-3	 <p>(S)-5-бензил-3-(1-((3,5-диметилизоксазол-4-ил)метил)-1H-пиразол-4-ил)имидазолидин-2,4-дион</p>	0,113
10	10-2	 <p>5-бензил-3-(1-((3,5-диметилизоксазол-4-ил)метил)-1H-пиразол-4-ил)имидазолидин-2,4-дион</p>	0,117
15	10-16	 <p>3-(1-((3,5-диметилизоксазол-4-ил)метил)-1H-пиразол-4-ил)-1-(2-(2-метоксиэтокси)бензил)имидазолидин-2,4-дион</p>	0,131
25	10-56	 <p>3-(1-((3,5-диметилизоксазол-4-ил)метил)-1H-пиразол-4-ил)-5-(3-метоксибензил)имидазолидин-2,4-дион</p>	0,131
30	10-20	 <p>3-(1-((3,5-диметилизоксазол-4-ил)метил)-1H-пиразол-4-ил)-1-(2-метилбензил)имидазолидин-2,4-дион</p>	0,133
35	10-87	 <p>1-(3,4-диметоксифенетил)-3-(1-((3,5-диметилизоксазол-4-ил)метил)-1H-пиразол-4-ил)имидазолидин-2,4-дион</p>	0,137
45	10-78	 <p>3-(1-((3,5-диметилизоксазол-4-ил)метил)-1H-пиразол-4-ил)-1-фенетилимидазолидин-2,4-дион</p>	0,139

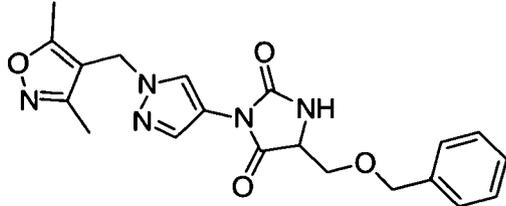
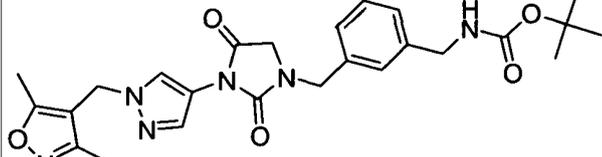
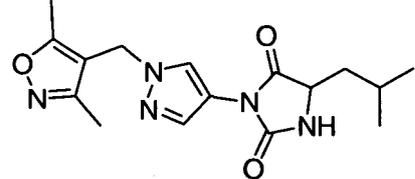
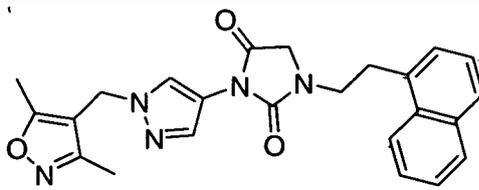
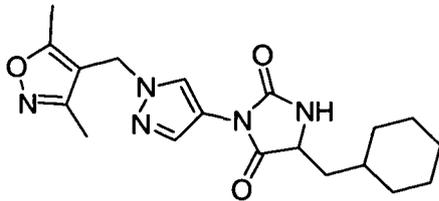
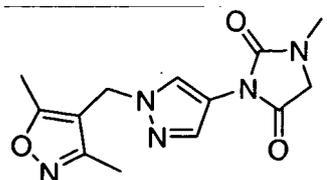
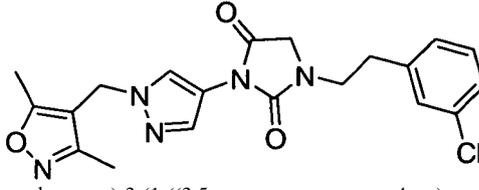
5	10-9		0,141
10	10-85		0,158
15	10-34		0,163
20	10-24		0,201
25	10-90		0,215
30	10-22		0,221
45			

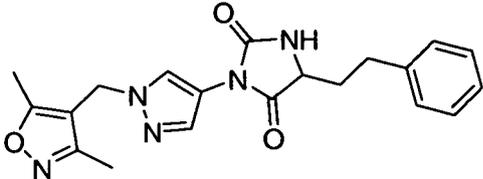
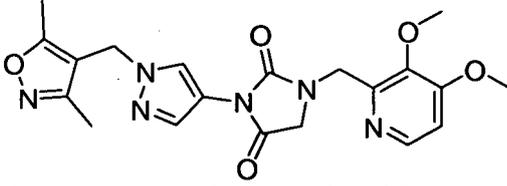
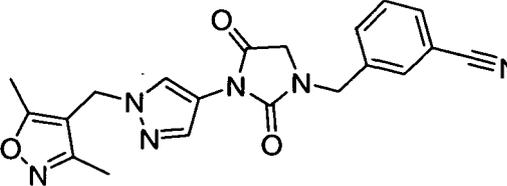
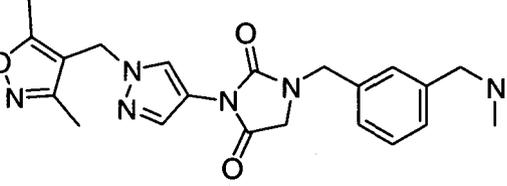
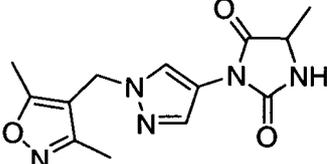
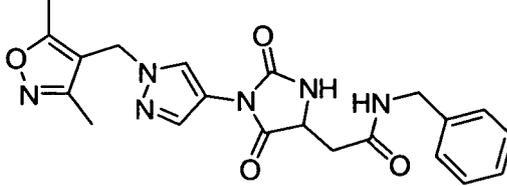
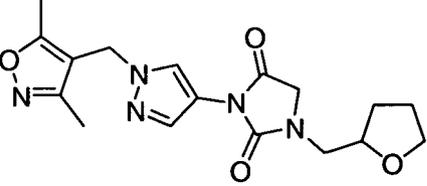
5	10-75	 <p>3-(1-((3,5-диметилизоксазол-4-ил)метил)-1Н-пиразол-4-ил)-1-(6-метоксипиридин-2-ил)метил)имидазолидин-2,4-дион</p>	0,229
10	10-53	 <p>1-бензил-3-(1-((3,5-диметилизоксазол-4-ил)метил)-1Н-пиразол-4-ил)имидазолидин-2,4-дион</p>	0,257
15	10-81	 <p>1-(2-хлорфенетил)-3-(1-((3,5-диметилизоксазол-4-ил)метил)-1Н-пиразол-4-ил)имидазолидин-2,4-дион</p>	0,248
20	10-74	 <p>1-(циклогексилметил)-3-(1-((3,5-диметилизоксазол-4-ил)метил)-1Н-пиразол-4-ил)имидазолидин-2,4-дион</p>	0,276
25			
30	10-58	 <p>5-(циклопентилметил)-3-(1-((3,5-диметилизоксазол-4-ил)метил)-1Н-пиразол-4-ил)имидазолидин-2,4-дион</p>	0,316
35	10-28	 <p>1-((1,5-диметил-1Н-пиразол-3-ил)метил)-3-(1-((3,5-диметилизоксазол-4-ил)метил)-1Н-пиразол-4-ил)имидазолидин-2,4-дион</p>	0,322
40			
45	10-33	 <p>3-(1-((3,5-диметилизоксазол-4-ил)метил)-1Н-пиразол-4-ил)-1-(3-(гидрокси)метил)бензил)имидазолидин-2,4-дион</p>	0,322

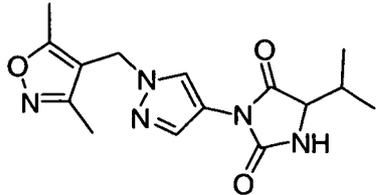
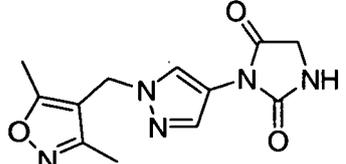
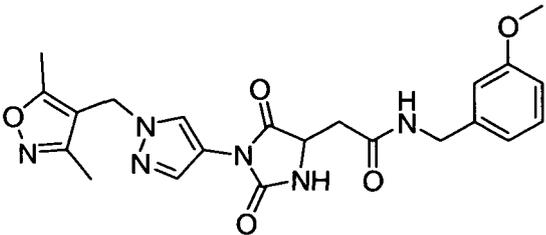
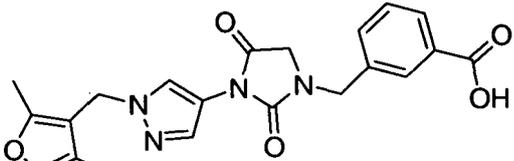
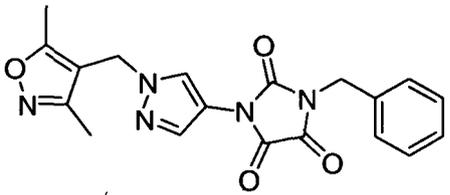
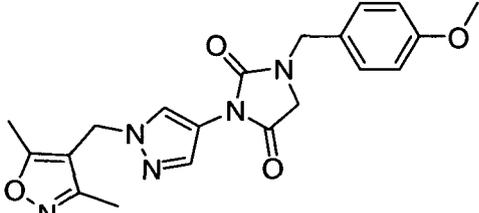
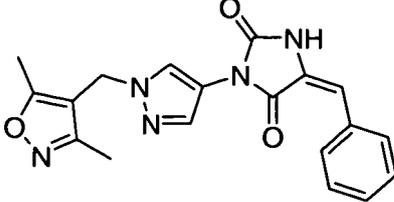
5	10-59		0,327
10	10-38		0,363
15	10-46		0,484
20	10-95		0,409
30	10-17		0,412
35	10-86		0,412
40	10-83		0,442

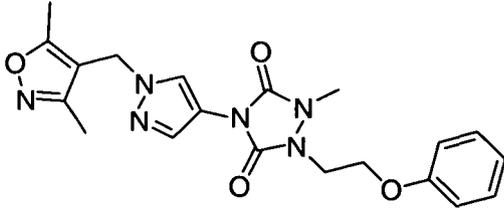
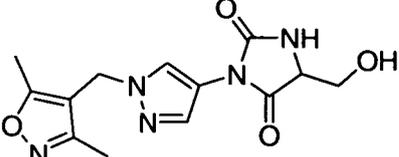
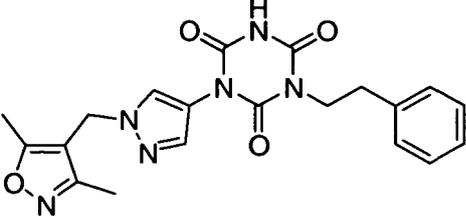
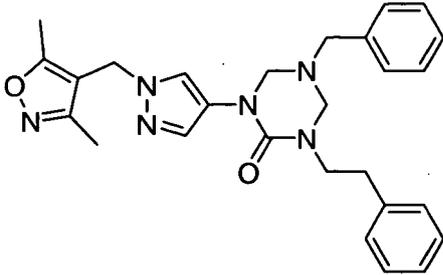
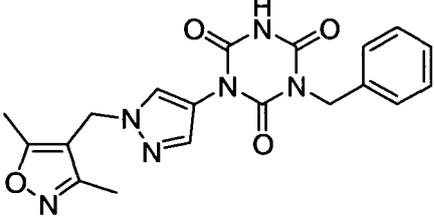
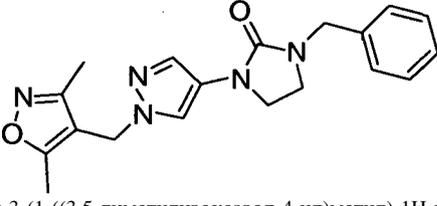
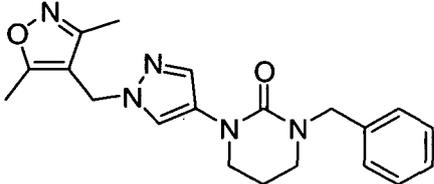
5	10-55		0,479
10	10-60		0,513
15	10-19		0,550
25	10-54		0,609
30	10-71		0,721
40	10-48		0,747

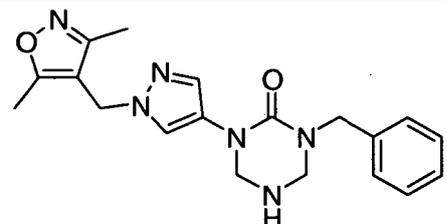
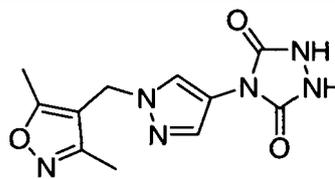
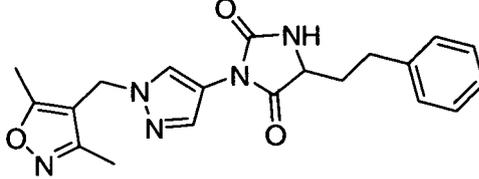
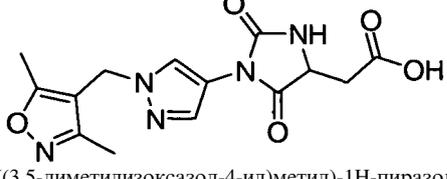
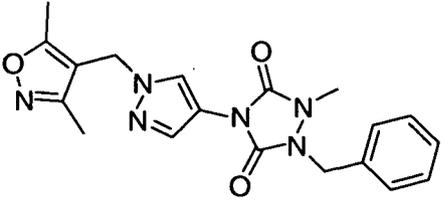
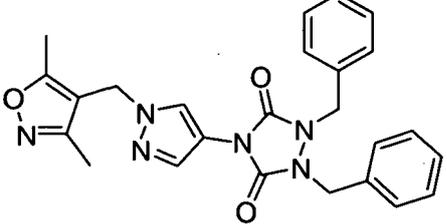
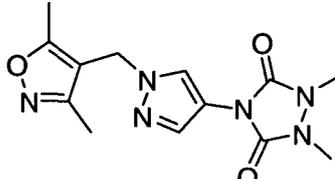
45

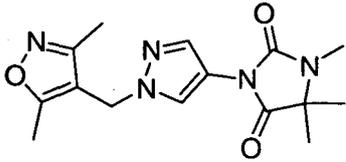
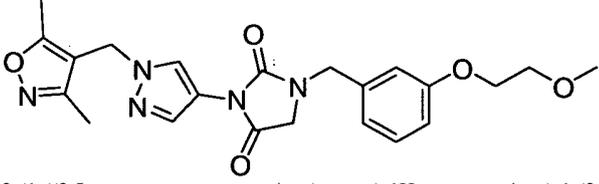
5	10-47	 <p>5-(бензилоксиметил)-3-(1-((3,5-диметилизоксазол-4-ил)метил)-1H-пиразол-4-ил)имидазолидин-2,4-дион</p>	0,766
10	10-96	 <p>трет-бутил 3-((3-(1-((3,5-диметилизоксазол-4-ил)метил)-1H-пиразол-4-ил)-2,4-диоксоимидазолидин-1-ил)метил)бензилкарбамат</p>	0,891
15	10-61	 <p>3-(1-((3,5-диметилизоксазол-4-ил)метил)-1H-пиразол-4-ил)-5-изобутилимидазолидин-2,4-дион</p>	0,912
20	10-80	 <p>3-(1-((3,5-диметилизоксазол-4-ил)метил)-1H-пиразол-4-ил)-1-(2-(нафталин-1-ил)этил)имидазолидин-2,4-дион</p>	0,927
25			
30	10-57	 <p>5-(циклогексилметил)-3-(1-((3,5-диметилизоксазол-4-ил)метил)-1H-пиразол-4-ил)имидазолидин-2,4-дион</p>	0,962
35	10-51	 <p>3-(1-((3,5-диметилизоксазол-4-ил)метил)-1H-пиразол-4-ил)-1-метилимидазолидин-2,4-дион</p>	0,966
40			
45	10-82	 <p>1-(3-хлорфенетил)-3-(1-((3,5-диметилизоксазол-4-ил)метил)-1H-пиразол-4-ил)имидазолидин-2,4-дион</p>	0,982

5	10-45	 <p>3-(1-((3,5-диметилизоксазол-4-ил)метил)-1Н-пиразол-4-ил)-5-фенилимидазолидин-2,4-дион</p>	0,793
10	10-72	 <p>1-((3,4-диметоксипиридин-2-ил)метил)-3-(1-((3,5-диметилизоксазол-4-ил)метил)-1Н-пиразол-4-ил)имидазолидин-2,4-дион</p>	0,999
15	10-25	 <p>3-((3-(1-((3,5-диметилизоксазол-4-ил)метил)-1Н-пиразол-4-ил)-2,4-диоксоимидазолидин-1-ил)метил)бензонитрил</p>	1,003
20	10-37	 <p>1-(3-((диметиламино)метил)бензил)-3-(1-((3,5-диметилизоксазол-4-ил)метил)-1Н-пиразол-4-ил)имидазолидин-2,4-дион</p>	1,220
25	10-41	 <p>3-(1-((3,5-диметилизоксазол-4-ил)метил)-1Н-пиразол-4-ил)-5-метилимидазолидин-2,4-дион</p>	1,285
35	10-49	 <p>N-бензил-2-(1-(1-((3,5-диметилизоксазол-4-ил)метил)-1Н-пиразол-4-ил)-2,5-диоксоимидазолидин-4-ил)ацетамид</p>	1,329
40	10-73	 <p>3-(1-((3,5-диметилизоксазол-4-ил)метил)-1Н-пиразол-4-ил)-1-(тетрагидрофуран-2-ил)имидазолидин-2,4-дион</p>	1,362
45			

5	10-62	 <p>3-(1-((3,5-диметилизоксазол-4-ил)метил)-1Н-пиразол-4-ил)-5-изопропилимидазолидин-2,4-дион</p>	1,440
10	10-1	 <p>3-(1-((3,5-диметилизоксазол-4-ил)метил)-1Н-пиразол-4-ил)имидазолидин-2,4-дион</p>	1,696
15	10-50	 <p>2-(1-(1-((3,5-диметилизоксазол-4-ил)метил)-1Н-пиразол-4-ил)-2,5-диоксоимидазолидин-4-ил)-N-(3-метоксибензил)ацетамид</p>	1,773
20	10-8	 <p>3-((3-(1-((3,5-диметилизоксазол-4-ил)метил)-1Н-пиразол-4-ил)-2,4-диоксоимидазолидин-1-ил)метил)бензойная кислота</p>	1,798
25	9-5	 <p>1-бензил-3-(1-((3,5-диметилизоксазол-4-ил)метил)-1Н-пиразол-4-ил)имидазолидин-2,4,5-трион</p>	2,493
30	10-29	 <p>3-(1-((3,5-диметилизоксазол-4-ил)метил)-1Н-пиразол-4-ил)-1-(4-метоксибензил)имидазолидин-2,4-дион</p>	3,117
35	10-63	 <p>(E)-5-бензилиден-3-(1-((3,5-диметилизоксазол-4-ил)метил)-1Н-пиразол-4-ил)имидазолидин-2,4-дион</p>	

5	10-67		
10	10-97		
15	9-8		6,151
20	9-7		6,580
30	9-9		1,562
40	10-88		1,250
45	9-5		3,434

<p>5</p> <p>9-6</p>	<p>1-бензил-3-(1-((3,5-диметилизоксазол-4-ил)метил)-1Н-пиразол-4-ил)тетрагидропириимидин-2(1Н)-он</p>  <p>1-бензил-3-(1-((3,5-диметилизоксазол-4-ил)метил)-1Н-пиразол-4-ил)-1,3,5-триазинан-2-он</p>	<p>6,029</p>
<p>10</p> <p>10-68</p>	 <p>4-(1-((3,5-диметилизоксазол-4-ил)метил)-1Н-пиразол-4-ил)-1,2,4-триазилидин-3,5-дион</p>	
<p>15</p> <p>10-45</p>	 <p>3-(1-((3,5-диметилизоксазол-4-ил)метил)-1Н-пиразол-4-ил)-5-фенетилимидазолидин-2,4-дион</p>	<p>0,793</p>
<p>20</p> <p>10-44</p>	 <p>2-(1-((3,5-диметилизоксазол-4-ил)метил)-1Н-пиразол-4-ил)-2,5-диоксоимидазолидин-4-ил)уксусная кислота</p>	
<p>25</p> <p>10-65</p>	 <p>1-бензил-4-(1-((3,5-диметилизоксазол-4-ил)метил)-1Н-пиразол-4-ил)-2-метил-1,2,4-триазилидин-3,5-дион</p>	<p>0,019</p>
<p>30</p> <p>10-70</p>	 <p>1,2-добензил-4-(1-((3,5-диметилизоксазол-4-ил)метил)-1Н-пиразол-4-ил)-1,2,4-триазилидин-3,5-дион</p>	<p>1,799</p>
<p>35</p> <p>40</p> <p>45</p> <p>10-69</p>	 <p>4-(1-((3,5-диметилизоксазол-4-ил)метил)-1Н-пиразол-4-ил)-1,2-</p>	<p>0,707</p>

	диметил-1,2,4-триазаолидин-3,5-дион	
5 10-52		0,810
10 10-14		0,071

Пример 11. Вклад hT2R8 в горький вкус сахарина у людей с “нечувствительными к вкусу” вариантами генов hT2R43 и hT2R44

На фиг.6 показаны зависимости доза-ответ и воздействие сахарина на активность рецепторов в трансфецированных клетках, экспрессирующих варианты hT2R43, hT2R44 и hT2R8. hT2R8 является менее чувствительным по отношению к сахарину в анализе *in vitro*, чем “чувствительные ко вкусу” аллели hT2R43-W35 и hT2R44-W35, но реагирует лучше, чем “нечувствительные к вкусу” аллели hT2R43-S35 и hT2R44-R35. Pronin et al., *Curr. Biol.* 17: 1403-8 (2007). На основе генотипического анализа были выбраны пять испытуемых с “чувствительными ко вкусу” аллелями (hT2R43-W35 и/или hT2R44-W35) и пять испытуемых с “нечувствительными ко вкусу” аллелями (hT2R43-S35 и hT2R44-R35). Каждому субъекту давали 6 пар растворов и просили определить, какие из проб в паре имеют более горький вкус. Результаты, показанные ниже в таблице 8, свидетельствуют, что блокатор hT2R8 Cpd-D уменьшает горький вкус сахарина у людей с “нечувствительными ко вкусу” аллелями hT2R43 и hT2R44, но не оказывает влияния на людей с “чувствительными ко вкусу” аллелями указанных генов.

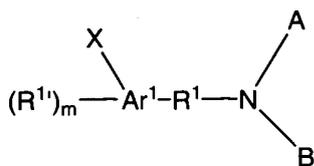
Таблица 8

Результаты теста на вкус

Тест на вкус	Агонист горького вкуса	Группа генотипа	Выбраны как более горькие		Значение P
			без	+ Cpd-D	
1	сахарин	hT2R43-W35 и/или hT2R44-W35	13	17	0,82
2	сахарин	hT2R43-S35 и hT2R44-R35	27	3	<0,001

Другие типичные соединения, предложенные в настоящем изобретении и/или подходящие для применения в способах согласно настоящему изобретению, включают соединения, имеющие следующие формулы.

Согласно первому аспекту, предложено соединение структурной формулы (I):



(I)

или соль, гидрат, сольват или N-оксид указанного соединения, где

Ar¹ представляет собой пяти- или шестичленное арильное, гетероарильное или

циклоалкильное кольцо;

m равен 0, 1, 2 или 3;

R¹ представляет собой SO₂; C=O; C=S; или C=NOR⁴;

X выбран из группы, включающей водород, галоген, алкил, замещенный алкил, арил, замещенный арил, арилалкил, замещенный арилалкил, ацил, замещенный ацил, гетероалкил, замещенный гетероалкил, гетероарил, замещенный гетероарил, гетероарилалкил, замещенный гетероарилалкил, 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) и P(O)(R⁵)(OR⁶);

каждый R¹ независимо выбран из группы, включающей водород, галоген, алкил, замещенный алкил, арил, замещенный арил, арилалкил, замещенный арилалкил, ацил, замещенный ацил, гетероалкил, замещенный гетероалкил, гетероарил, замещенный гетероарил, гетероарилалкил, замещенный гетероарилалкил, 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) и P(O)(R⁵)(OR⁶);

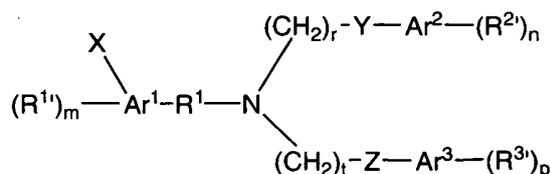
или, альтернативным образом, X и/или по меньшей мере один R¹ совместно с атомами, с которыми они связаны, образуют арильное, замещенное арильное, гетероарильное, замещенное гетероарильное, циклоалкильное, замещенное циклоалкильное, циклогетероалкильное или замещенное циклогетероалкильное кольцо, при этом кольцо необязательно является сконденсированным с еще одним арильным, замещенным арильным, гетероарильным, замещенным гетероарильным, циклоалкильным, замещенным циклоалкильным, циклогетероалкильным или замещенным циклогетероалкильным кольцом;

R⁴-R⁸ независимо выбраны из группы, включающей водород, алкил, замещенный алкил, арил, замещенный арил, арилалкил, замещенный арилалкил, гетероалкил, замещенный гетероалкил, гетероарил, замещенный гетероарил, гетероарилалкил и замещенный гетероарилалкил, или, альтернативным образом, R⁵ и R⁶, R⁶ и R⁷, R⁷ и R⁸ совместно с атомами, с которыми они связаны, образуют циклогетероалкильное или замещенное циклогетероалкильное кольцо;

A и B независимо выбраны из группы, включающей водород, алкил, замещенный алкил, арил, замещенный арил, арилалкил, замещенный арилалкил, ацил, замещенный ацил, гетероалкил, замещенный гетероалкил, гетероарил, замещенный гетероарил, гетероарилалкил, замещенный гетероарилалкил, и

b равен 0, 1 или 2;

Согласно второму аспекту, в изобретении предложены соединения структурной формулы (II), приведенной ниже:



(II)

или соль, гидрат, сольват или N-оксид указанных соединений, где

Ar^1 , Ar^2 и Ar^3 независимо представляют собой пяти- или шестичленное арильное, гетероарильное или циклоалкильное кольцо;

m равен 0, 1, 2 или 3;

n и p независимо равны 0, 1, 2, 3 или 4;

g и t независимо равны 0, 1 или 2;

Y и Z независимо выбраны из группы, включающей CR^6R^7 , $C=O$, $C=S$, $C=NOR^6$, O , NR^6 и $S(O)_b$;

R^1 выбран из группы, включающей SO_2 , $C=O$, $C=S$ и $C=NOR^4$;

X можно выбрать из группы, включающей водород, алкил, замещенный алкил, арил, замещенный арил, арилалкил, замещенный арилалкил, ацил, замещенный ацил, гетероалкил, замещенный гетероалкил, гетероарил, замещенный гетероарил, гетероарилалкил, замещенный гетероарилалкил, CN , NO_2 , $-OR^6$, $S(O)_bR^6$, NR^6R^7 , $CONR^6R^7$, CO_2R^6 , $NR^6CO_2R^7$, $NR^6CONR^7R^8$, $NR^6CSNR^7R^8$, $NR^6C(=NH)NR^7R^8$, $SO_2NR^5R^6$, $NR^5SO_2R^6$, $NR^5SO_2NR^6R^7$, $B(OR^5)(OR^6)$, $P(O)(OR^5)(OR^6)$ и $P(O)(R^5)(OR^6)$;

X предпочтительно выбран из группы, включающей водород, гетероалкил, замещенный гетероалкил, гетероарил, замещенный гетероарил, гетероарилалкил, замещенный гетероарилалкил, CN , $S(O)_bR^6$, $CONR^6R^7$, $-CO_2R^6$, $SO_2NR^5R^6$, $NR^5SO_2R^6$, $NR^5SO_2NR^6R^7$, $B(OR^5)(OR^6)$, $P(O)(OR^5)(OR^6)$ и $P(O)(R^5)(OR^6)$.

каждый $R^{1'}$ независимо выбран из группы, включающей водород, галоген, алкил, замещенный алкил, арил, замещенный арил, арилалкил, замещенный арилалкил, ацил, замещенный ацил, гетероалкил, замещенный гетероалкил, гетероарил, замещенный гетероарил, гетероарилалкил, замещенный гетероарилалкил, CN , NO_2 , OR^6 , $S(O)_bR^6$, NR^6R^7 , $CONR^6R^7$, CO_2R^6 , $NR^6CO_2R^7$, $NR^6CONR^7R^8$, $NR^6CSNR^7R^8$, $NR^6C(=NH)NR^7R^8$, $SO_2NR^5R^6$, $NR^5SO_2R^6$, $NR^5SO_2NR^6R^7$, $B(OR^5)(OR^6)$, $P(O)(OR^5)(OR^6)$ и $P(O)(R^5)(OR^6)$;

каждый $R^{2'}$ независимо выбран из группы, включающей водород, галоген, алкил, замещенный алкил, арил, замещенный арил, арилалкил, замещенный арилалкил, ацил, замещенный ацил, гетероалкил, замещенный гетероалкил, гетероарил, замещенный гетероарил, гетероарилалкил, замещенный гетероарилалкил, CN , NO_2 , OR^6 , $S(O)_bR^6$, NR^6R^7 , $CONR^6R^7$, CO_2R^6 , $NR^6CO_2R^7$, $NR^6CONR^7R^8$, $NR^6CSNR^7R^8$, $NR^6C(=NH)NR^7R^8$, $SO_2NR^5R^6$, $NR^5SO_2R^6$, $NR^5SO_2NR^6R^7$, $B(OR^5)(OR^6)$ и $P(O)(OR^5)(OR^6)$;

каждый $R^{3'}$ независимо выбран из группы, включающей водород, галоген, алкил, замещенный алкил, арил, замещенный арил, арилалкил, замещенный арилалкил, ацил, замещенный ацил, гетероалкил, замещенный гетероалкил, гетероарил, замещенный гетероарил, гетероарилалкил, замещенный гетероарилалкил, CN , NO_2 , OR^6 , $S(O)_bR^6$, NR^6R^7 , $CONR^6R^7$, CO_2R^6 , $NR^6CO_2R^7$, $NR^6CONR^7R^8$, $NR^6CSNR^7R^8$, $NR^6C(=NH)NR^7R^8$, $SO_2NR^5R^6$, $NR^5SO_2R^6$, $NR^5SO_2NR^6R^7$, $B(OR^5)(OR^6)$, $P(O)(OR^5)(OR^6)$ и $P(O)(R^5)(OR^6)$;

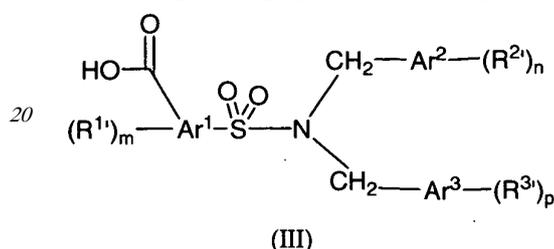
или, альтернативным образом, X и/или по меньшей мере один из $R^{1'}$ совместно с

атомами, с которыми они связаны, образуют арильное, замещенное арильное, гетероарильное, замещенное гетероарильное, циклоалкильное, замещенное циклоалкильное, циклогетероалкильное или замещенное циклогетероалкильное кольцо, при этом указанное кольцо может быть конденсировано с еще одним арильным, замещенным арильным, гетероарильным, замещенным гетероарильным, циклоалкильным, замещенным циклоалкильным, циклогетероалкильным или замещенным циклогетероалкильным кольцом;

R^4 - R^8 независимо представляют собой водород, алкил, замещенный алкил, арил, замещенный арил, арилалкил, замещенный арилалкил, гетероалкил, замещенный гетероалкил, гетероарил, замещенный гетероарил, гетероарилалкил или замещенный гетероарилалкил или, альтернативным образом, R^5 и R^6 , R^6 и R^7 , R^7 и R^8 совместно с атомами, с которыми они связаны, образуют циклогетероалкильное или замещенное циклогетероалкильное кольцо;

b равен 0, 1 или 2.

Согласно еще одному аспекту, в изобретении предложены соединения, имеющие структурную формулу (III), приведенную ниже:



или соль, гидрат, сольват или N-оксид указанных соединений, где

Ar^1 , Ar^2 и Ar^3 независимо представляют собой пяти- или шестичленное арильное, гетероарильное или циклоалкильное кольцо, при этом Ar^2 и Ar^3 могут отсутствовать; m равен 0, 1, 2 или 3;

n и p независимо равны 0, 1, 2, 3 или 4;

каждый $R^{1'}$ независимо выбран из группы, включающей водород, галоген, алкил, замещенный алкил, арил, замещенный арил, арилалкил, замещенный арилалкил, ацил, замещенный ацил, гетероалкил, замещенный гетероалкил, гетероарил, замещенный гетероарил, гетероарилалкил, замещенный гетероарилалкил, CN, NO_2 , OR^6 , $\text{S}(\text{O})_b\text{R}^6$, NR^6R^7 , CONR^6R^7 , CO_2R^6 , $\text{NR}^6\text{CO}_2\text{R}^7$, $\text{NR}^6\text{CONR}^7\text{R}^8$, $\text{NR}^6\text{CSNR}^7\text{R}^8$, $\text{NR}^6\text{C}(\text{=NH})\text{NR}^7\text{R}^8$, $\text{SO}_2\text{NR}^5\text{R}^6$, $\text{NR}^5\text{SO}_2\text{R}^6$, $\text{NR}^5\text{SO}_2\text{NR}^6\text{R}^7$, $\text{B}(\text{OR}^5)(\text{OR}^6)$, $\text{P}(\text{O})(\text{OR}^5)(\text{OR}^6)$ и $\text{P}(\text{O})(\text{R}^5)(\text{OR}^6)$;

каждый $R^{2'}$ независимо выбран из группы, включающей водород, галоген, алкил, замещенный алкил, арил, замещенный арил, арилалкил, замещенный арилалкил, ацил, замещенный ацил, гетероалкил, замещенный гетероалкил, гетероарил, замещенный гетероарил, гетероарилалкил, замещенный гетероарилалкил, CN, NO_2 , OR^6 , $\text{S}(\text{O})_b\text{R}^6$, NR^6R^7 , CONR^6R^7 , CO_2R^6 , $\text{NR}^6\text{CO}_2\text{R}^7$, $\text{NR}^6\text{CONR}^7\text{R}^8$, $\text{NR}^6\text{CSNR}^7\text{R}^8$, $\text{NR}^6\text{C}(\text{=NH})\text{NR}^7\text{R}^8$, $\text{SO}_2\text{NR}^5\text{R}^6$, $\text{NR}^5\text{SO}_2\text{R}^6$, $\text{NR}^5\text{SO}_2\text{NR}^6\text{R}^7$, $\text{B}(\text{OR}^5)(\text{OR}^6)$, $\text{P}(\text{O})(\text{OR}^5)(\text{OR}^6)$ и $\text{P}(\text{O})(\text{R}^5)(\text{OR}^6)$;

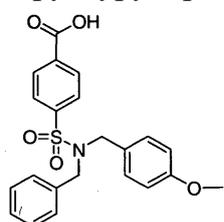
каждый $R^{3'}$ независимо выбран из группы, включающей водород, галоген, алкил, замещенный алкил, арил, замещенный арил, арилалкил, замещенный арилалкил, ацил, замещенный ацил, гетероалкил, замещенный гетероалкил, гетероарил, замещенный

гетероарил, гетероарилалкил, замещенный гетероарилалкил, 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) и P(O)(R⁵)(OR⁶);

R⁵-R⁸ независимо представляют собой водород, алкил, замещенный алкил, арил, замещенный арил, арилалкил, замещенный арилалкил, гетероалкил, замещенный гетероалкил, гетероарил, замещенный гетероарил, гетероарилалкил или замещенный гетероарилалкил или, альтернативным образом, R⁵ и R⁶, R⁶ и R⁷, R⁷ и R⁸ совместно с атомами, с которыми они связаны, образуют циклогетероалкильное или замещенное циклогетероалкильное кольцо;

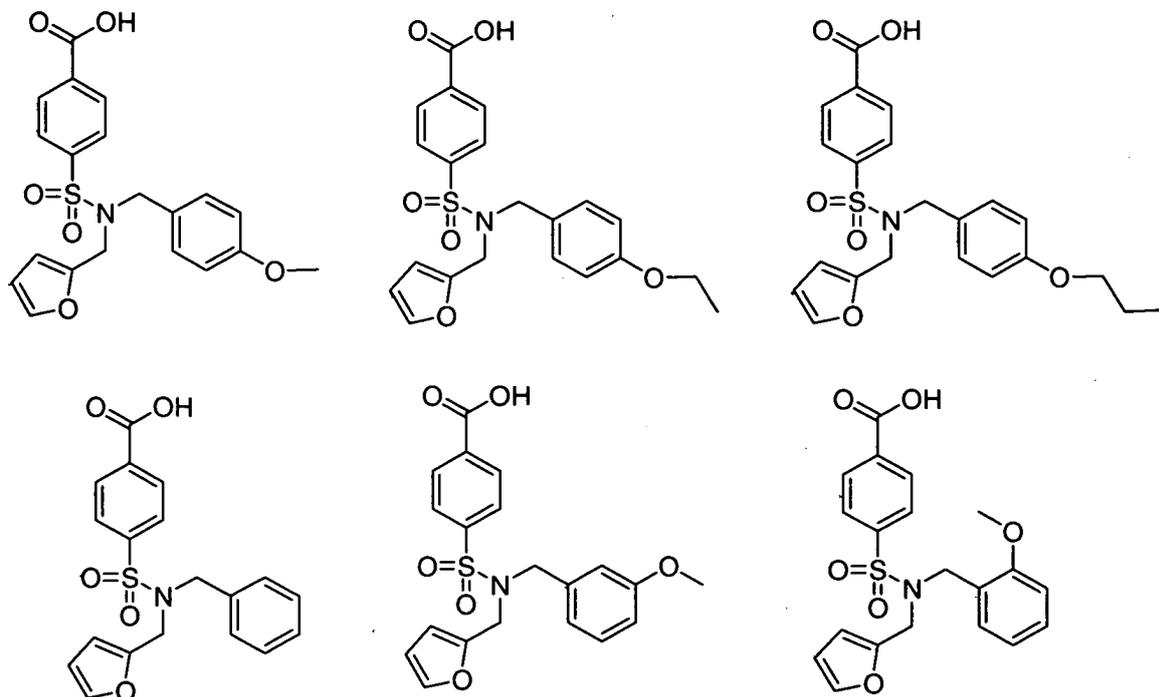
b равен 0, 1 или 2.

Согласно еще одному аспекту, в изобретении предложено соединение, имеющее структуру, представленную ниже:



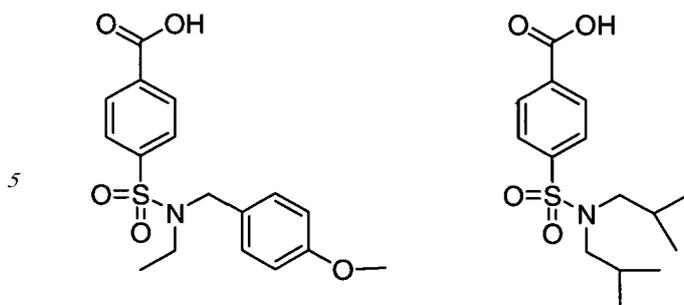
или соль, гидрат, сольват или N-оксид указанного соединения.

Согласно еще одному аспекту, в изобретении предложены соединения, имеющие структуру, представленную ниже:



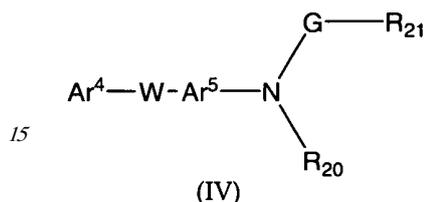
или соль, гидрат, сольват или N-оксид указанных соединений.

Согласно еще другим вариантам реализации, в изобретении предложены соединения, имеющие структуру, представленную ниже:



или соль, гидрат, сольват или N-оксид указанных соединений.

10 Согласно родственному аспекту, предложено соединение структурной формулы (IV):



или соль, гидрат, сольват или N-оксид указанного соединения, где

20 Ar^4 и Ar^5 независимо представляют собой пяти- или шестичленное арильное или гетероарильное кольцо;

W выбран из группы, включающей CR^6R^7 , $C=O$, $C=S$, $C=NOR^6$; O , NR^6 , S , SO , SO_2 и $(CH_2)_n$;

n равен 0, 1, 2 или 3;

25 G выбран из группы, включающей CR^6R^7 , $C=O$, $C=S$, $C=NOR^6$ и $S(O)_b$;

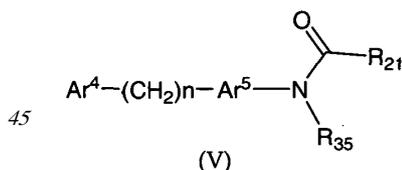
R^{20} выбран из группы, включающей водород, арилалкенил, гетероарилалкенил, арилалкил, гетероарилалкил, арил, гетероарил, алкил, алкокси-алкил, алкенил, циклоалкил, циклоалкенил и замещенные производные;

30 R^{21} выбран из группы, включающей арилалкенил, гетероарилалкенил, арилалкил, гетероарилалкил, арил, гетероарил, алкил, алкокси-алкил, алкенил, циклоалкил, циклоалкенил и замещенные производные;

R^6 и R^7 независимо выбраны из группы, включающей водород, алкил, замещенный алкил, арил, замещенный арил, арилалкил, замещенный арилалкил, гетероалкил, замещенный гетероалкил, гетероарил, замещенный гетероарил, гетероарилалкил или замещенный гетероарилалкил, или, альтернативным образом, R^6 и R^7 совместно с атомами, с которыми они связаны, образуют циклогетероалкильное или замещенное циклогетероалкильное кольцо; и

40 b равен 0, 1 или 2.

Согласно еще одному родственному аспекту, предложено соединение структурной формулы (V):



или соль, гидрат, сольват или N-оксид указанного соединения, где

Ar^4 и Ar^5 независимо представляют собой пяти- или шестичленное арильное или

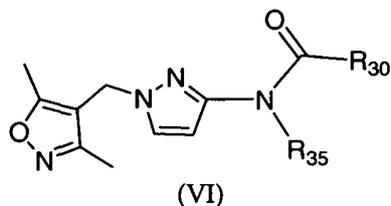
гетероарильное кольцо;

n равен 0, 1, 2 или 3;

R^{21} выбран из группы, включающей арилалкенил, гетероарилалкенил, арилалкил, гетероарилалкил, арил, гетероарил, алкил, алкокси-алкил, алкенил, циклоалкил, циклоалкенил и замещенные производные;

R^{35} выбран из группы, включающей водород, алкил и замещенный алкил.

Согласно дополнительному варианту реализации изобретения, предложено соединение структурной формулы (VI)

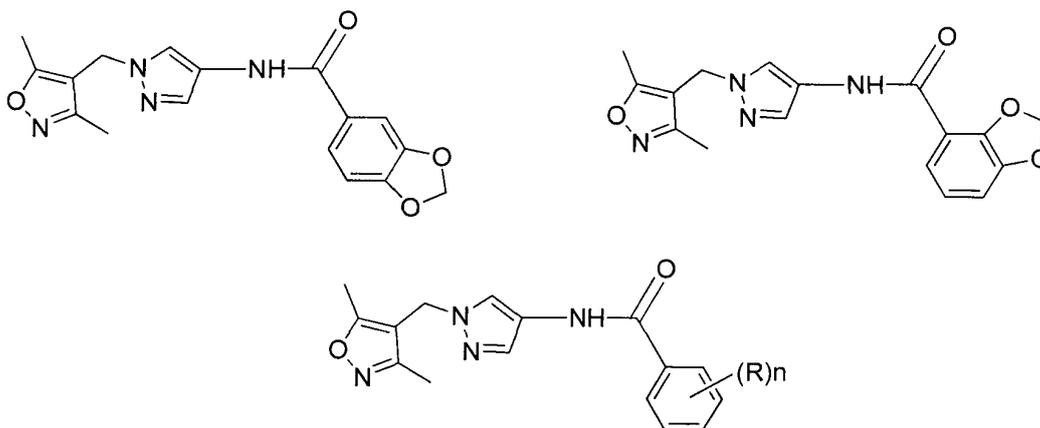


или соль, гидрат, сольват или N-оксид указанного соединения, где

R^{30} выбран из группы, включающей арилалкенил, гетероарилалкенил, арилалкил, гетероарилалкил, арил, гетероарил, алкил, алкокси-алкил, алкенил, циклоалкил, циклоалкенил и замещенные производные;

R^{35} выбран из группы, включающей водород, алкил и замещенный алкил.

Согласно дополнительному варианту реализации, в изобретении предложены соединения, имеющие структуру, представленную ниже:



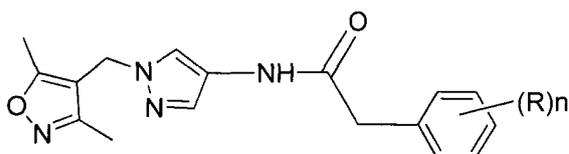
или соль, гидрат, сольват или N-оксид указанных соединений,

где каждый R независимо представляет собой Cl, MeO, CN, EtO, OH, Me, -SO₂Me, F

или H, и

n равен 0, 1, 2, 3 или 4.

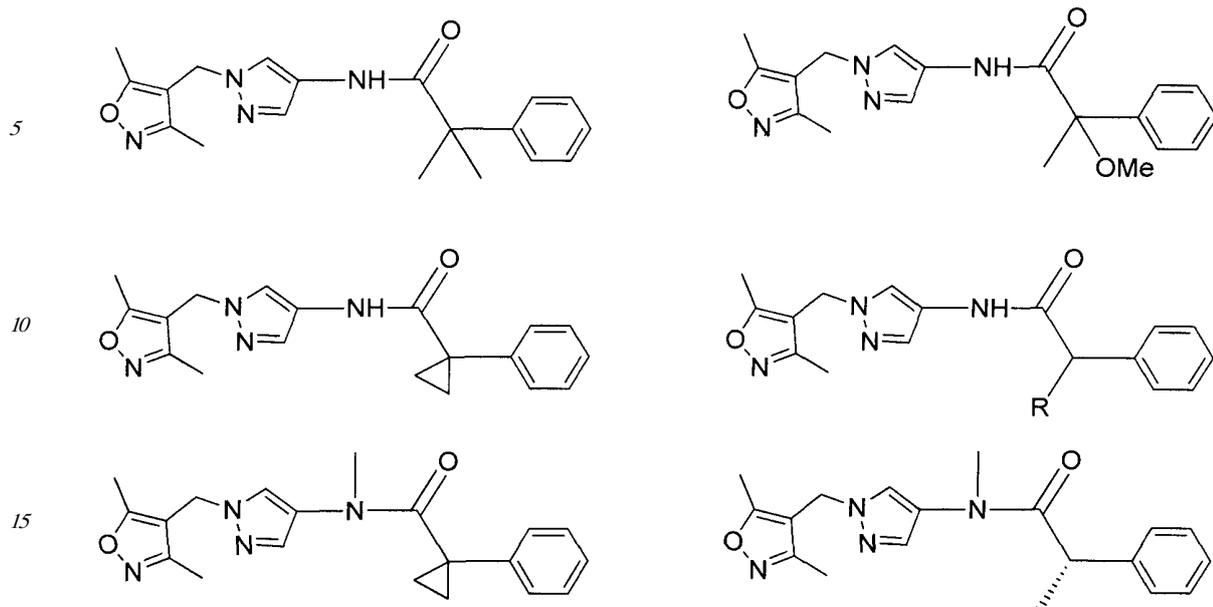
Согласно другим вариантам реализации, в изобретении предложены соединения, имеющие структуру, представленную ниже:



или соль, гидрат, сольват или N-оксид указанных соединений, где каждый R независимо представляет собой MeO или OH, и n равен 0, 1, 2, 3 или 4.

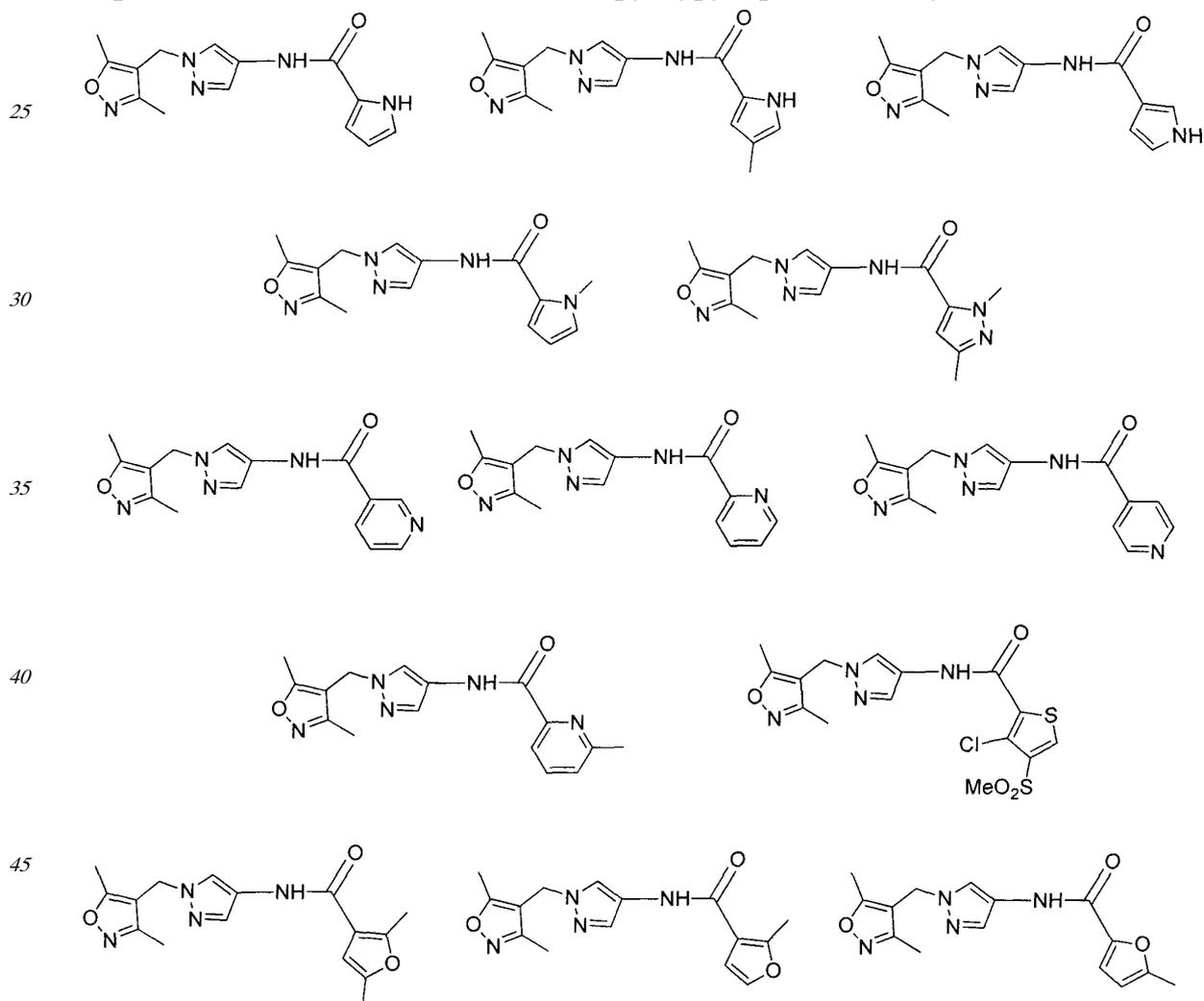
Согласно другим вариантам реализации, в изобретении предложены соединения,

имеющие структуру, представленную ниже:

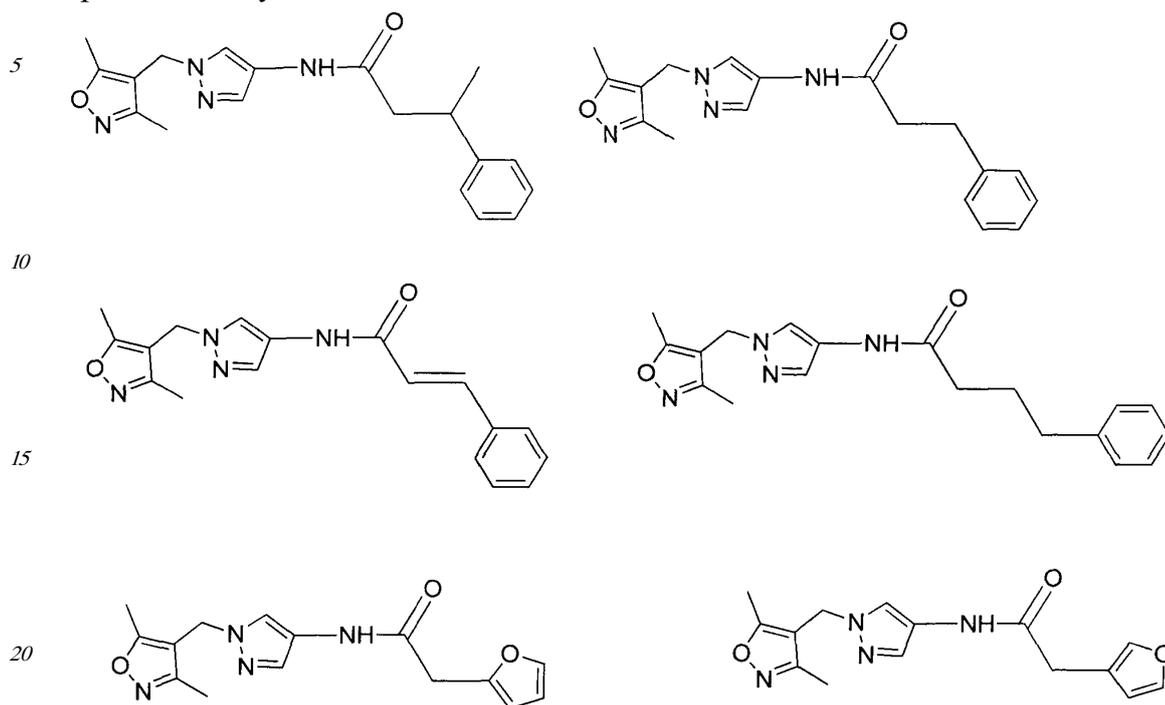


или соль, гидрат, сольват или N-оксид указанных соединений, где R представляет собой H, Me, Et, OCOMe, CH₂OH, OMe или Ph.

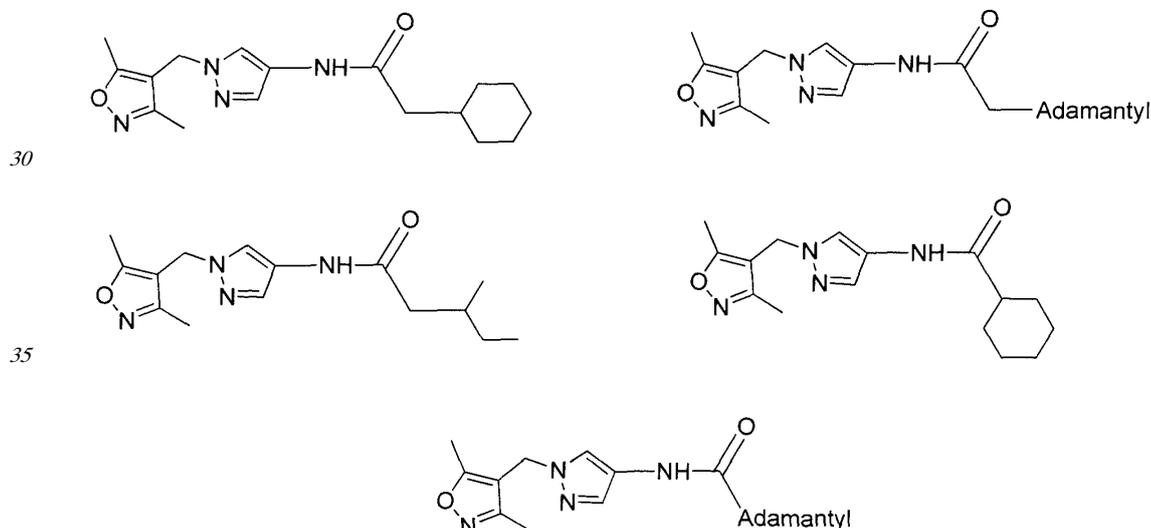
Согласно следующим вариантам реализации, в изобретении предложены соединения, имеющие структуру, представленную ниже:



или соль, гидрат, сольват или N-оксид указанных соединений. Согласно другим вариантам реализации, в изобретении предложены соединения, имеющие структуру, представленную ниже:



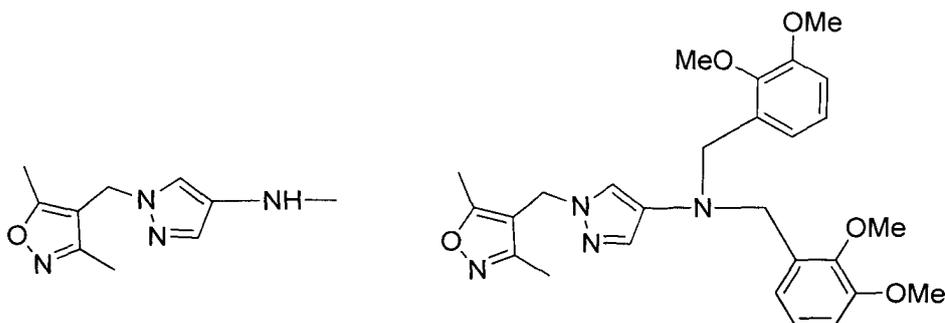
или соль, гидрат, сольват или N-оксид указанных соединений. Согласно другим вариантам реализации, в изобретении предложены соединения, имеющие структуру, представленную ниже:



или соль, гидрат, сольват или N-оксид указанных соединений. Согласно другим вариантам реализации, в изобретении предложены соединения, имеющие структуру, представленную ниже:

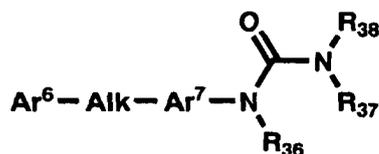
45

5



10

Согласно одному аспекту, изобретение относится к соединению формулы:



15

или соли, гидрату, сольвату, N-оксиду или пролекарству указанного соединения, где Ar^6 и Ar^7 , которые могут быть одинаковыми или различными независимо друг от друга, представляют собой пяти- или шестичленную арильную группу или пяти- или шестичленную гетероарильную группу;

20

Alk представляет собой алкильную группу, необязательно содержащую гетероатом; R_{36} и R_{37} , которые могут быть одинаковыми или различными независимо друг от друга, представляют собой H, алкил, или R_{36} и R_{37} совместно с атомами, к которым они присоединены, образуют необязательно замещенный пяти- или шестичленный гетероцикл; и

25

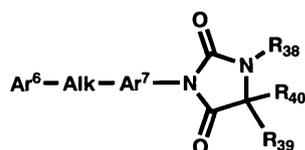
R_{38} представляет собой H, замещенный или незамещенный алкил, замещенный или незамещенный циклоалкилалкил, замещенный или незамещенный гетероциклоалкилалкил, замещенный или незамещенный арил, замещенный или незамещенный ариламидоалкил, замещенный или незамещенный гетероариламидоалкил, замещенный или незамещенный арилалкил, замещенный или незамещенный арилалкокси, замещенный или незамещенный гетероарил, замещенный или незамещенный гетероарилалкил или галогеналкил.

35

Согласно одному аспекту, соединения, предложенные в изобретении, содержат пятичленный гетероцикл. Согласно одному варианту реализации, пятичленный гетероцикл представляет собой гидантоин или замещенную или незамещенную циклическую мочевины.

Согласно одному варианту реализации, гидантоин представляет собой гидантоин формулы:

40



45

или соль, гидрат, сольват, N-оксид или пролекарство указанного соединения, где Ar^6 и Ar^7 , которые могут быть одинаковыми или различными независимо друг от друга, представляют собой пяти- или шестичленную арильную группу или пяти- или шестичленную гетероарильную группу;

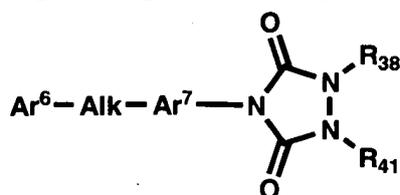
Alk представляет собой алкильную группу, необязательно содержащую гетероатом;

R_{38} представляет собой H, замещенный или незамещенный алкил, замещенный или незамещенный циклоалкилалкил, замещенный или незамещенный

гетероциклоалкилалкил, замещенный или незамещенный арил, замещенный или незамещенный ариламидоалкил, замещенный или незамещенный гетероариламидоалкил, замещенный или незамещенный арилалкил, замещенный или незамещенный арилалкоксо, замещенный или незамещенный гетероарил, замещенный или незамещенный гетероарилалкил или галогеналкил; и

R_{39} и R_{40} , которые могут быть одинаковыми или различными независимо друг от друга, представляют собой H, замещенный или незамещенный алкил, замещенный или незамещенный циклоалкил алкил, замещенный или незамещенный гетероциклоалкилалкил, замещенный или незамещенный арил, замещенный или незамещенный ариламидоалкил, замещенный или незамещенный арилалкиламидоалкил, замещенный или незамещенный гетероариламидоалкил, замещенный или незамещенный гетероарилалкиламидоалкил, замещенный или незамещенный арилалкил, замещенный или незамещенный арилалкоксо, замещенный или незамещенный гетероарил, замещенный или незамещенный гетероарилалкил, галогеналкил, или R_{39} и R_{40} совместно с атомом углерода, к которому они присоединены, образуют C=O группу или замещенную или незамещенную алкенильную группу.

Согласно еще одному аспекту, соединения, предложенные в изобретении, содержат пятичленный гетероцикл, который представляет собой уразол. Согласно одному варианту реализации, указанный уразол представляет собой уразол формулы:



или соль, гидрат, сольват, N-оксид или пролекарство указанного соединения,

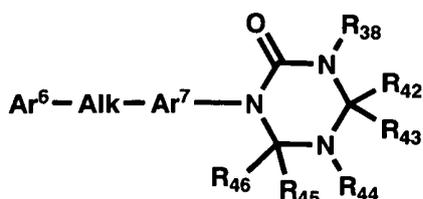
где Ar^6 и Ar^7 , которые могут быть одинаковыми или различными независимо друг от друга, представляют собой пяти- или шестичленную арильную группу или пяти- или шестичленную гетероарильную группу;

Alk представляет собой алкильную группу, необязательно содержащую гетероатом;

R_{38} представляет собой H, замещенный или незамещенный алкил, замещенный или незамещенный циклоалкилалкил, замещенный или незамещенный гетероциклоалкилалкил, замещенный или незамещенный арил, замещенный или незамещенный ариламидоалкил, замещенный или незамещенный гетероариламидоалкил, замещенный или незамещенный арилалкил, замещенный или незамещенный арилалкоксо, замещенный или незамещенный гетероарил, замещенный или незамещенный гетероарилалкил или галогеналкил; и

R_{41} представляет собой H, замещенный или незамещенный алкил, замещенный или незамещенный циклоалкилалкил, замещенный или незамещенный гетероциклоалкилалкил, замещенный или незамещенный арил, замещенный или незамещенный ариламидоалкил, замещенный или незамещенный арилалкиламидоалкил, замещенный или незамещенный гетероариламидоалкил, замещенный или незамещенный гетероарилалкиламидоалкил, замещенный или незамещенный арилалкил, замещенный или незамещенный арилалкоксо, замещенный или незамещенный гетероарил, замещенный или незамещенный гетероарилалкил или галогеналкил.

Согласно еще одному аспекту, соединения, предложенные в изобретении, содержат шестичленный гетероцикл. Согласно одному варианту реализации, шестичленный гетероцикл представляет собой шестичленный гетероцикл формулы:



5

или соль, гидрат, сольват, N-оксид или пролекарство указанного соединения, где R₃₈ представляет собой H, замещенный или незамещенный алкил, замещенный или незамещенный циклоалкилалкил, замещенный или незамещенный гетероциклоалкилалкил, замещенный или незамещенный арил, замещенный или незамещенный ариламидоалкил, замещенный или незамещенный гетероариламидоалкил, замещенный или незамещенный арилалкил, замещенный или незамещенный арилалкокси, замещенный или незамещенный гетероарил, замещенный или незамещенный гетероарилалкил или галогеналкил; и

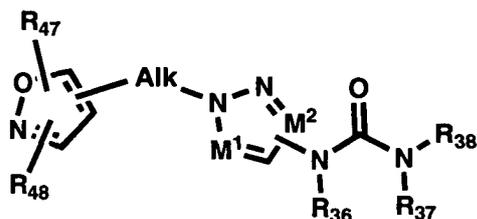
10

15

R₄₂, R₄₃, R₄₄, R₄₅ и R₄₆, которые могут быть одинаковыми или различными независимо друг от друга, представляют собой H, замещенный или незамещенный алкил, замещенный или незамещенный циклоалкил алкил, замещенный или незамещенный арилалкил, замещенный или незамещенный арилалкокси, замещенный или незамещенный гетероарил, замещенный или незамещенный гетероарилалкил, или R₄₂ и R₄₃ или R₄₅ и R₄₆ совместно с атомами углерода, к которым они оба присоединены, образуют C=O группу.

20

Согласно еще одному аспекту, изобретение относится к соединению формулы:



25

30

или соли, гидрату, сольвату, N-оксиду или пролекарству указанного соединения, где Alk представляет собой алкильную группу, необязательно содержащую гетероатом;

M¹ представляет собой N или CR₄₉, где R₄₉ представляет собой H или замещенный или незамещенный алкил;

35

M² представляет собой N или CR₅₀, где R₅₀ представляет собой H или замещенный или незамещенный алкил;

R₃₆ и R₃₇, которые могут быть одинаковыми или различными независимо друг от друга, представляют собой H, алкил, или R₃₆ и R₃₇ совместно с атомами, к которым они присоединены, образуют необязательно замещенный пяти- или шестичленный гетероцикл; и

40

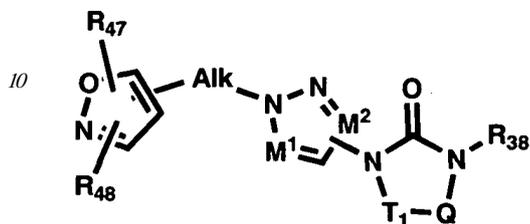
R₃₈ представляет собой H, замещенный или незамещенный алкил, замещенный или незамещенный циклоалкилалкил, замещенный или незамещенный гетероциклоалкилалкил, замещенный или незамещенный арил, замещенный или незамещенный ариламидоалкил, замещенный или незамещенный гетероариламидоалкил, замещенный или незамещенный арилалкил, замещенный или незамещенный арилалкокси, замещенный или незамещенный гетероарил, замещенный или незамещенный гетероарилалкил или галогеналкил;

45

R₄₇ представляет собой H, замещенный или незамещенный алкил, замещенный или незамещенный алкокси, замещенный или незамещенный арил, замещенный или незамещенный арилалкил или галоген; и

R₄₈ представляет собой H, замещенный или незамещенный алкил, замещенный или незамещенный алкокси, замещенный или незамещенный арил, замещенный или незамещенный арилалкил или галоген.

Согласно еще одному аспекту, изобретение относится к соединению формулы:



или соли, гидрату, сольвату, N-оксиду или пролекарству указанного соединения, где Alk представляет собой алкильную группу, необязательно содержащую гетероатом;

T₁ представляет собой C=O и Q представляет собой CR₅₁R₅₂ или NR₅₁, где R₅₁ и R₅₂, которые могут быть одинаковыми или различными независимо друг от друга, представляют собой H, замещенный или незамещенный алкил, замещенный или незамещенный циклоалкилалкил, замещенный или незамещенный гетероциклоалкилалкил, замещенный или незамещенный арил, замещенный или незамещенный ариламидаалкил, замещенный или незамещенный арилалкиламидаалкил, замещенный или незамещенный гетероариламидаалкил, замещенный или незамещенный гетероарилалкиламидаалкил, замещенный или незамещенный арилалкил, замещенный или незамещенный арилалкокси, замещенный или незамещенный гетероарил, замещенный или незамещенный гетероарилалкил, галогеналкил, или R₅₁ и R₅₂ совместно с атомом углерода, к которому они присоединены, образуют C=O группу или замещенную или незамещенную алкенильную группу;

M¹ представляет собой N или CR₄₉, где R₄₉ представляет собой H или замещенный или незамещенный алкил;

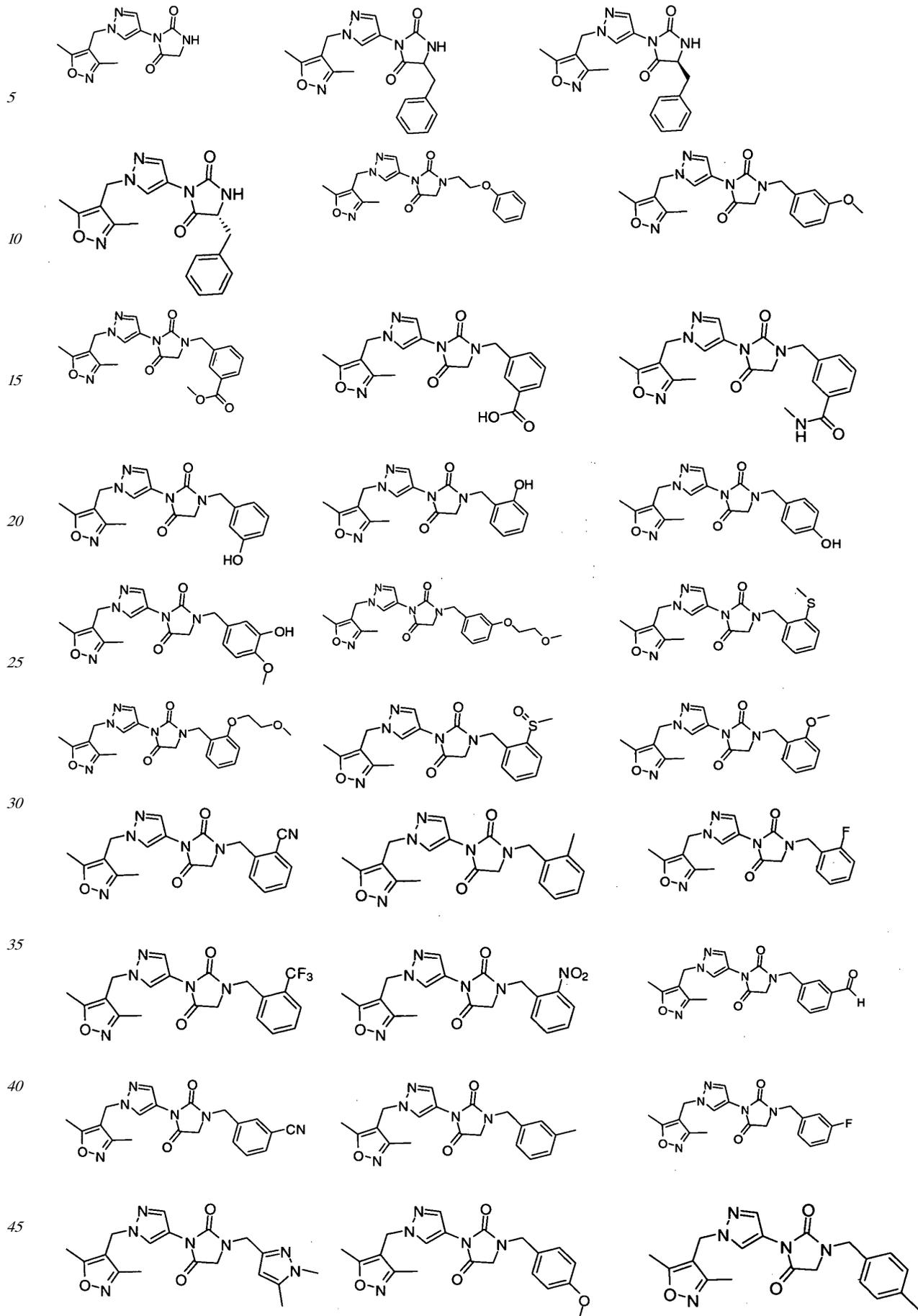
M² представляет собой N или CR₅₀, где R₅₀ представляет собой H или замещенный или незамещенный алкил;

R₃₈ представляет собой H, замещенный или незамещенный алкил, замещенный или незамещенный циклоалкилалкил, замещенный или незамещенный гетероциклоалкилалкил, замещенный или незамещенный арил, замещенный или незамещенный ариламидаалкил, замещенный или незамещенный гетероариламидаалкил, замещенный или незамещенный арилалкил, замещенный или незамещенный арилалкокси, замещенный или незамещенный гетероарил, замещенный или незамещенный гетероарилалкил или галогеналкил;

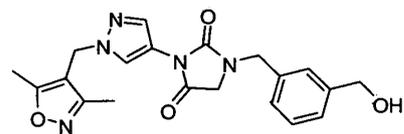
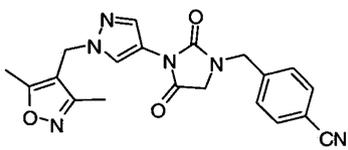
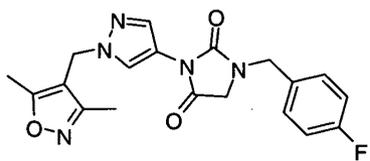
R₄₇ представляет собой H, замещенный или незамещенный алкил, замещенный или незамещенный алкокси, замещенный или незамещенный арил, замещенный или незамещенный арилалкил или галоген; и

R₄₈ представляет собой H, замещенный или незамещенный алкил, замещенный или незамещенный алкокси, замещенный или незамещенный арил, замещенный или незамещенный арилалкил или галоген.

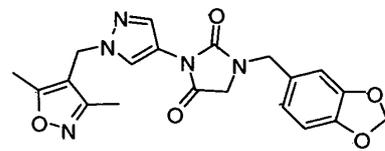
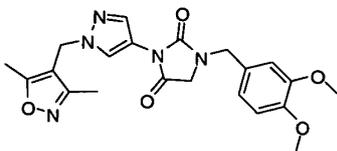
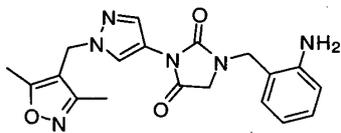
Согласно еще одному аспекту, изобретение относится к соединению формулы:



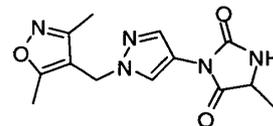
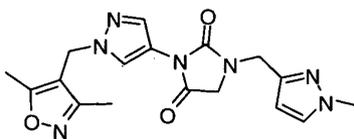
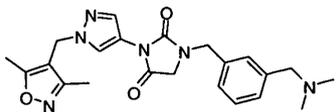
5



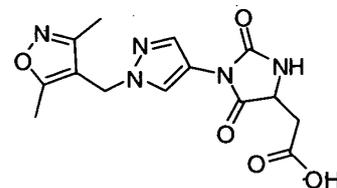
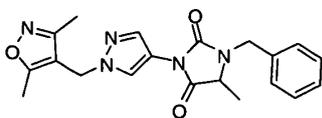
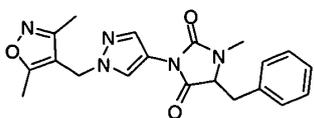
10



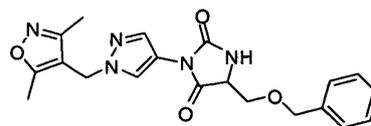
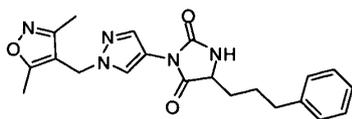
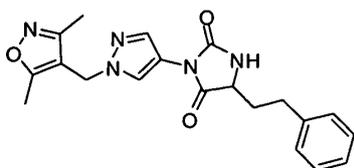
15



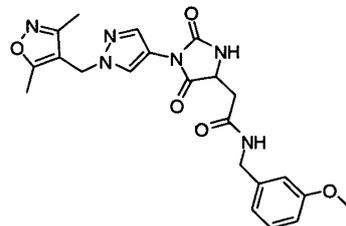
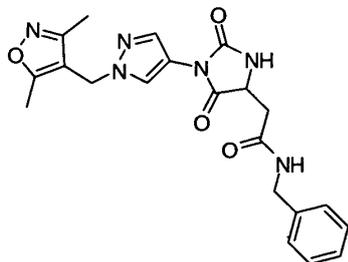
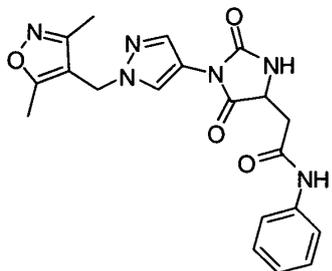
20



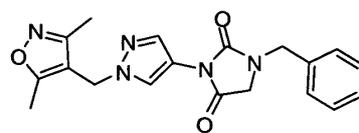
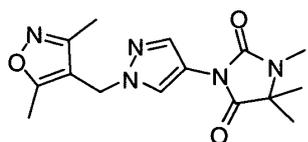
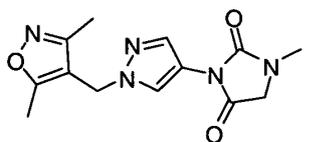
25



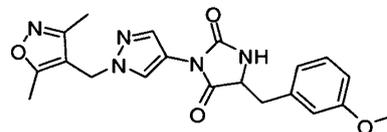
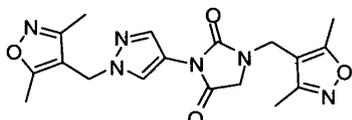
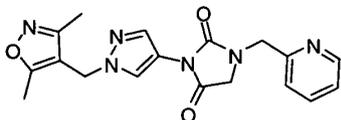
30



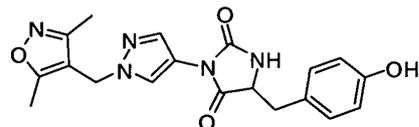
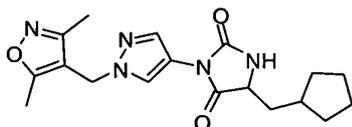
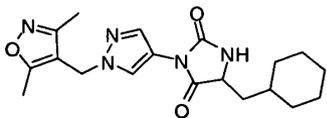
35

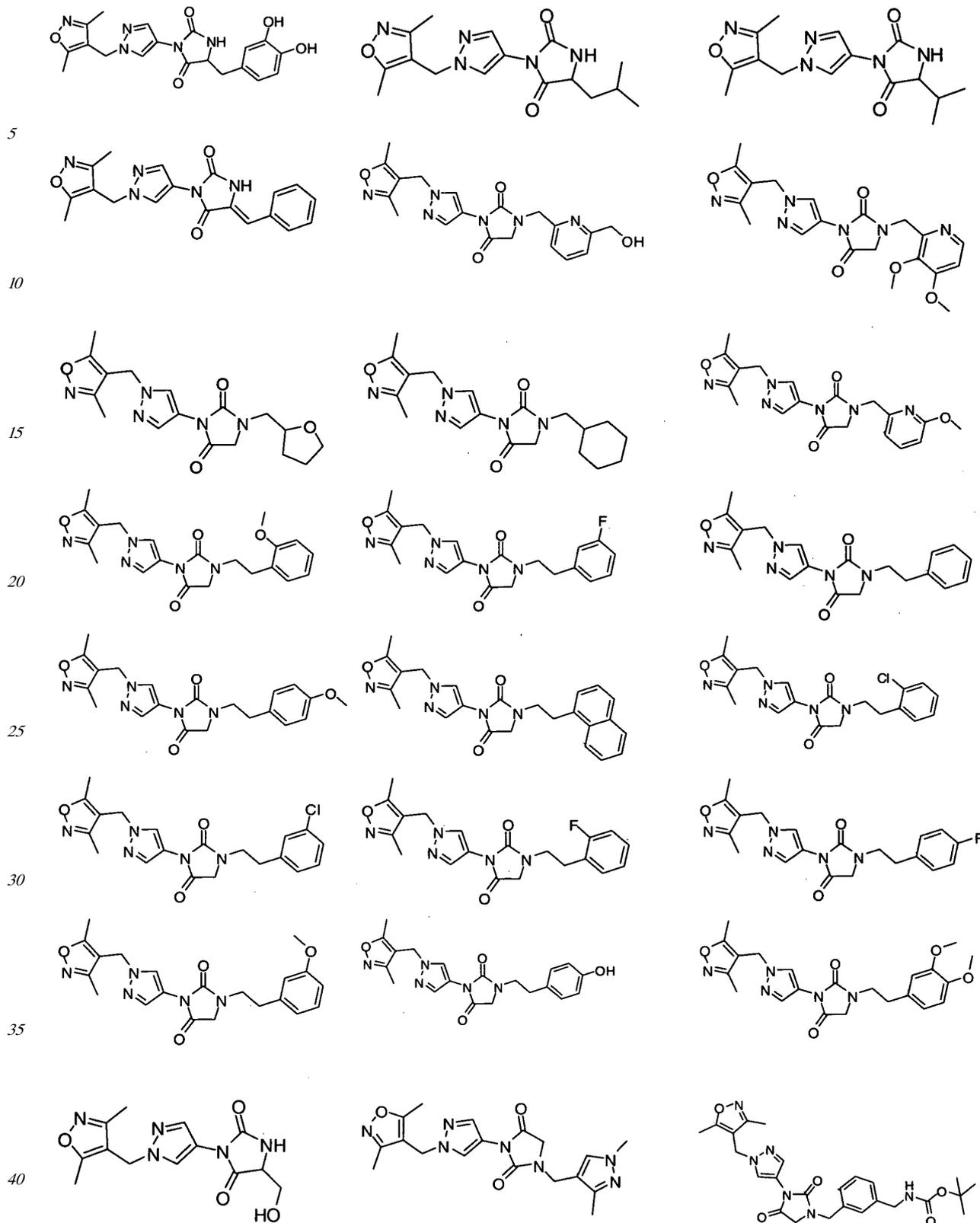


40

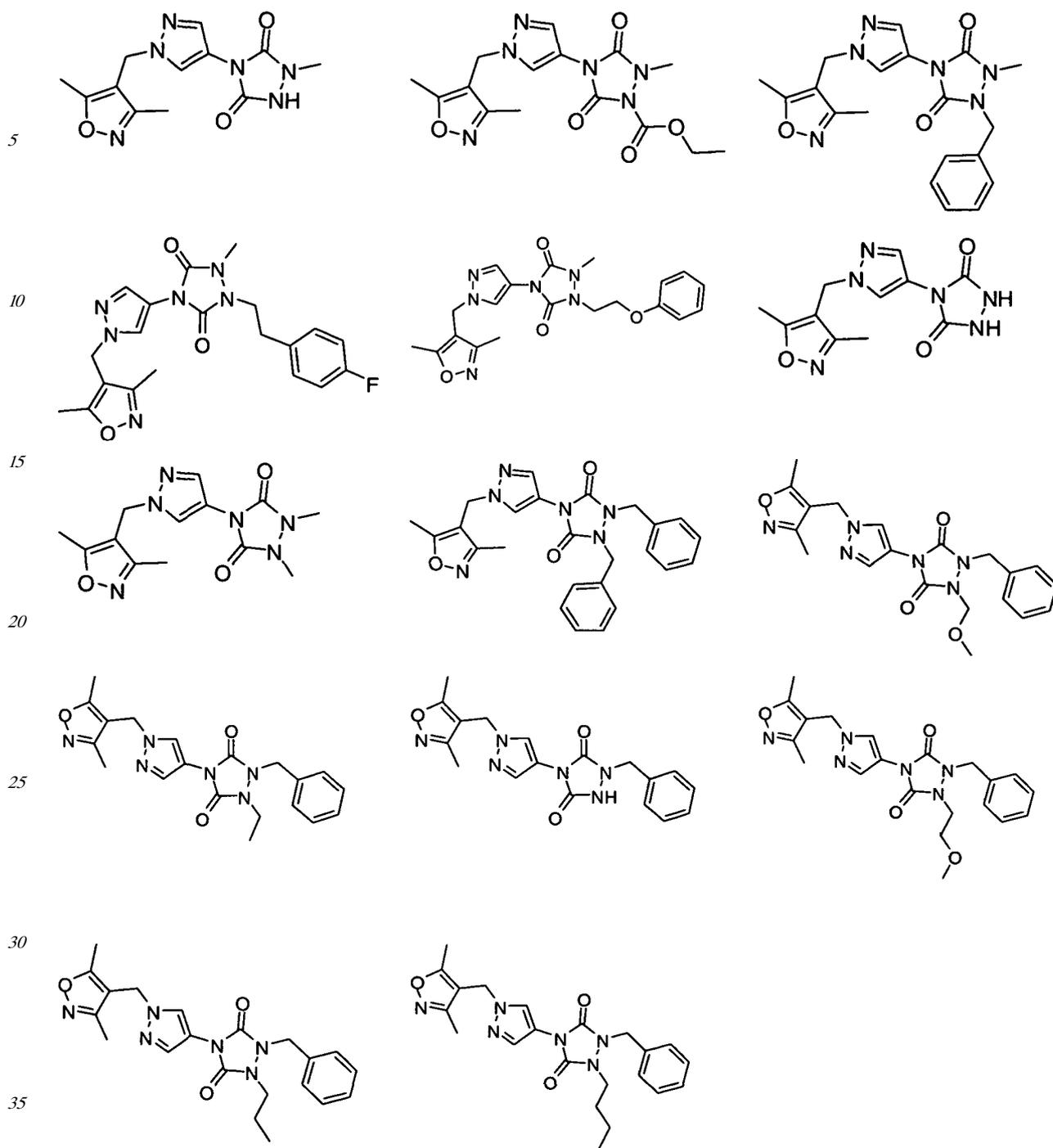


45



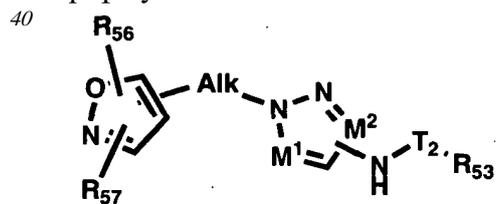


или соли, гидрату, сольвату, N-оксиду или пролекарству указанного соединения.
Согласно еще одному аспекту, изобретение относится к соединению формулы:



или соли, гидрату, сольвату, N-оксиду или пролекарству указанного соединения.

Согласно еще одному аспекту, изобретение относится к способу получения соединения формулы:



или соли, гидрата, сольвата, N-оксида или пролекарства указанного соединения, где Alk представляет собой алкильную группу, необязательно содержащую гетероатом;

T_2 представляет собой C=S, C=O или S(O)₂;

R_{53} представляет собой замещенный или незамещенный алкил, замещенный или незамещенный циклоалкил, замещенный или незамещенный гетероарил, замещенный или незамещенный арил или замещенный или незамещенный арилалкил;

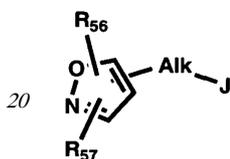
M^1 представляет собой N или CR₅₄, где R_{54} представляет собой H или замещенный или незамещенный алкил;

M^2 представляет собой N или CR₅₅, где R_{55} представляет собой H или замещенный или незамещенный алкил;

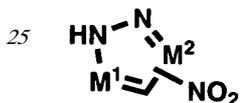
R_{56} представляет собой H, замещенный или незамещенный алкил, замещенный или незамещенный алкокси, замещенный или незамещенный арил, замещенный или незамещенный арилалкил или галоген; и

R_{57} представляет собой H, замещенный или незамещенный алкил, замещенный или незамещенный алкокси, замещенный или незамещенный арил, замещенный или незамещенный арилалкил или галоген;

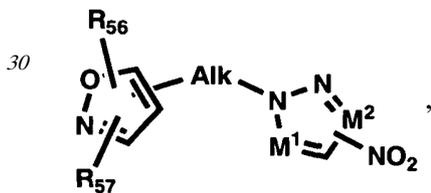
при этом указанный способ включает взаимодействие соединения формулы:



где R_{56} , R_{57} и Alk определены выше, и J представляет собой уходящую группу; с соединением формулы:

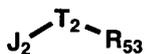


где M^1 и M^2 определены выше, с получением соединения формулы



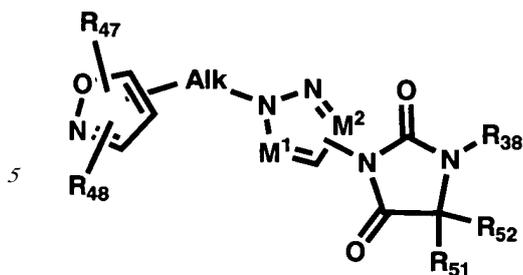
содержащего NO₂ группу;

восстановление NO₂ группы с получением соединения, содержащего NH₂ группу; и взаимодействие соединения, содержащего NH₂ группу, с соединением формулы



где J_2 представляет собой уходящую группу, и T_2 и R_{53} определены выше.

Согласно еще одному аспекту, изобретение относится к способу получения соединения формулы:



10 или соли, гидрата, сольвата, N-оксида или пролекарства указанного соединения, где Alk представляет собой алкильную группу, необязательно содержащую гетероатом;

15 R₅₁ и R₅₂, которые могут быть одинаковыми или различными независимо друг от друга, представляют собой H, замещенный или незамещенный алкил, замещенный или незамещенный циклоалкилалкил, замещенный или незамещенный гетероциклоалкилалкил, замещенный или незамещенный арил, замещенный или незамещенный ариламиноалкил, замещенный или незамещенный арилалкиламиноалкил, замещенный или незамещенный гетероариламиноалкил, замещенный или незамещенный гетероарилалкиламиноалкил, замещенный или незамещенный арилалкил, замещенный или незамещенный арилалкокси, замещенный или незамещенный гетероарил, замещенный или незамещенный гетероарилалкил, галогеналкил, или R₅₁ и R₅₂ совместно с атомом углерода, к которому они присоединены, образуют замещенную или незамещенную алкенильную группу;

25 M¹ представляет собой N или CR₄₉, где R₄₉ представляет собой H или замещенный или незамещенный алкил;

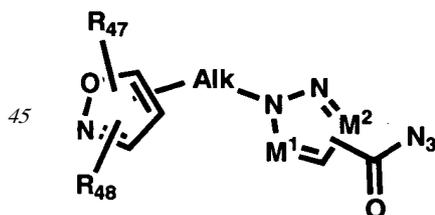
M² представляет собой N или CR₅₀, где R₅₀ представляет собой H или замещенный или незамещенный алкил;

30 R₃₈ представляет собой H, замещенный или незамещенный алкил, замещенный или незамещенный циклоалкилалкил, замещенный или незамещенный гетероциклоалкилалкил, замещенный или незамещенный арил, замещенный или незамещенный ариламиноалкил, замещенный или незамещенный гетероариламиноалкил, замещенный или незамещенный арилалкил, замещенный или незамещенный арилалкокси, замещенный или незамещенный гетероарил, замещенный или незамещенный гетероарилалкил или галогеналкил;

35 R₄₇ представляет собой H, замещенный или незамещенный алкил, замещенный или незамещенный алкокси, замещенный или незамещенный арил, замещенный или незамещенный арилалкил или галоген; и

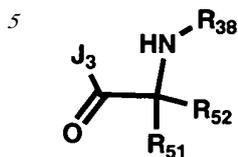
40 R₄₈ представляет собой H, замещенный или незамещенный алкил, замещенный или незамещенный алкокси, замещенный или незамещенный арил, замещенный или незамещенный арилалкил или галоген;

при этом указанный способ включает нагревание соединения формулы:



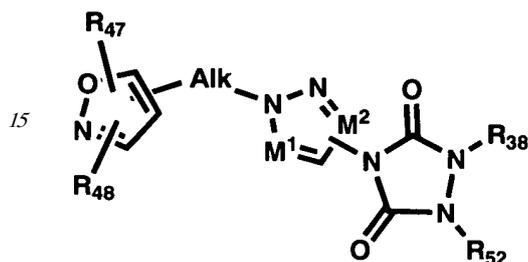
где R_{47} , R_{48} , Alk, M^1 и M^2 определены выше;

для превращения $-\text{CON}_3$ группы в $-\text{N}=\text{C}=\text{O}$ группу, и последующее взаимодействие с соединением формулы:



где J_3 представляет собой уходящую группу, и R_{38} , R_{51} и R_{52} определены выше.

10 Согласно еще одному аспекту, изобретение относится к способу получения соединения формулы:



20 или соли, гидрата, сольвата, N-оксида или пролекарства указанного соединения, где Alk представляет собой алкильную группу, необязательно содержащую гетероатом;

R_{52} представляет собой H, замещенный или незамещенный алкил, замещенный или незамещенный циклоалкилалкил, замещенный или незамещенный гетероциклоалкилалкил, замещенный или незамещенный арил, замещенный или незамещенный ариламиноалкил, замещенный или незамещенный арилалкиламиноалкил, замещенный или незамещенный гетероариламиноалкил, замещенный или незамещенный гетероарилалкиламиноалкил, замещенный или незамещенный арилалкил, замещенный или незамещенный арилалкокси, замещенный или незамещенный гетероарил, замещенный или незамещенный гетероарилалкил, галогеналкил;

M^1 представляет собой N или CR_{49} , где R_{49} представляет собой H или замещенный или незамещенный алкил;

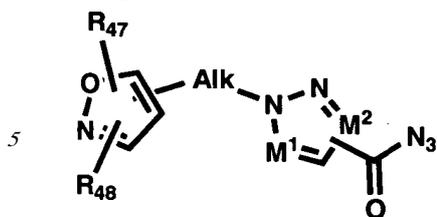
35 M^2 представляет собой N или CR_{50} , где R_{50} представляет собой H или замещенный или незамещенный алкил;

R_{38} представляет собой H, замещенный или незамещенный алкил, замещенный или незамещенный циклоалкилалкил, замещенный или незамещенный гетероциклоалкилалкил, замещенный или незамещенный арил, замещенный или незамещенный ариламиноалкил, замещенный или незамещенный гетероариламиноалкил, замещенный или незамещенный арилалкил, замещенный или незамещенный арилалкокси, замещенный или незамещенный гетероарил, замещенный или незамещенный гетероарилалкил или галогеналкил;

45 R_{47} представляет собой H, замещенный или незамещенный алкил, замещенный или незамещенный алкокси, замещенный или незамещенный арил, замещенный или незамещенный арилалкил или галоген; и

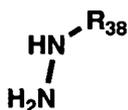
R_{48} представляет собой H, замещенный или незамещенный алкил, замещенный или незамещенный алкокси, замещенный или незамещенный арил, замещенный или незамещенный арилалкил или галоген;

при этом указанный способ включает нагревание соединения формулы:



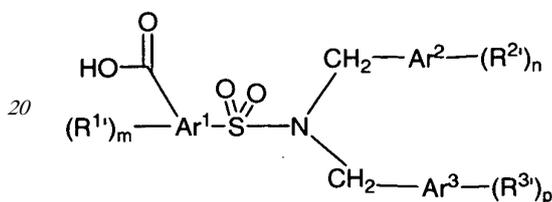
где R_{47} , R_{48} , Alk, M^1 и M^2 определены выше;

10 для превращения $-CON_3$ группы в $-N=C=O$ группу и последующее взаимодействие с гидразином формулы:



где R_{38} определен выше.

Согласно еще одному аспекту, изобретение относится к способу получения соединения формулы:



(III)

25 или соли, гидрата, сольвата или N-оксида указанного соединения, где

Ar^1 , Ar^2 и Ar^3 независимо представляют собой пяти- или шестичленное арильное, гетероарильное или циклоалкильное кольцо, при этом Ar^2 и Ar^3 могут отсутствовать; m равен 0, 1, 2 или 3;

n и p независимо равны 0, 1, 2, 3 или 4;

30 каждый R^1 независимо выбран из группы, включающей водород, галоген, алкил, замещенный алкил, арил, замещенный арил, арилалкил, замещенный арилалкил, ацил, замещенный ацил, гетероалкил, замещенный гетероалкил, гетероарил, замещенный гетероарил, гетероарилалкил, замещенный гетероарилалкил, CN, NO_2 , OR^6 , $S(O)_bR^6$, NR^6R^7 , $CONR^6R^7$, CO_2R^6 , $NR^6CO_2R^7$, $NR^6CONR^7R^8$, $NR^6CSNR^7R^8$, $NR^6C(=NH)NR^7R^8$, $SO_2NR^5R^6$, $NR^5SO_2R^6$, $NR^5SO_2NR^6R^7$, $B(OR^5)(OR^6)$, $P(O)(OR^5)(OR^6)$ и $P(O)(R^5)(OR^6)$;

35 каждый $R^{2'}$ независимо выбран из группы, включающей водород, галоген, алкил, замещенный алкил, арил, замещенный арил, арилалкил, замещенный арилалкил, ацил, замещенный ацил, гетероалкил, замещенный гетероалкил, гетероарил, замещенный гетероарил, гетероарилалкил, замещенный гетероарилалкил, CN, NO_2 , OR^6 , $S(O)_bR^6$, NR^6R^7 , $CONR^6R^7$, CO_2R^6 , $NR^6CO_2R^7$, $NR^6CONR^7R^8$, $NR^6CSNR^7R^8$, $NR^6C(=NH)NR^7R^8$, $SO_2NR^5R^6$, $NR^5SO_2R^6$, $NR^5SO_2NR^6R^7$, $B(OR^5)(OR^6)$, $P(O)(OR^5)(OR^6)$ и $P(O)(R^5)(OR^6)$;

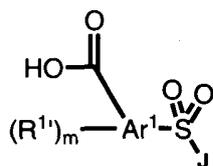
45 каждый $R^{3'}$ независимо выбран из группы, включающей водород, галоген, алкил, замещенный алкил, арил, замещенный арил, арилалкил, замещенный арилалкил, ацил, замещенный ацил, гетероалкил, замещенный гетероалкил, гетероарил, замещенный

гетероарил, гетероарилалкил, замещенный гетероарилалкил, 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) и P(O)(R⁵)(OR⁶);

R⁵-R⁸ независимо представляют собой водород, алкил, замещенный алкил, арил, замещенный арил, арилалкил, замещенный арилалкил, гетероалкил, замещенный гетероалкил, гетероарил, замещенный гетероарил, гетероарилалкил или замещенный гетероарилалкил или, альтернативным образом, R⁶ и R⁷, R⁷ и R⁸ совместно с атомами, с которыми они связаны, образуют циклогетероалкильное или замещенное циклогетероалкильное кольцо;

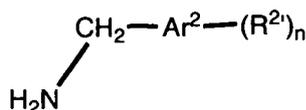
b равен 0, 1 или 2;

при этом указанный способ включает взаимодействие соединения формулы:



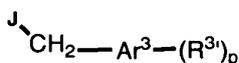
где J представляет собой уходящую группу;

с соединением формулы:



с получением продукта; и

взаимодействие указанного продукта с соединением формулы:



где J представляет собой уходящую группу.

ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТИ ГЕНОВ И ПОЛИПЕПТИДОВ ХИМЕРНОГО G-БЕЛКА

И HT2R

Последовательность белка родопсиновой метки: (SEQ ID NO:1)

MNGTEGPNFYVPFSNKGTGVVRSPFEAPQYYLAEPW

Последовательность белка G16gust44: (SEQ ID NO:2)

MARSLTWRCSPWCLTEDEKAAARVDQEINRILLEQKKQDRGELKLLLLGPGESGKS

TFIKQMRIIHGAGYSEEERKGFRLVYQNIQVSMRAMIEAMERLQIPFSRPESKHHSALV

MSQDPYKVTTFEKRYAAAMQWLWRDAGIRACYERRREFHLLDSAVYYLSHLERITEE

GYVPTAQDVLRSRMPPTTGINEYCFSVQKTNLRIVDVGQKSERKKWIHCFENVIALIYL

ASLSEYDQCLEENNQENRMKESLALFGTILELPWFKSTSVILFLNKTDILEEKIPTSHLAT

YFPSFQGPQDAEAAKRFILDMYTRMYTGCVDGPEGSNLKKEDKEIYSHMTCATDTQN

VKFFVDAVTDIIKENLKDGLF

Последовательности hT2R8:

ДНК-(SEQ ID NO:3) ATGTTTCAGTCCTGCAGATAACATCTTTATAATCCTAATAACT
GGAGAATTCATACTAGGAATATTGGGGAATGGATACAT

TGCACTAGTCAACTGGATTGACTGGATTAAGAAGAAAAAGATTTCCACAGTTGA

CTACATCCTTACCAATTTAGTTATCG

CCAGAATTTGTTTGATCAGTGTAATGGTTGTAAATGGCATTGTAATAGTACTGAA

CCCAGATGTTTATACAAAAAATAAA

CAACAGATAGTCATTTTACCTTCTGGACATTTGCCAACTACTTAAATATGTGGAT

TACCACCTGCCTTAATGTCTTCTA
 TTTTCTGAAGATAGCCAGTTCCTCTCATCCACTTTTTCTCTGGCTGAAGTGGAAAA
 TTGATATGGTGGTGCCTGGATCC
 TGCTGGGATGCTTTGCCATTTCTTGTGGTTCAGCCTTATAGCAGCAATAGTACTG
 5 AGTTGTGATTATAGGTTTCATGCA
 ATTGCCAAACATAAAAGAAACATTACTGAAATGTTCCATGTGAGTAAAATACCA
 TACTTTGAACCCTTaACTCTCTTTAA
 CCTGTTTGCAATTGTCCCATTTATTGTGTCCTGATATCATTTTTCCTTTTAGTAAG
 ATCTTTATGGAGACATACCAAGC
 10 AAATAAAACTCTATGCTACCGGCAGTAGAGACCCCAGCACAGAAGTTCATGTGA
 GAGCCATTAAAACTATGACTTCATTT
 ATCTTCTTTTTTTCTCTATACTATAATTTCTTCTATTTTGATGACCTTTAGCTATCTTA
 TGACAAAATACAAGTTAGCTGT
 GGAGTTTGGAGAGATTGCAGCAATTCTCTACCCCTTGGGTCACTCACTTATTTTAA
 15 TTGTTTTAAATAATAAACTGAGGC
 AGACATTTGTCAGAATGCTGACATGTAGAAAAATTGCCTGCATGATATGA
 Блок-(SEQ ID NO:4)
 MFSPADNIFILITGEFILGILNGYIALVNWIDWIKKKKISTVDYILTNLVIARICLISVM
 VVNGIVIVLNPVYTKNK
 20 QQIVIFTFWTFANYLNMWITTCLNVFYFLKIASSSHPLFLWLKWKIDMVVHWILLGC
 FAISLLVSLIAAIVLSCDYRFHA
 IAKHKRNITEMFHVSKIPYFEPLTLFNLFAIVPFIVSLISFFLLVRSLWRHTKQIKLYATG
 SRDPSTEVHVRAIKTMTSF
 IFFFLY YISSILMTFSYLMTKYKLAVEFGEIAAILYPLGHSLILIVLNNKLRQTFVRML
 25 TCRKIACMI
 Последовательности hT2R14:
 ДНК-(SEQ ID NO:5) ATGGGTGGTGTGCATAAAGAGCATATTTACATTCGTTTTAATT
 GTGGAATTTATAATTGGAAATTTAGGAAATAGTTTCAT
 AGCACTGGTGAAGTGTATTGACTGGGTCAAGGGAAGAAAGATCTCTTCGGTTGAT
 30 CGGATCCTCACTGCTTTGGCAATCT
 CTCGAATTAGCCTGGTTTGGTTAATATTCGGAAGCTGGTGTGTGTCTGTGTTTTTC
 CCAGCTTTATTTGCCACTGAAAAA
 ATGTTTCAGAATGCTTACTAATATCTGGACAGTGATCAATCATTTTAGTGTCTGGTT
 AGCTACAGGCCTCGGTACTTTTTA
 35 TTTTCTCAAGATAGCCAATTTTCTAACTCTATTTTCTCTACCTAAAGTGGAGaGT
 TAAAAAGGTGGTTTTGGTGCTGC
 TTCTTGTGACTTCGGTCTTCTTGTTTTTAAATATTGCACTGATAAACATCCATATA
 AATGCCAGTATCAATGGATACAGA
 AGAAACAAGACTTGCAGTTCTGATTCAAGTAACTTTACACGATTTTCCAGTCTTA
 40 TTGTATTAACCAGCACTGTGTTTCAT
 TTTCATACCCTTTACTTTGTCCCTGGCAATGTTTCTTCTCCTCATCTTCTCCATGTG
 GAAACATCGCAAGAAGATGCAGC
 AACTGTCAAATATCCGGAGACGCCAGCACCAAGCCCACAGAGGAGTTAAAA
 GTGTGATCACTTTCTTCCACTCTAT
 45 GCCATTTTCTCTCTGTCTTTTTTTCATATCAGTTTGGACCTCTGAAAGGTTGGAGGA
 AAATCTAATTATCTTTCCAGGT
 GATGGGAATGGCTTATCCTTCATGTCACTCATGTGTTCTGATTCTTGGAAACAAG
 AAGCTGAGACAGGCCTCTCTGTCAG

TGCTACTGTGGCTGAGGTACATGTTCAAAGATGGGGAGCCCTCAGGTCACAAAG
AATTTAGAGAATCATCTTGA

Белок-(SEQ ID NO:6)

MGGVIKSIFTFVLIVEFIIGNLGNFIALVNCIDWVKGRKISSVDRILTALAIRISLVWL
5 IFGSWCVSVFFPALFATEK

MFRMLTNIWTVINHFSVWLATGLGTFYFLKIANFSNSIFLYLKWRVKKVVLVLLVT
SVFLFLNIALINIHINASINGYR

RNKTCSSDSSNFTRFSSLIVLTSTVFIFIPFTLSLAMFLLLIFSMWKHRKKMQHTVKISG
DASTKAHRGVKSVITFFLLY

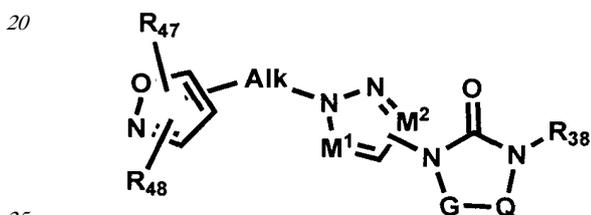
10 AIFSLSFFISVWTSERLEENLIILSQVMGMAYPSCHSCVLILGNKKLRQASLSVLLWLR
YMFKDGEPGSHKEFRESS

Несмотря на то, что в приведенном выше подробном описании раскрыты несколько вариантов осуществления настоящего изобретения, следует понимать, что данное описание является лишь иллюстративным и не ограничивает раскрытого изобретения.

15 Настоящее изобретение ограничено лишь формулой, приведенной ниже.

Формула изобретения

1. Соединение структурной Формулы (I), указанной ниже:
соединение формулы:



или его фармацевтически приемлемая соль,

где Alk представляет собой C₁-C₆алкильную группу;

G представляет собой C=O и Q представляет собой CR₅₁R₅₂ или NR₅₁, где R₅₁ и R₅₂

30 , будучи одинаковыми или разными, независимо один от другого, представляют собой H, C₁-C₆алкил, необязательно замещенный заместителем, выбранным из группы, включающей карбокси, фенокси, бензилокси, C₁-C₆алкокси и гидрокси; C₃-C₆ циклоалкилC₁-C₆алкил; фенилC₁-C₆алкил, необязательно замещенный галогеном; фениламидоC₁-C₆алкил; фенилC₁-C₆алкиламидоC₁-C₆алкил, необязательно замещенный
35 C₁-C₆алкоксигруппой;

или R₅₁ и R₅₂, совместно с углеродным атомом, к которому они присоединены, образуют группу C=O или C₂-C₆алкенильную группу, необязательно замещенную фенилом;

40 M¹ представляет собой CR₄₉, где R₄₉ представляет собой H;

M² представляет собой CR₅₀, где R₅₀ представляет собой H;

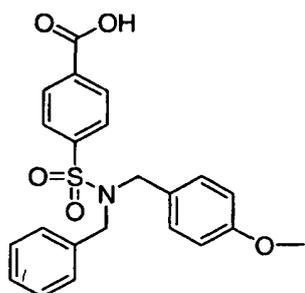
R₃₈ представляет собой H, C₁-C₆алкил, замещенный феноксигруппой; C₃-C₆ циклоалкилC₁-C₆алкил; арилC₁-C₆алкил, необязательно замещенный 1 или 2
45 заместителями, выбранными из группы, включающей C₁-C₆алкил, C₁-C₆алкокси, C₁-C₆алкоксикарбонил, карбоксил, N-метиламидо, гидрокси, C₁-C₆алкоксиC₁-C₆алкокси, C₁-C₆алкилтио, C₁-C₆алкилсульфинил, циано, галоген, перфторC₁-C₆алкил, нитро,

формил, гидроксиС₁-С₆алкил и amino, причем арильный фрагмент представляет собой фенил или нафтил; и гетероарилС₁-С₆алкил, где гетероарильный фрагмент представляет собой пиридинил, необязательно замещенный 1 или 2 группами, выбранными из С₁-С₆ алкокси или гидроксиС₁-С₆алкила, пиразолил или изоксазолил, замещенные 1 или 2 С₁-С₆алкильными группами;

R₄₇ представляет собой С₁-С₆алкил; и

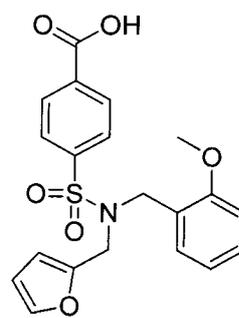
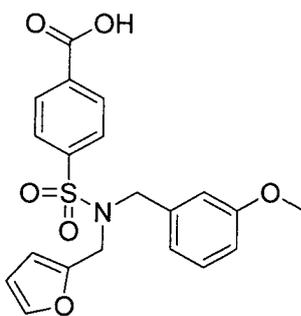
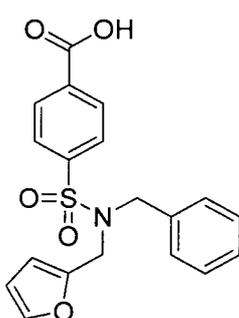
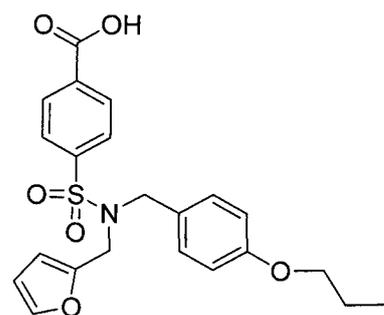
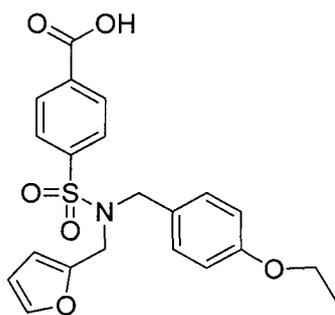
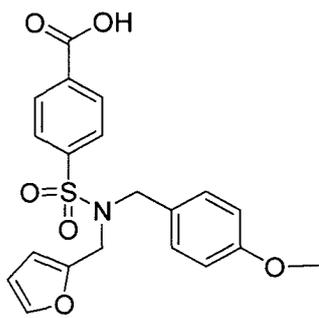
R₄₈ представляет собой С₁-С₆алкил.

2. Соединение, имеющее формулу:



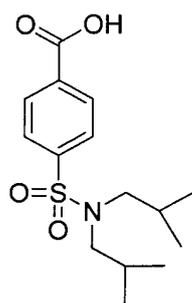
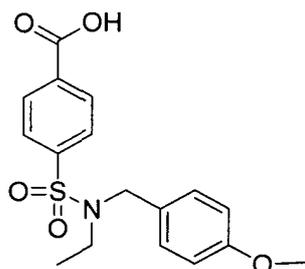
или его фармацевтически приемлемая соль.

3. Соединение, имеющее формулу:



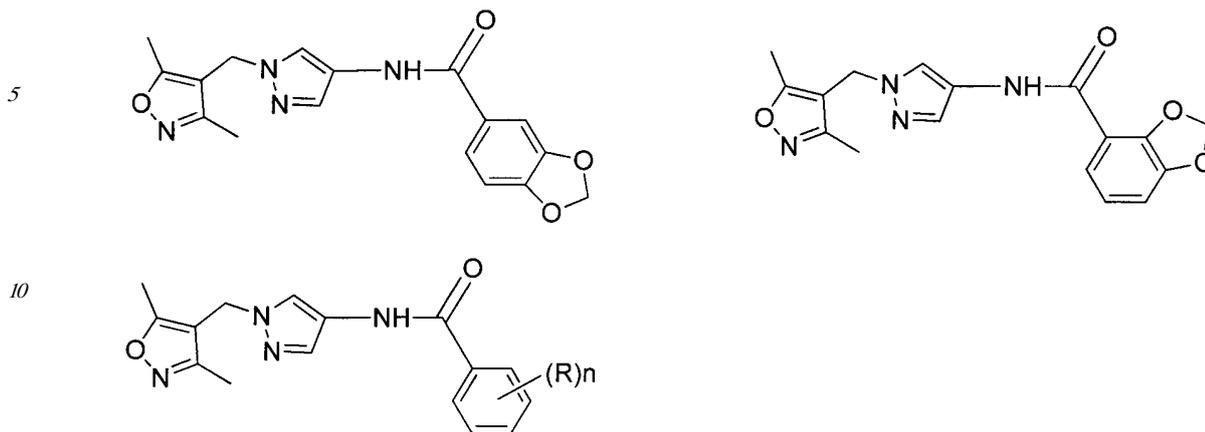
или его фармацевтически приемлемая соль

4. Соединение, имеющее формулу:



или его фармацевтически приемлемая соль.

5. Соединение, имеющее формулу:



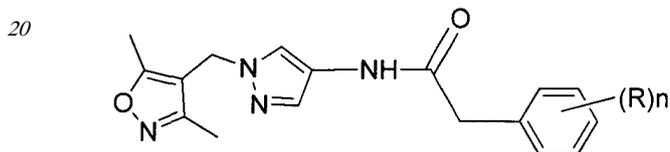
или его фармацевтически приемлемая соль,

где каждый R независимо представляет собой Cl, MeO, CN, EtO, OH, Me, -SO₂Me, F,

H, и

n равно 0, 1, 2, 3 или 4.

6. Соединение, имеющее формулу:

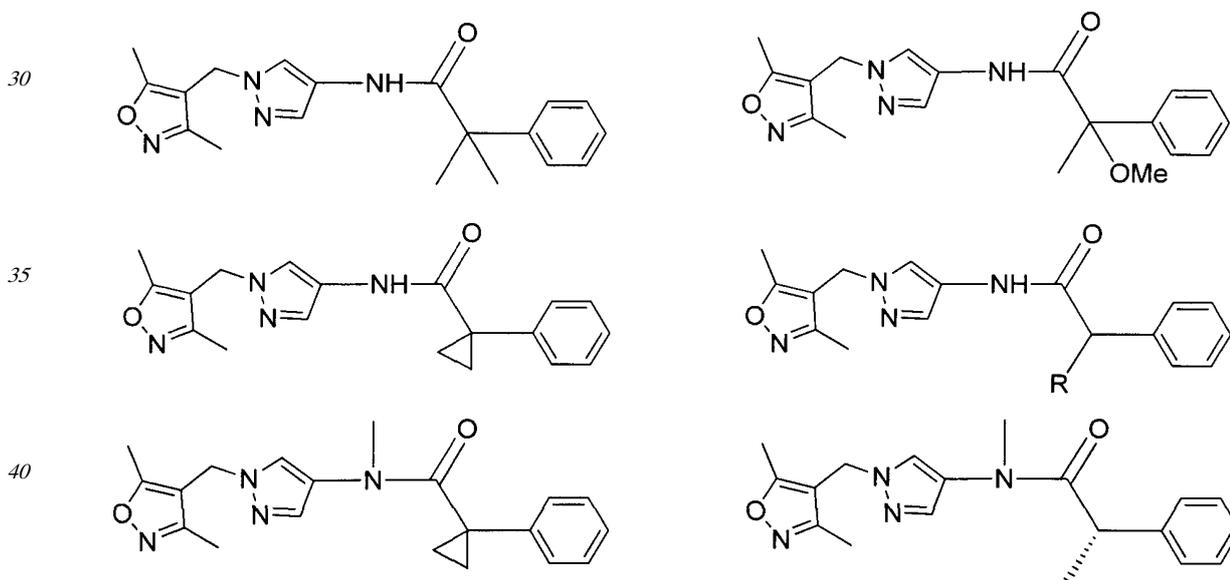


или его фармацевтически приемлемая соль,

где каждый R независимо представляет собой MeO, OH, и

n равно 0, 1, 2, 3 или 4.

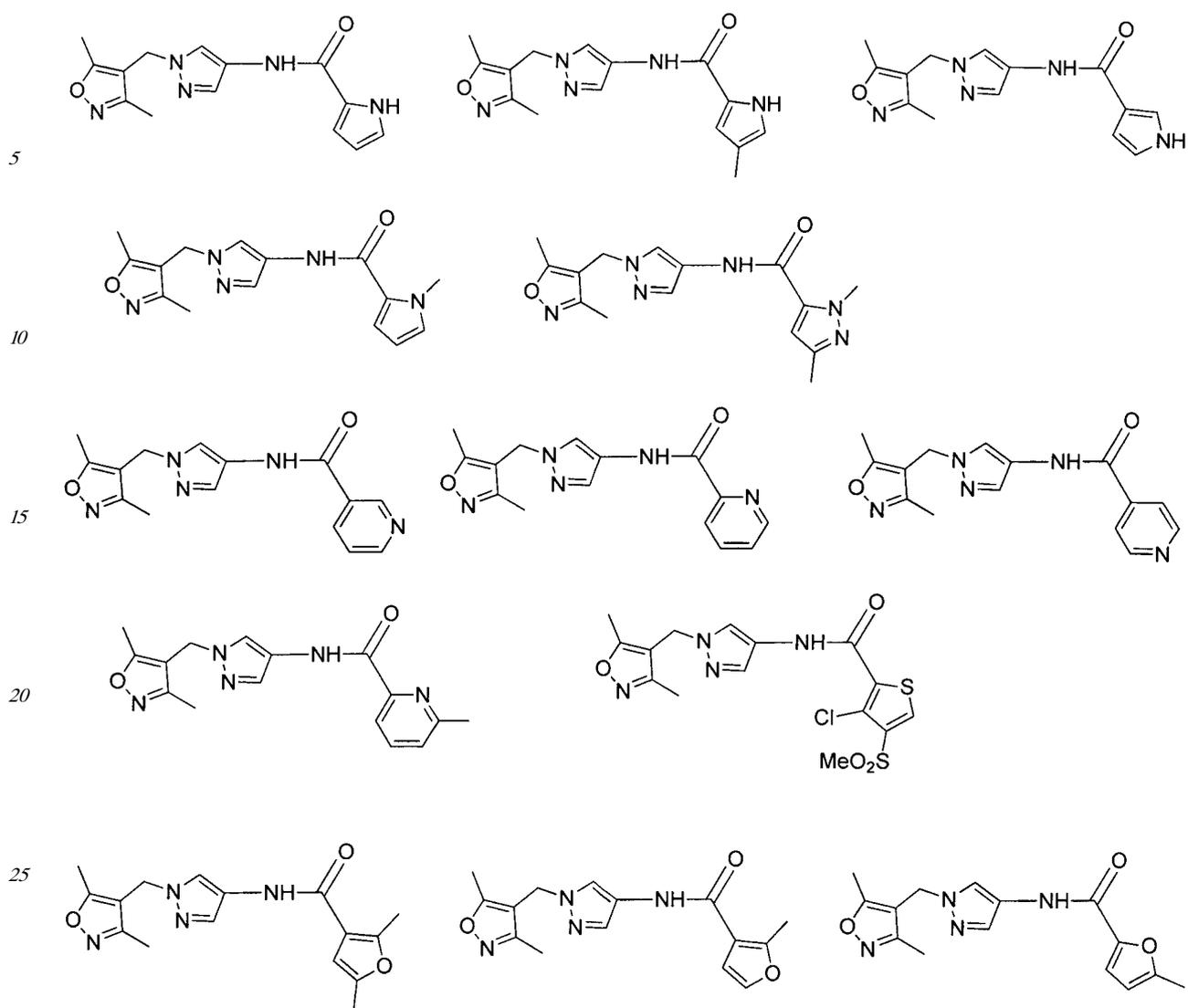
7. Соединение, имеющее формулу:



или его фармацевтически приемлемая соль,

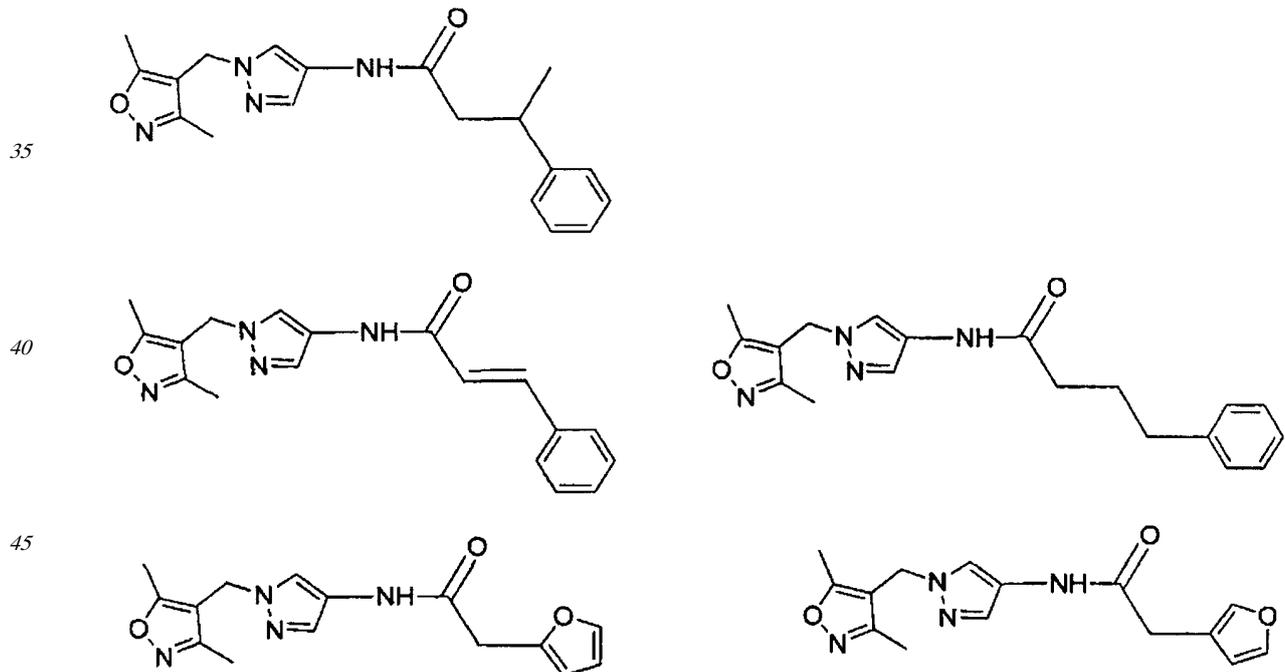
где R выбран из группы, состоящей из H, Me, Et, OCOMe, CH₂OH, OMe и Ph.

8. Соединение, имеющее формулу:



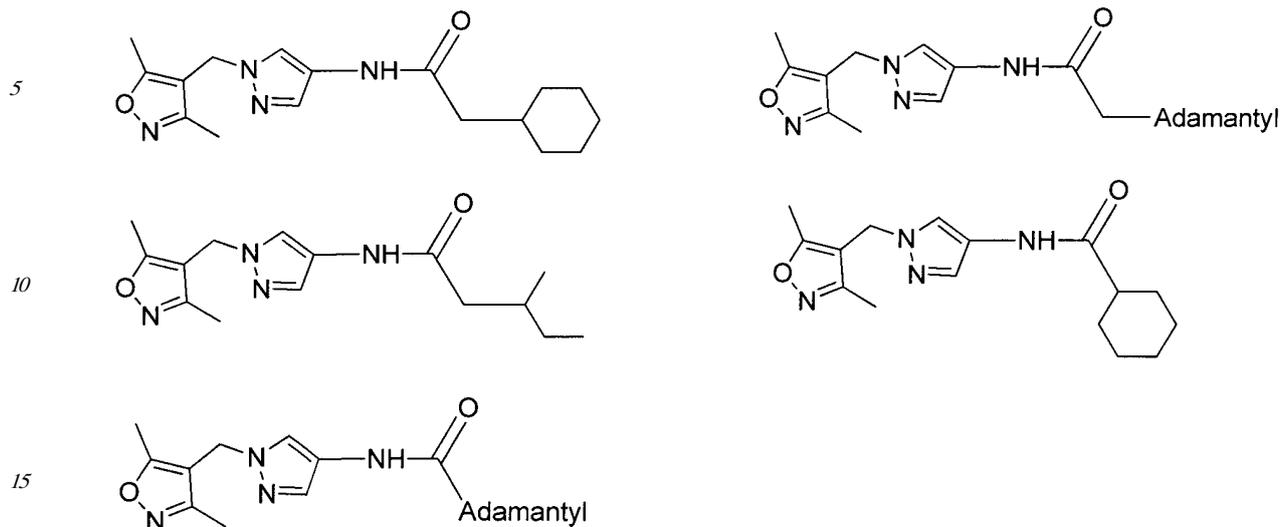
30 или его фармацевтически приемлемая соль.

9. Соединение, имеющее формулу:



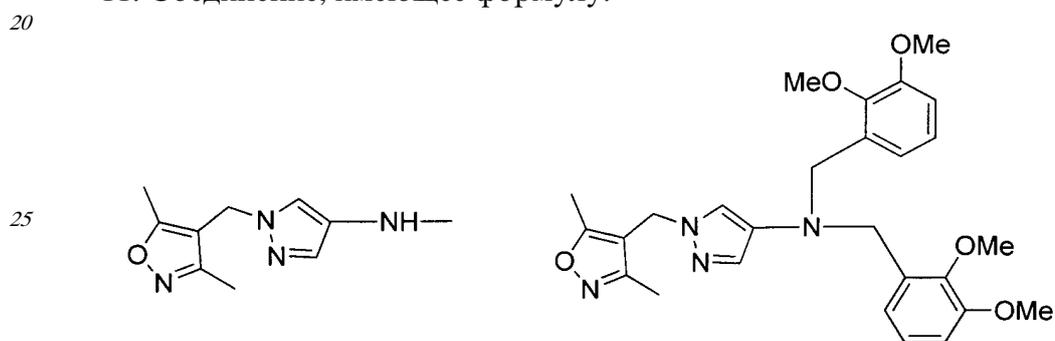
или его фармацевтически приемлемая соль.

10. Соединение, имеющее формулу:



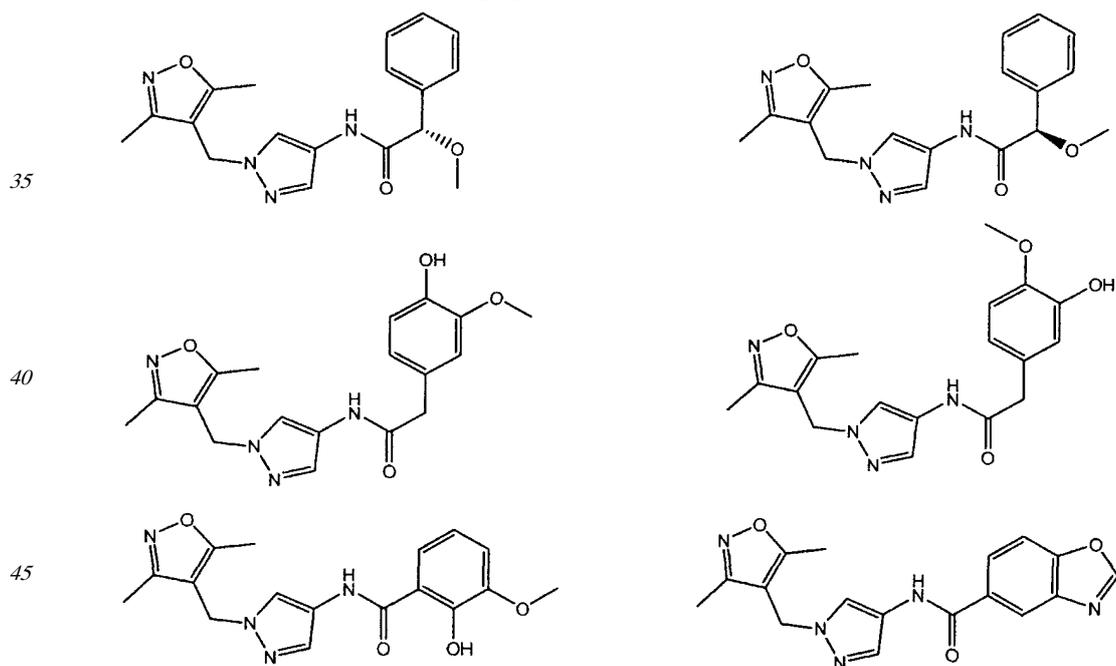
или его фармацевтически приемлемая соль,
где Adamantyl означает адамантил.

11. Соединение, имеющее формулу:

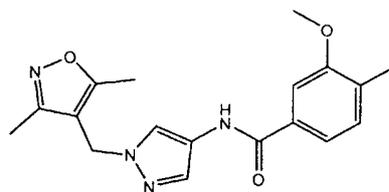
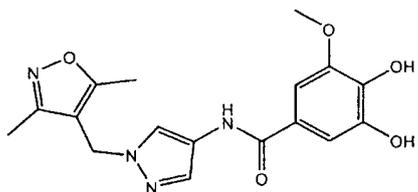


или его фармацевтически приемлемая соль.

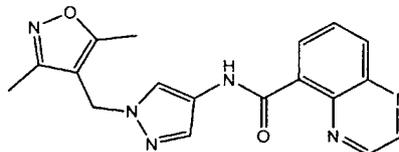
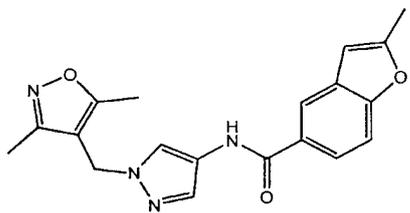
12. Соединение, имеющее формулу:



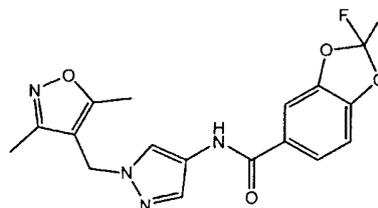
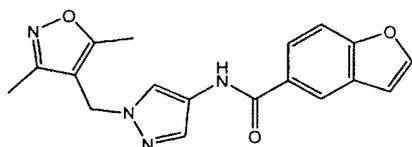
5



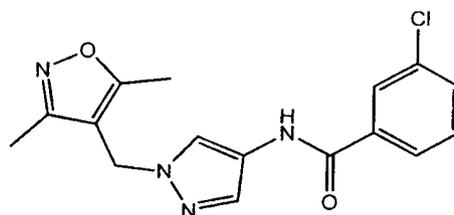
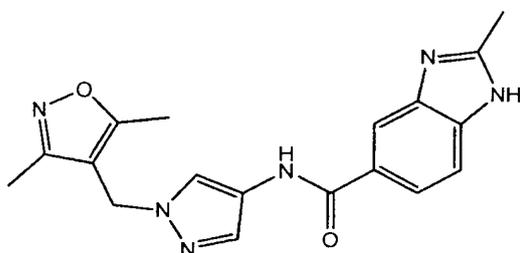
10



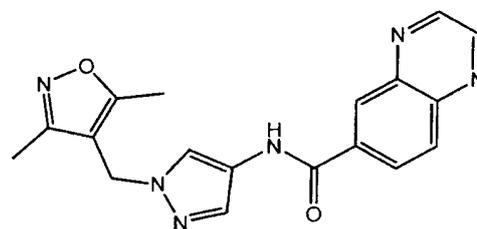
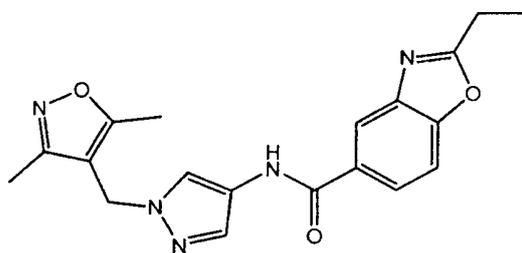
15



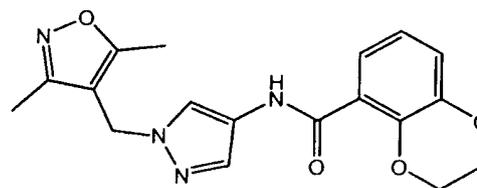
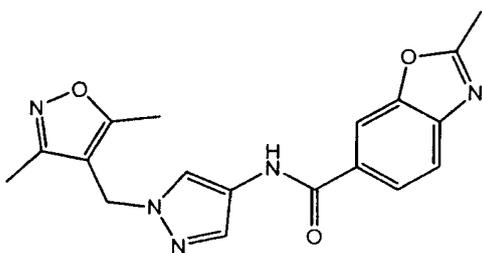
20



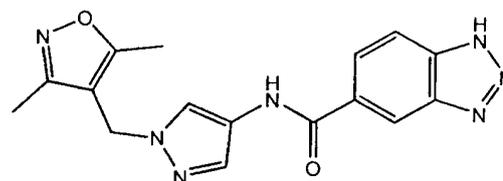
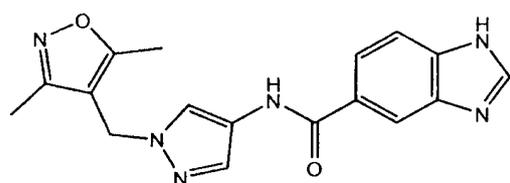
25



30

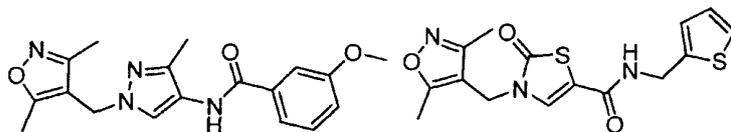
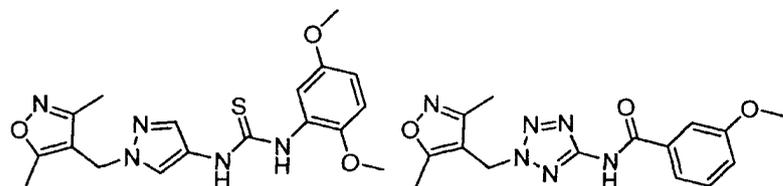
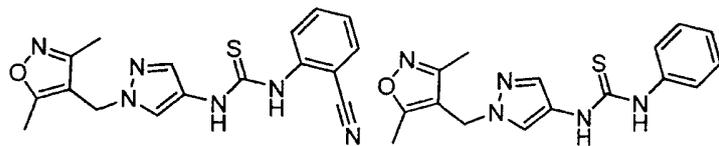
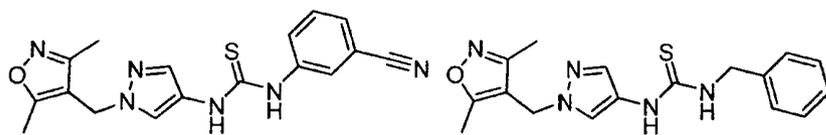


35



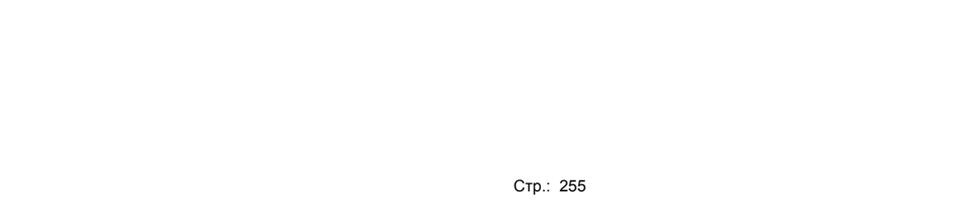
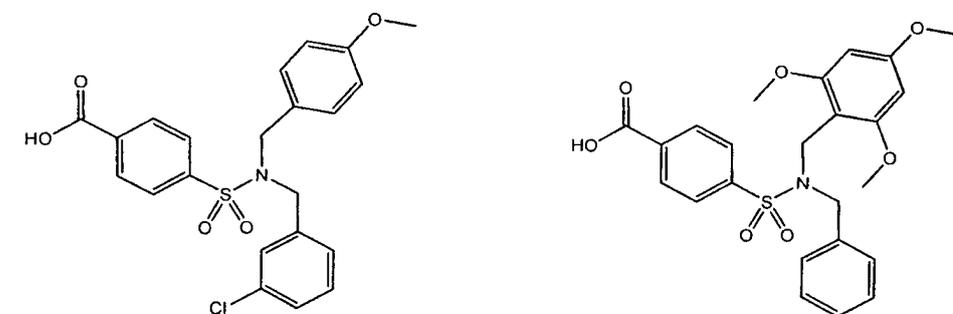
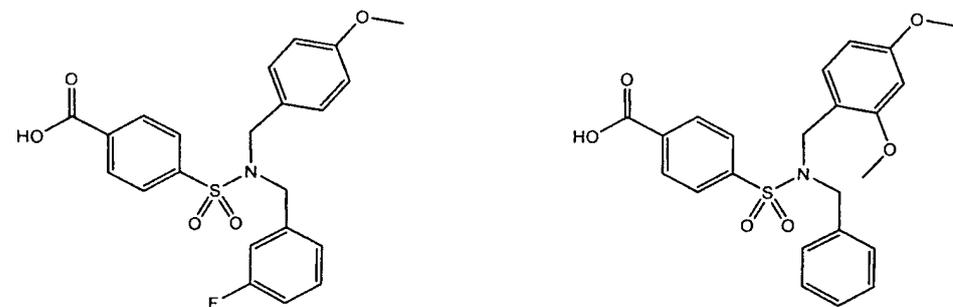
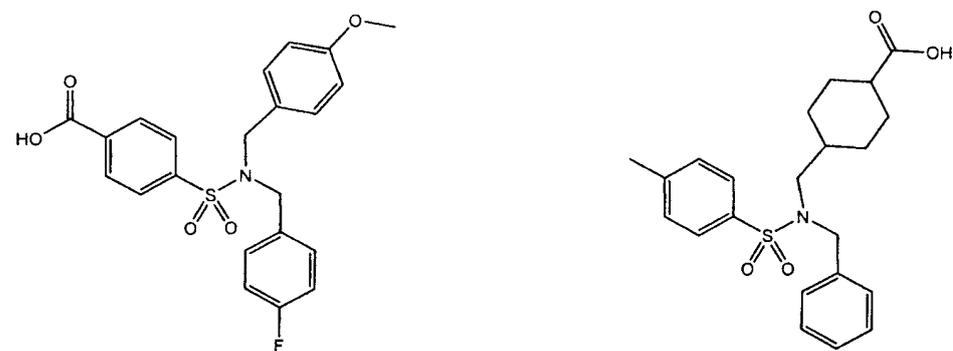
40

45

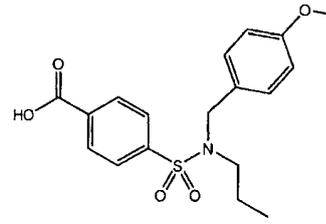
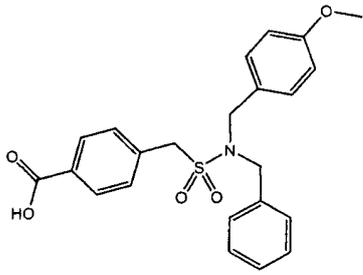


или его фармацевтически приемлемая соль.

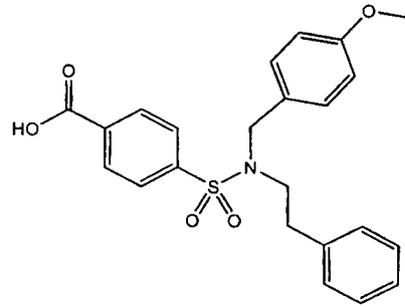
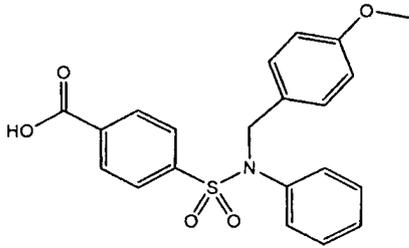
13. Соединение, имеющее формулу:



5

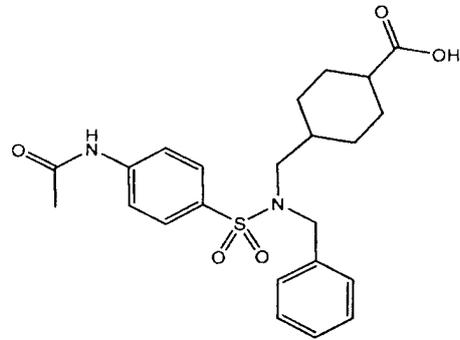
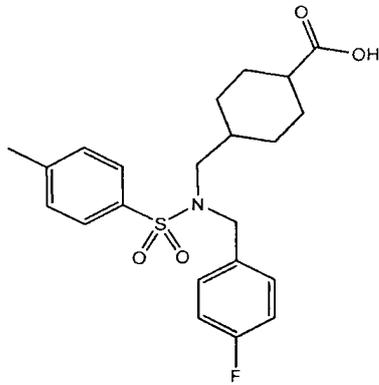


10



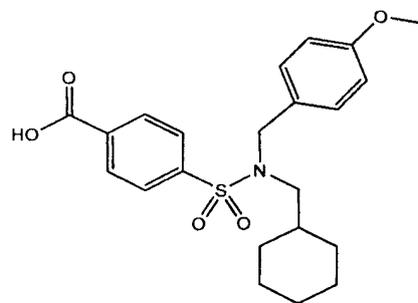
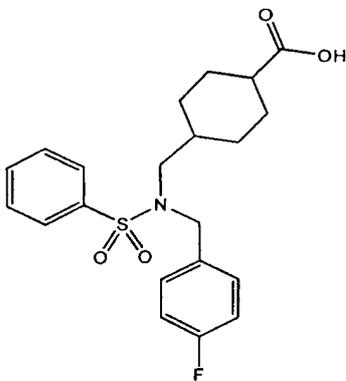
15

20



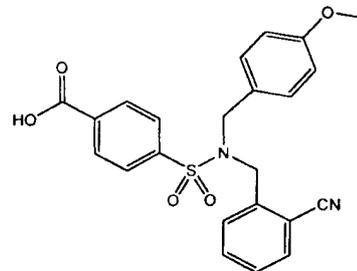
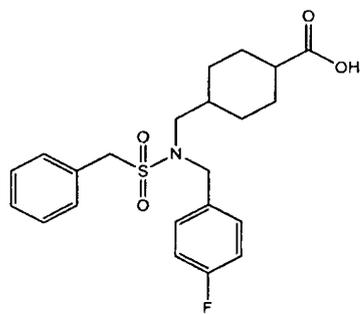
25

30



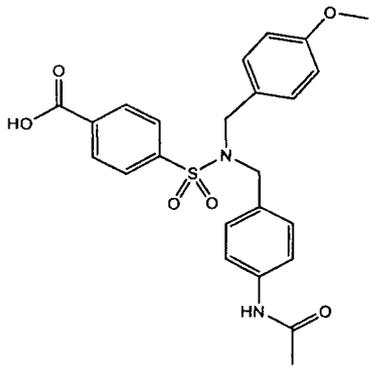
35

40

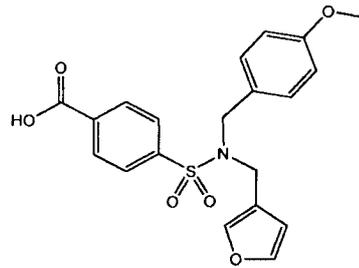


45

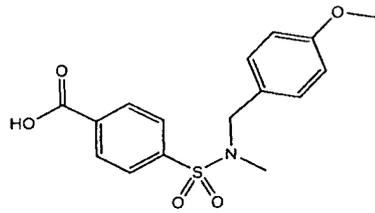
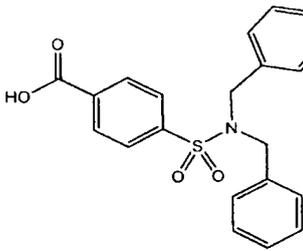
5



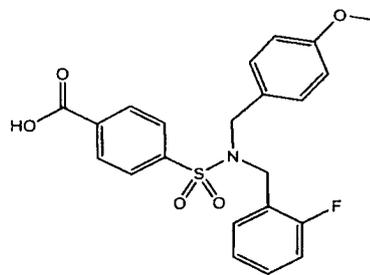
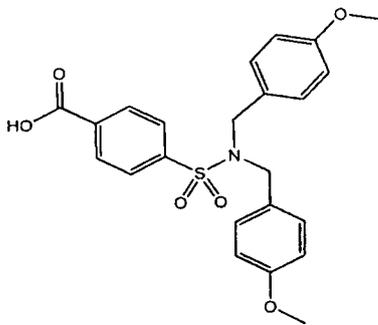
10



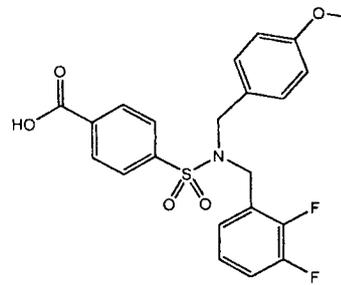
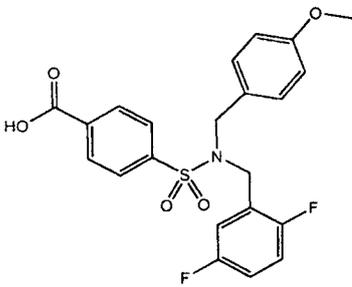
15



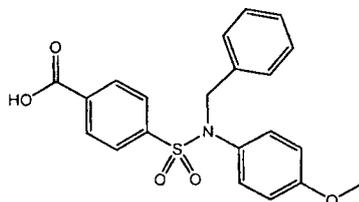
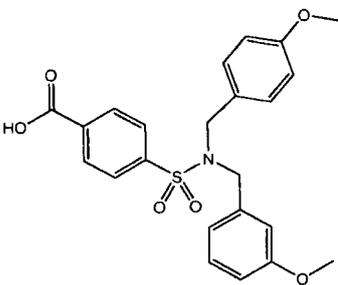
20



25



30

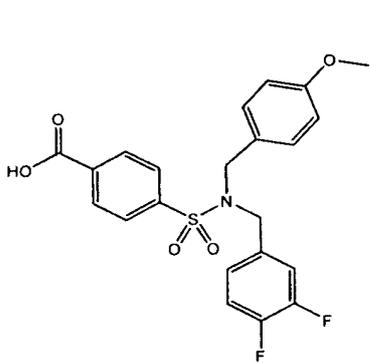


35

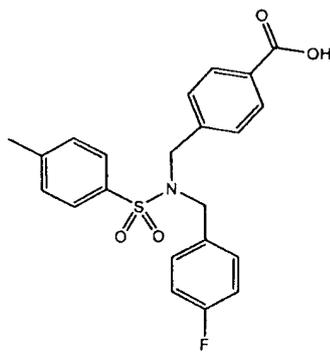
40

45

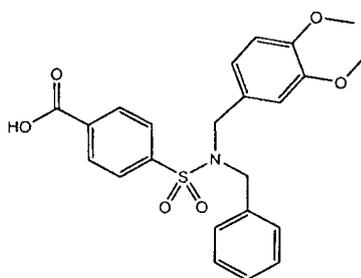
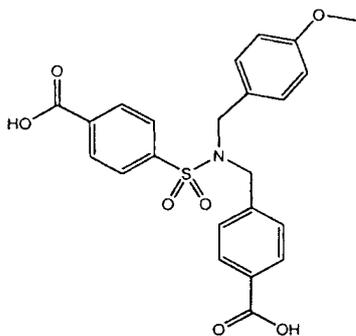
5



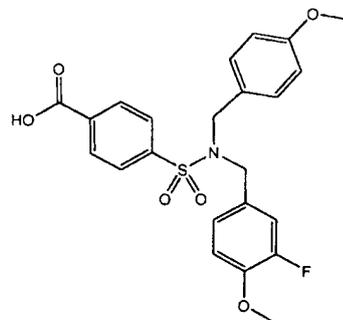
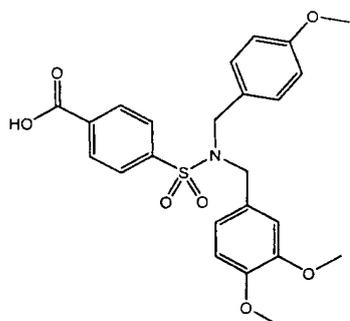
10



15

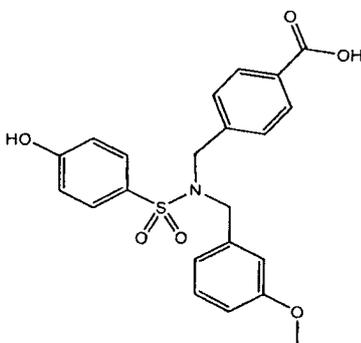
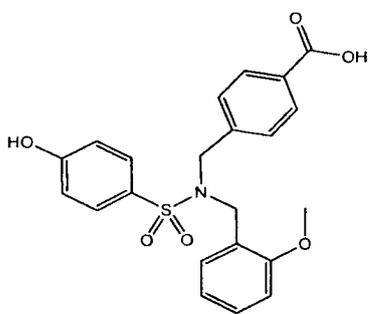


20



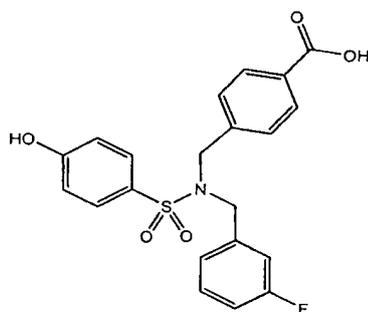
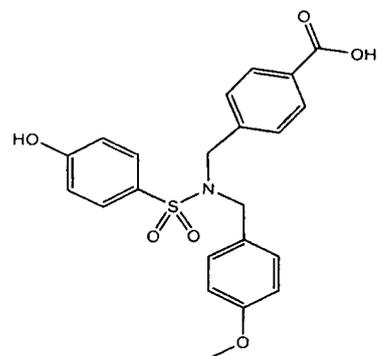
25

30



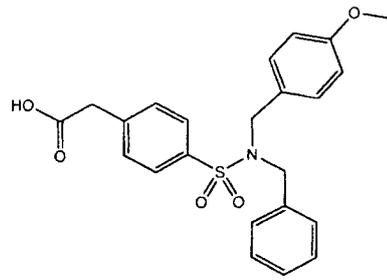
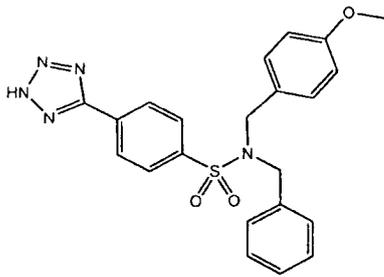
35

40

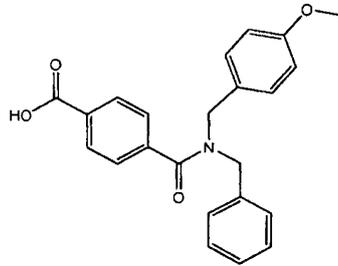
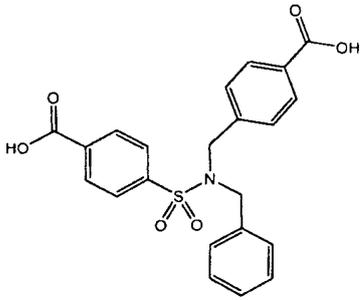


45

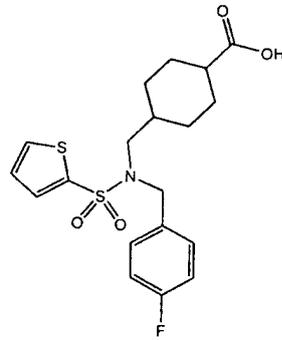
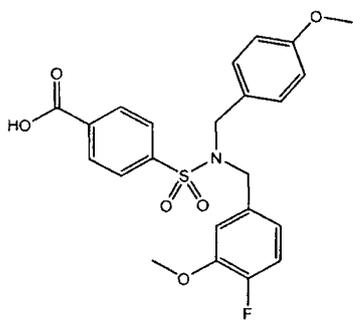
5



10

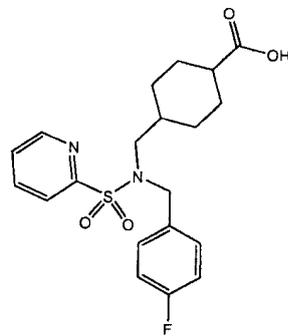
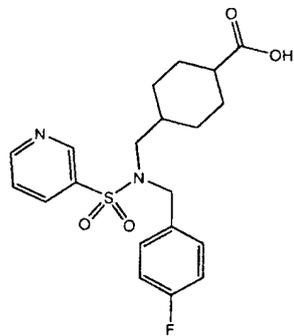


15



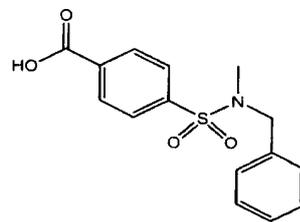
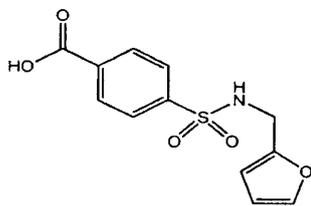
20

25

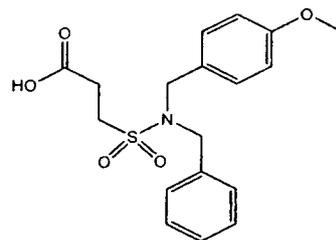
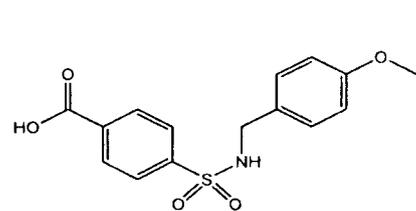


30

35

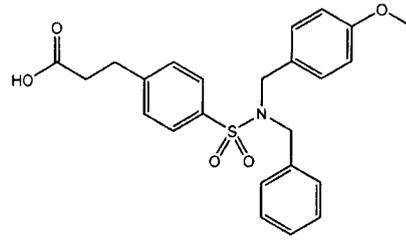
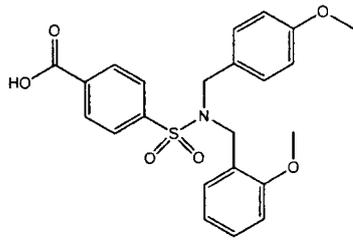


40

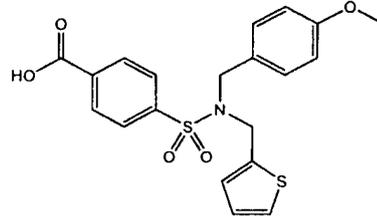
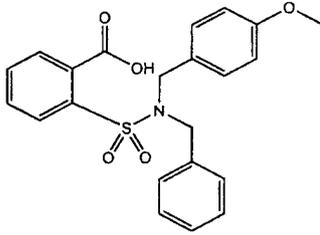


45

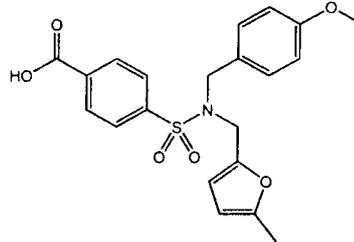
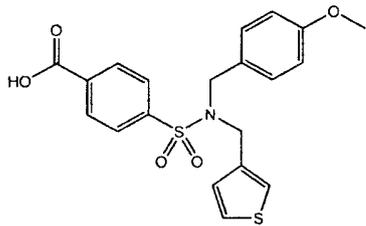
5



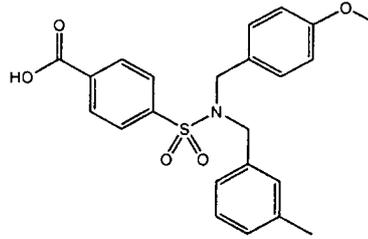
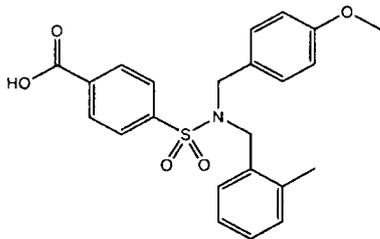
10



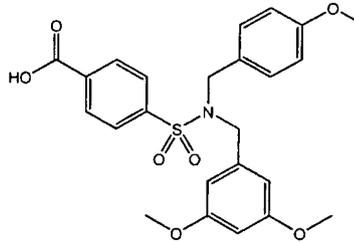
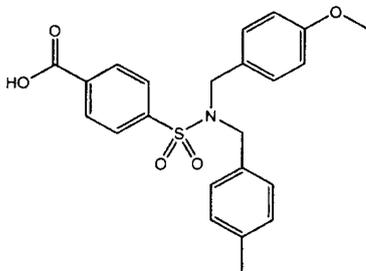
15



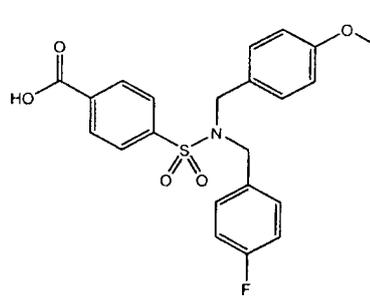
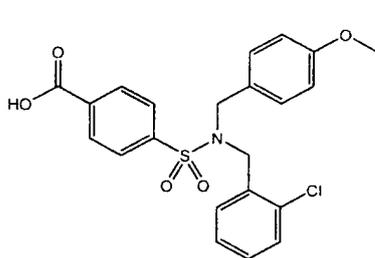
20



25

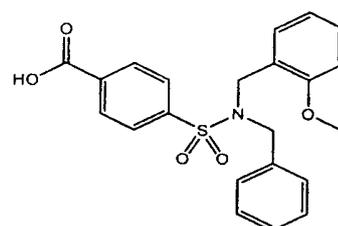
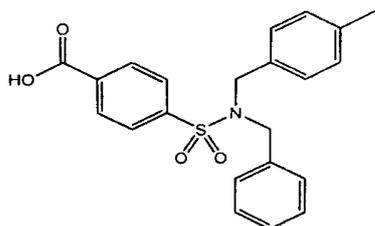


30



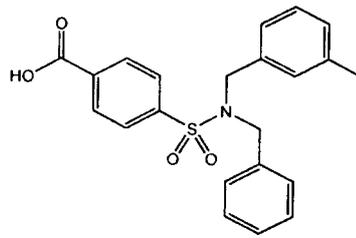
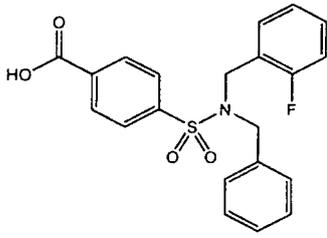
35

40

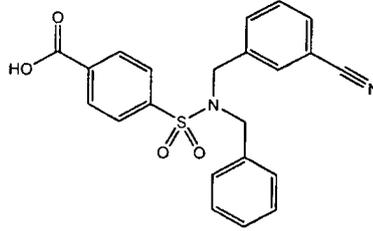
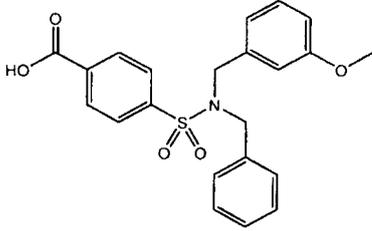


45

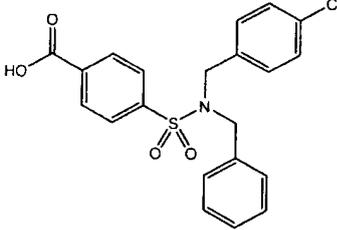
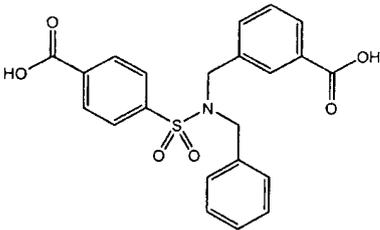
5



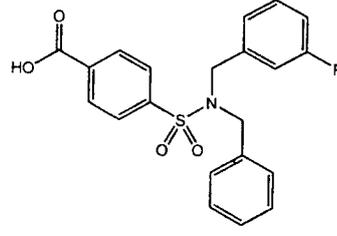
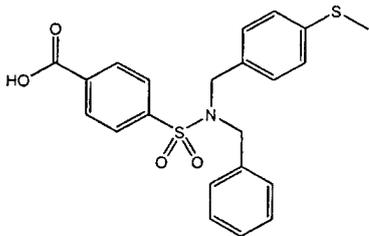
10



15

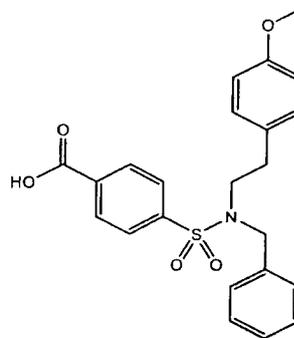
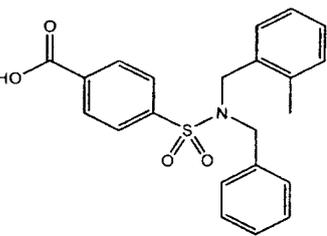


20

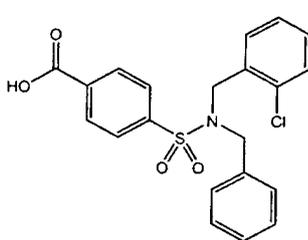
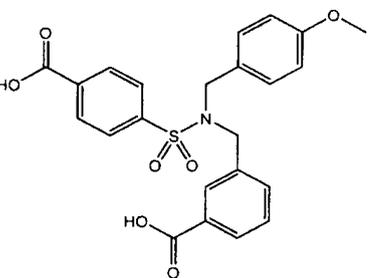


25

30



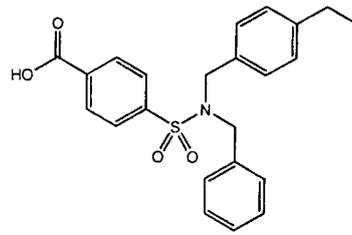
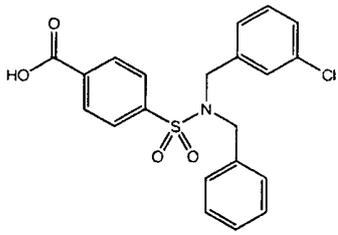
35



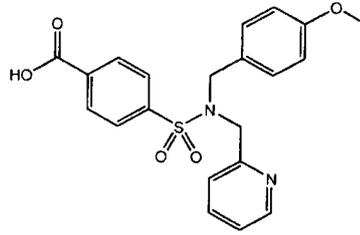
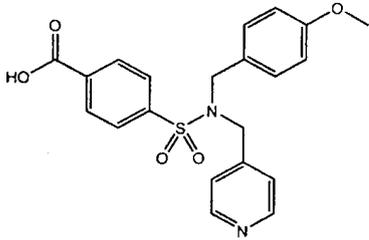
40

45

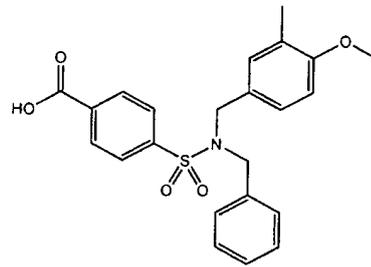
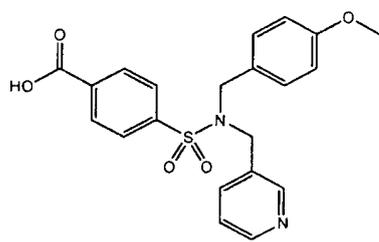
5



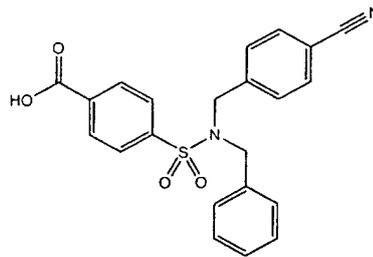
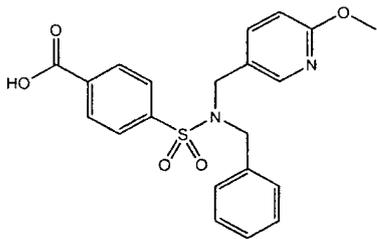
10



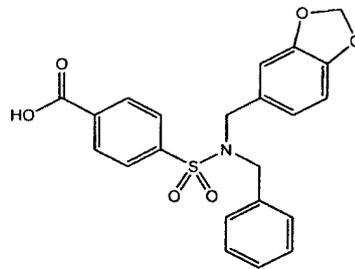
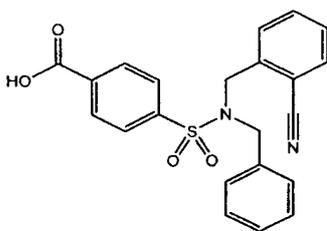
15



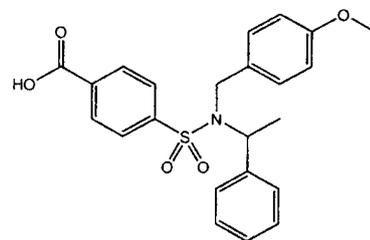
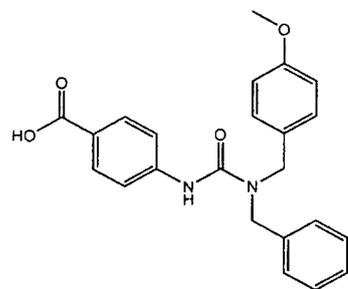
20



25



30

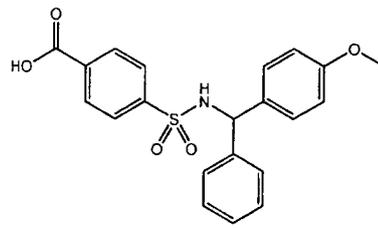
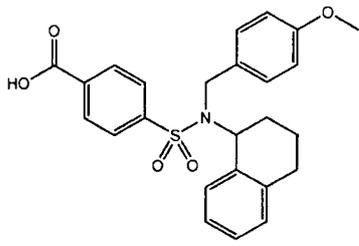


35

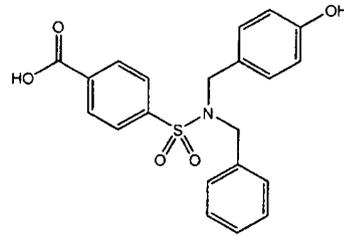
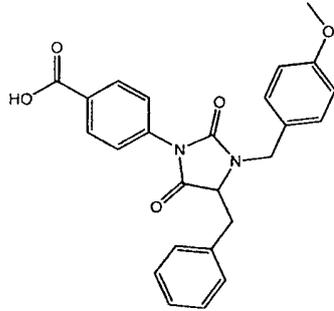
40

45

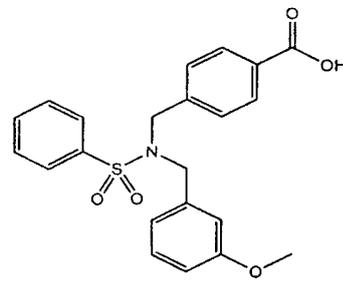
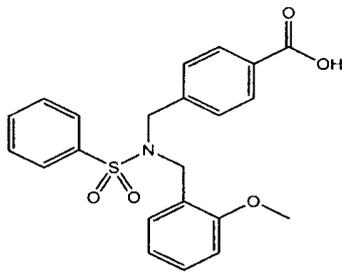
5



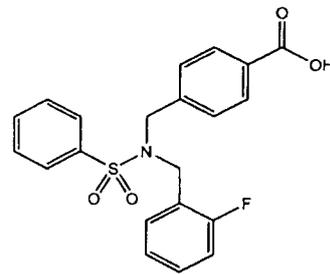
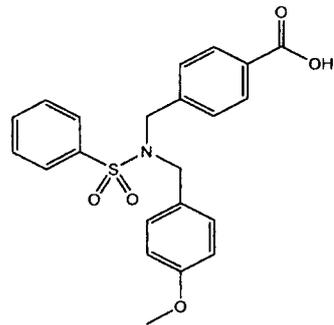
10



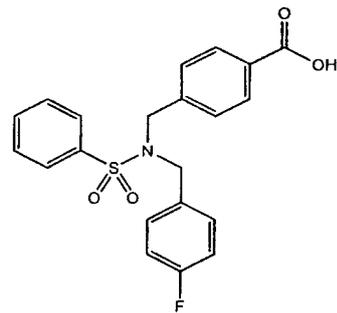
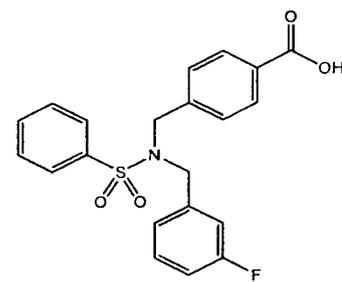
15



20

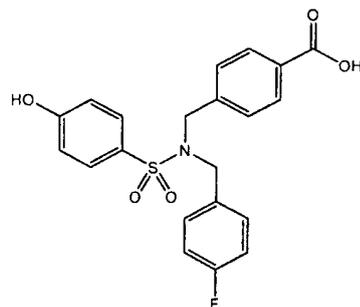
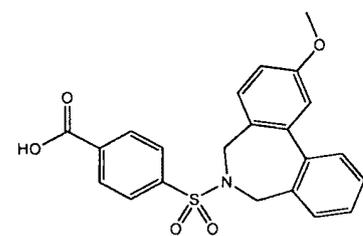


25



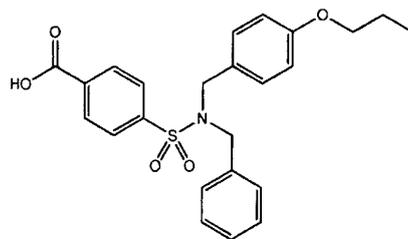
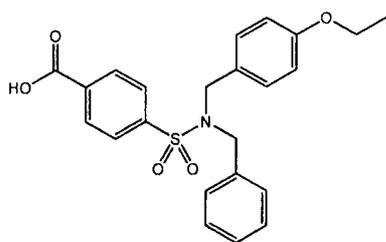
35

40

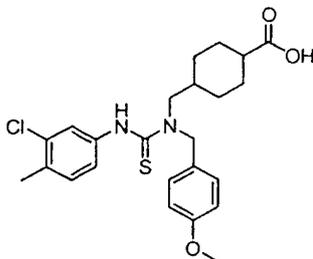
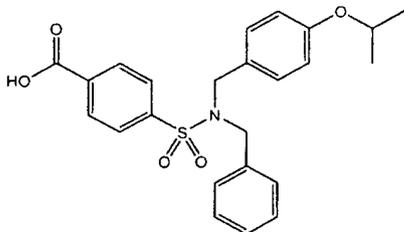


45

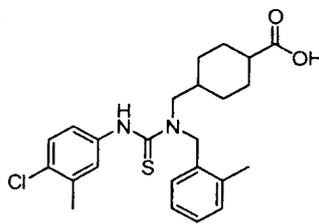
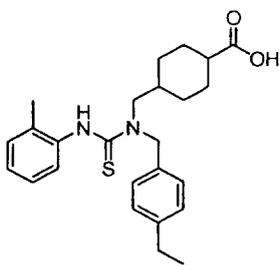
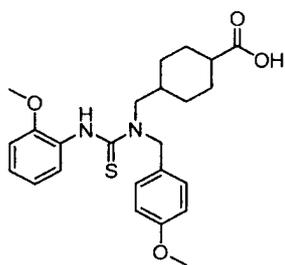
5



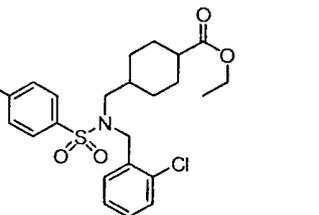
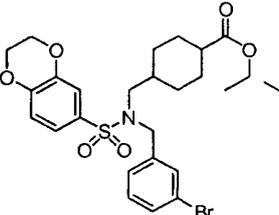
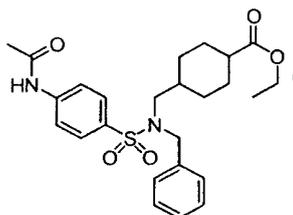
10



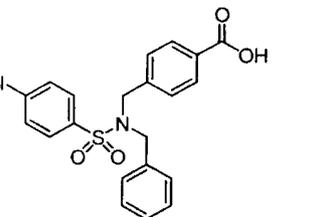
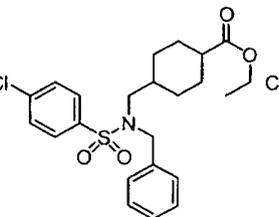
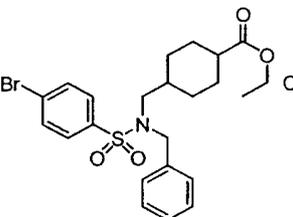
15



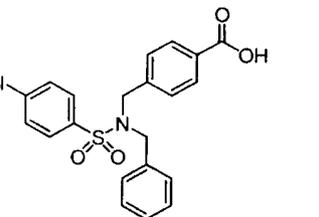
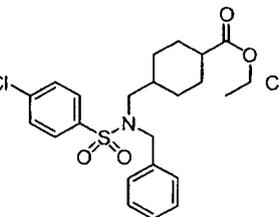
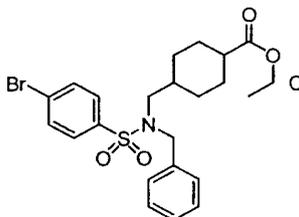
20



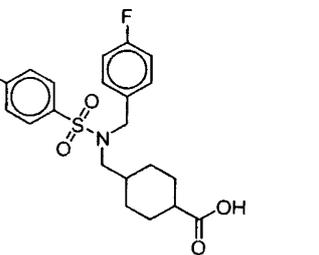
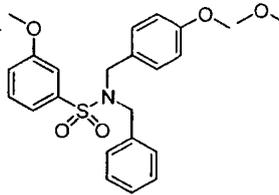
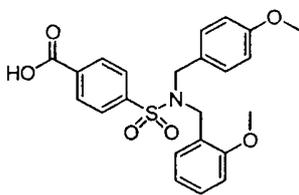
25



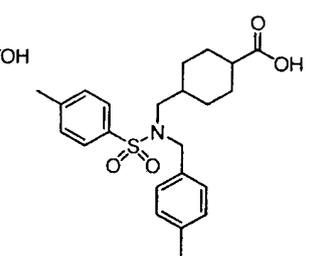
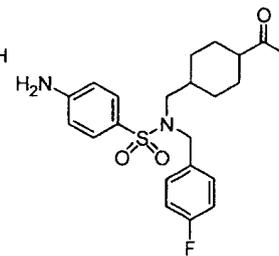
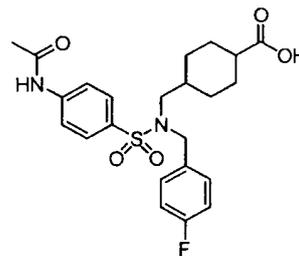
30



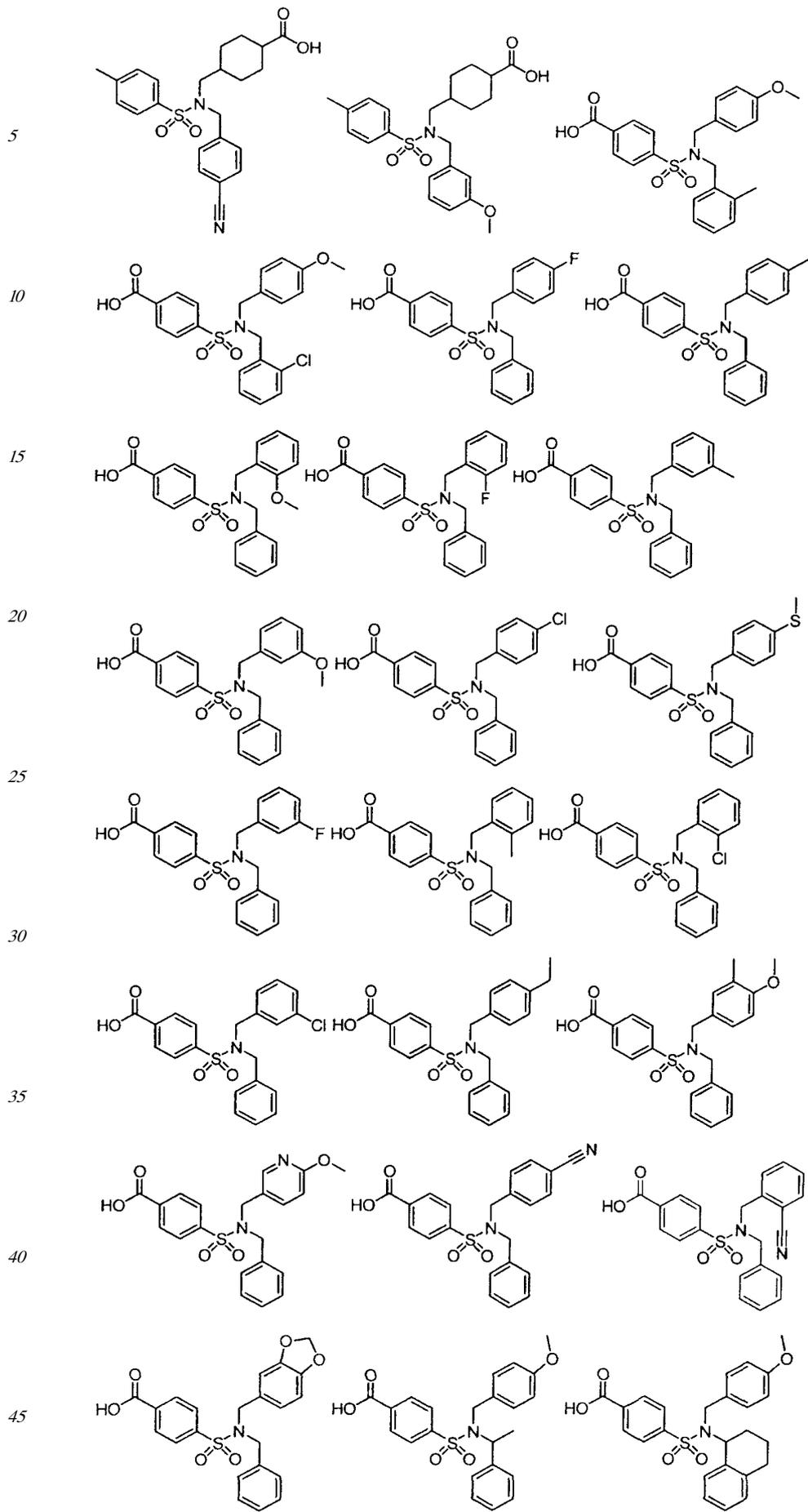
35

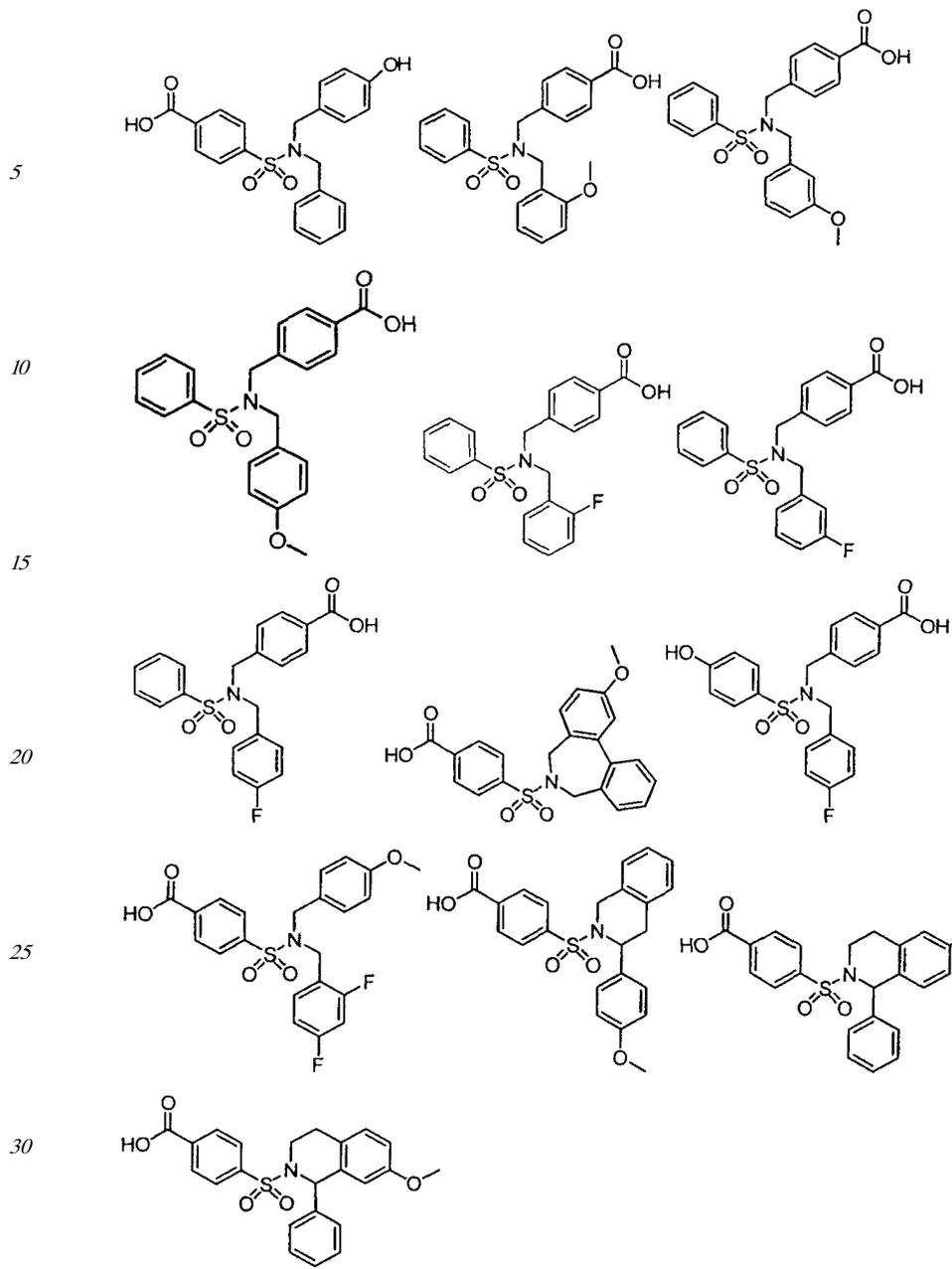


40



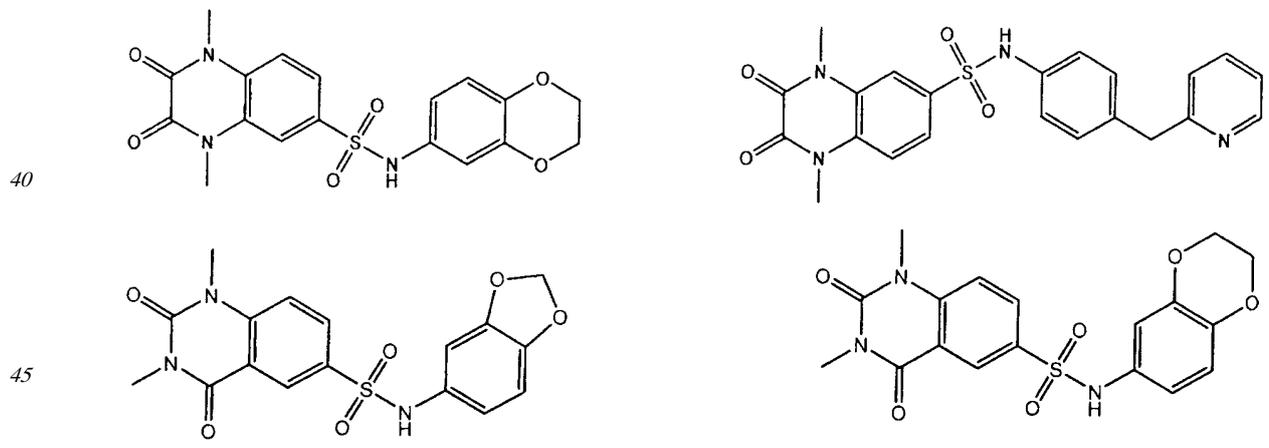
45



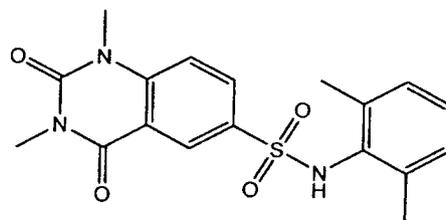
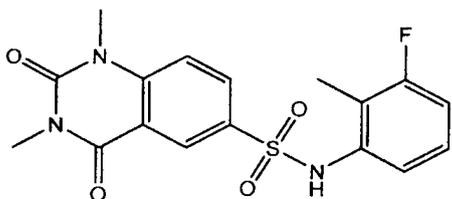


или его фармацевтически приемлемая соль.

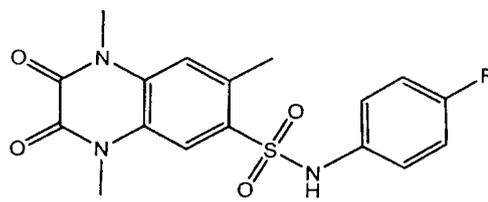
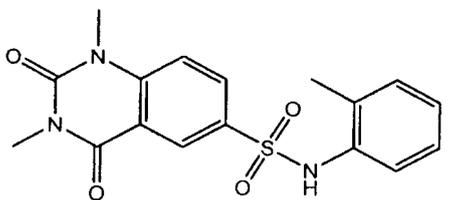
35 14. Соединение, имеющее формулу:



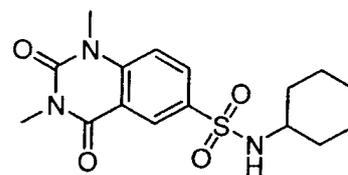
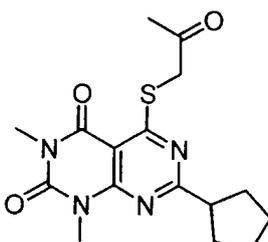
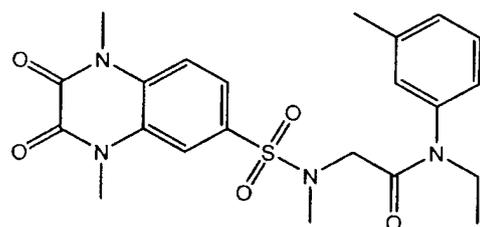
5



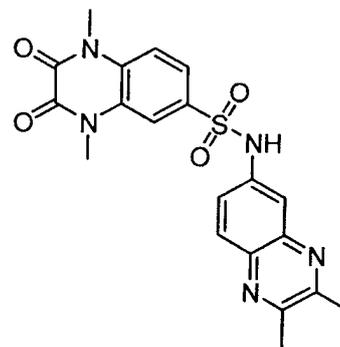
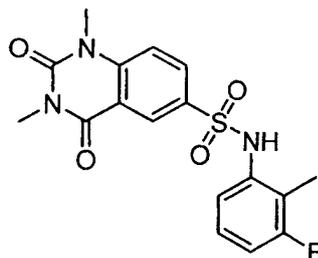
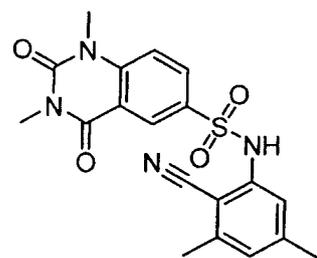
10



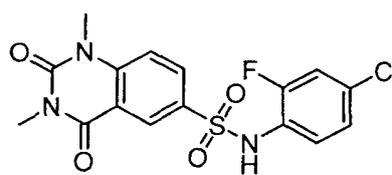
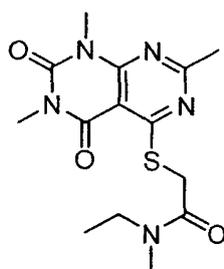
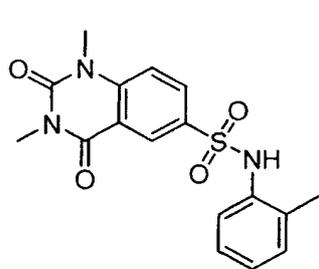
15



20

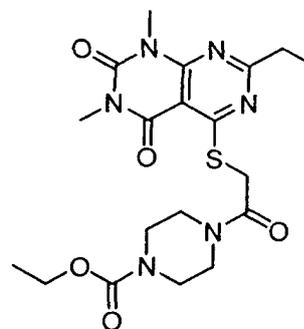
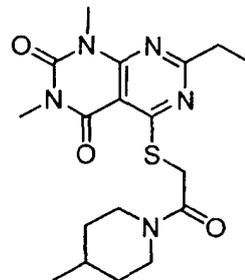
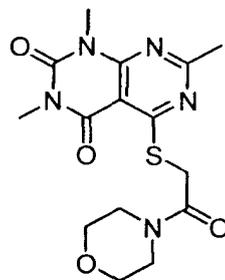
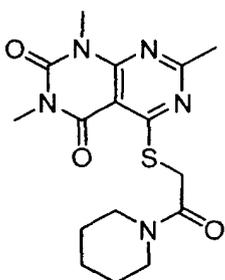


25



30

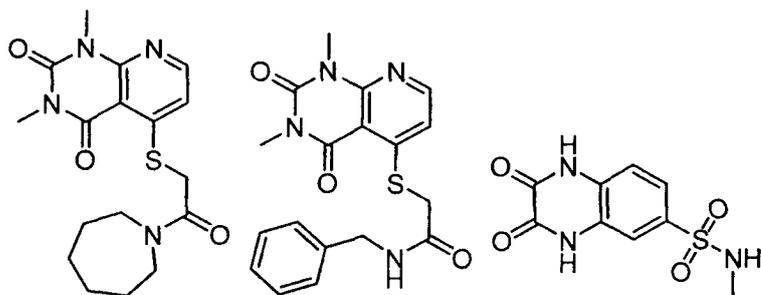
35



40

45

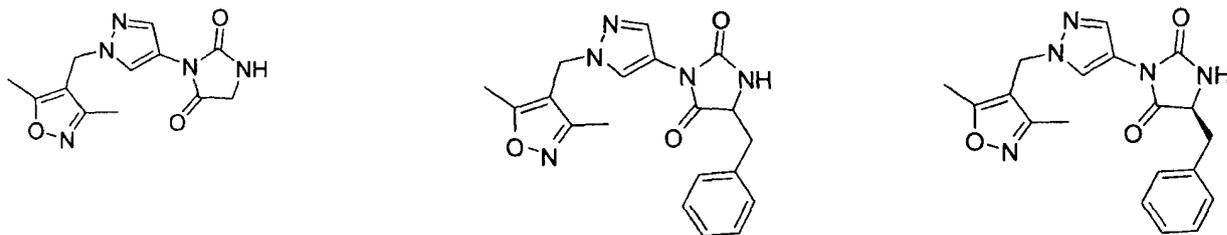
5



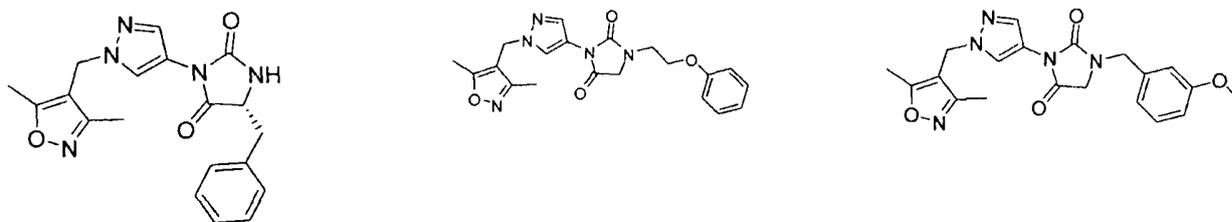
10

или его фармацевтически приемлемая соль.
15. Соединение по п.1, имеющее формулу:

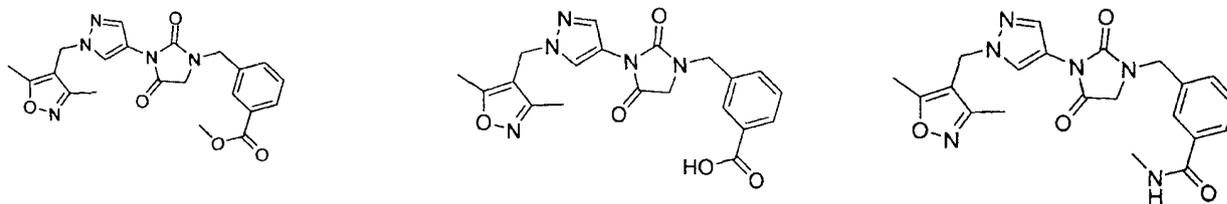
15



20

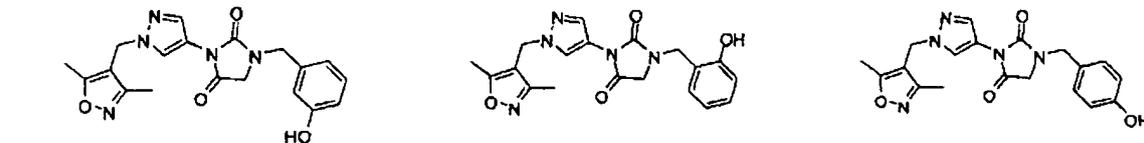


25

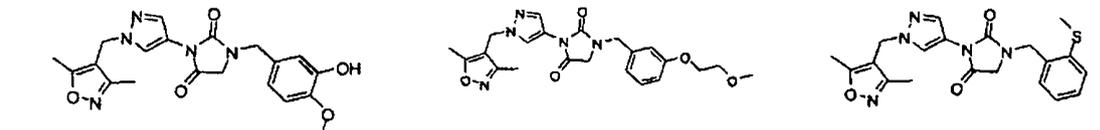


30

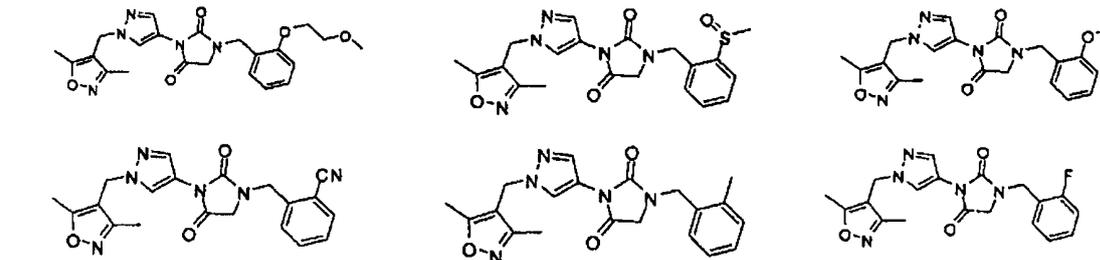
35



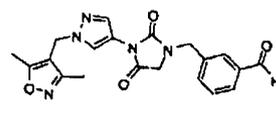
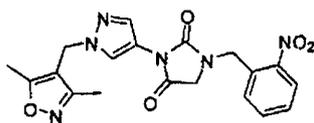
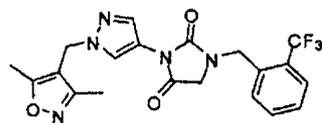
40



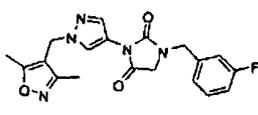
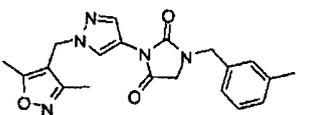
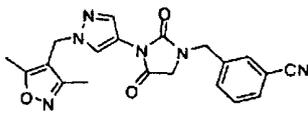
45



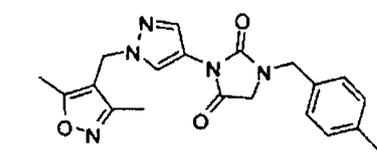
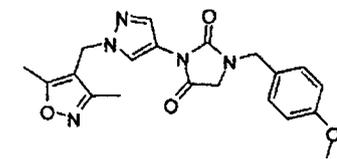
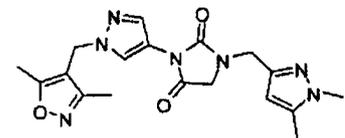
5



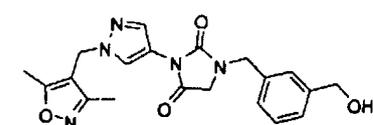
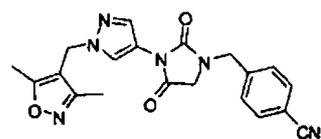
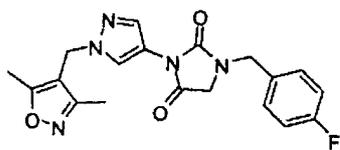
10



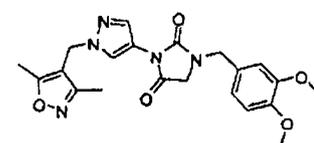
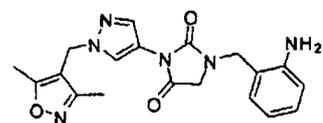
15



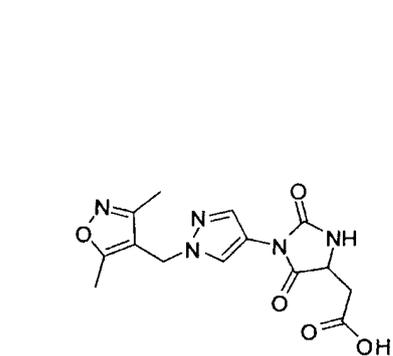
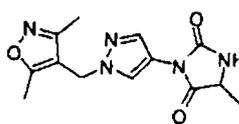
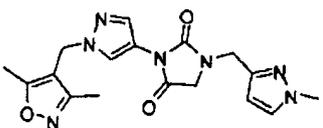
20



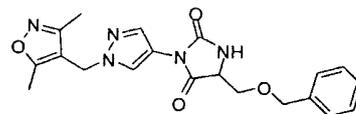
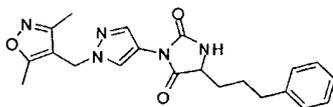
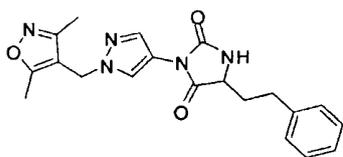
25



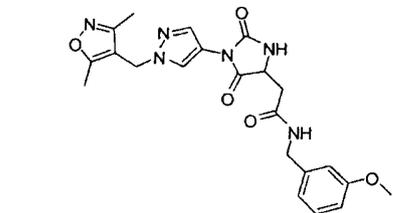
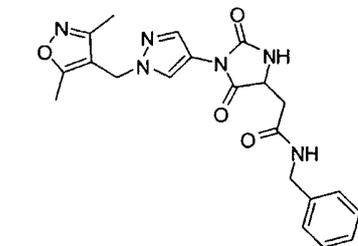
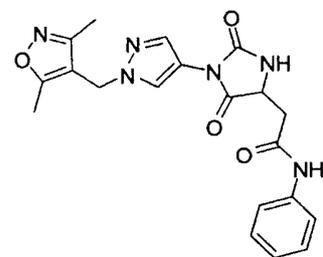
30



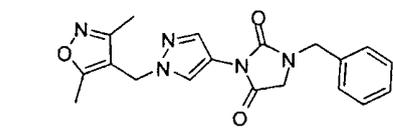
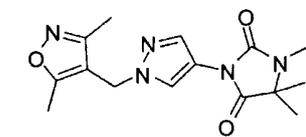
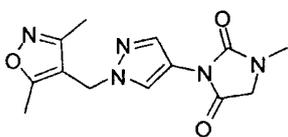
35

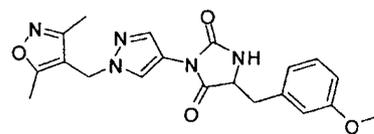
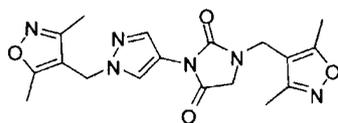
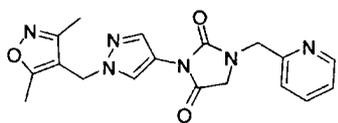


40

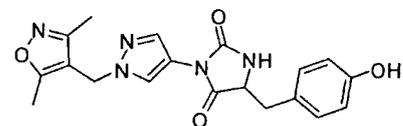
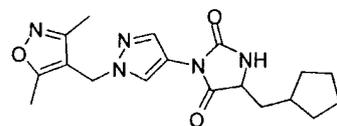
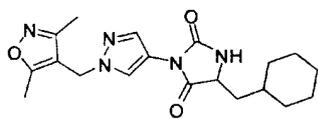


45

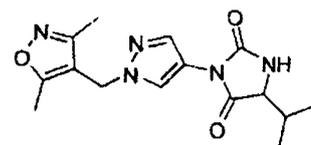
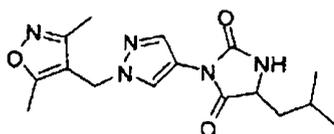
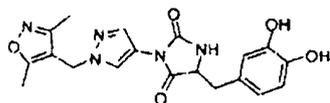




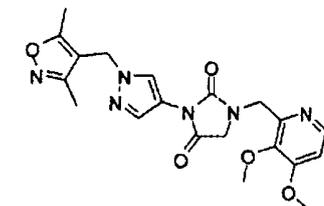
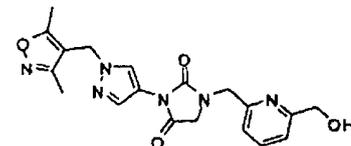
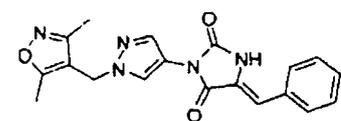
5



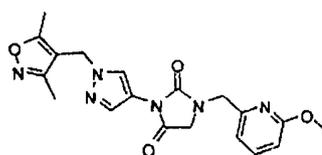
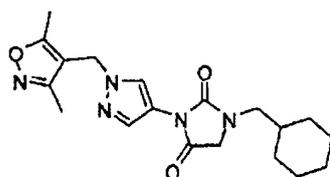
10



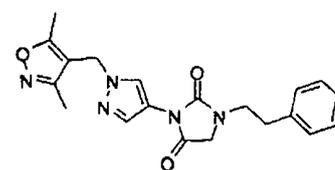
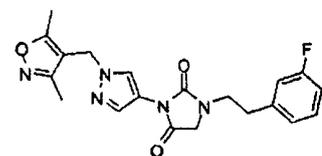
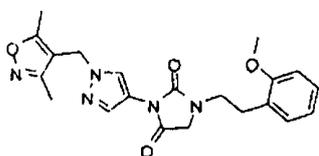
15



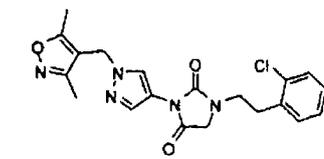
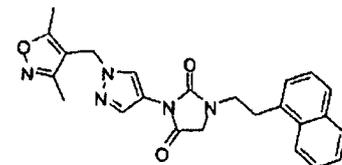
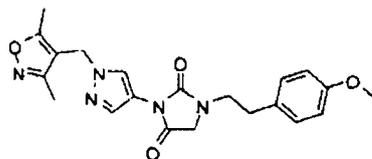
20



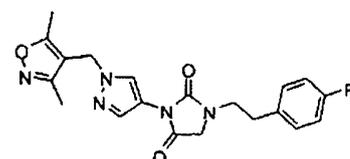
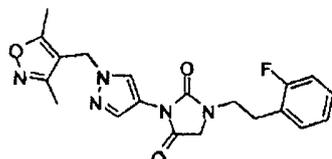
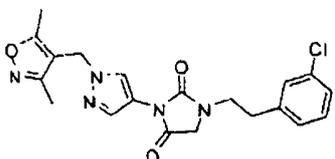
25



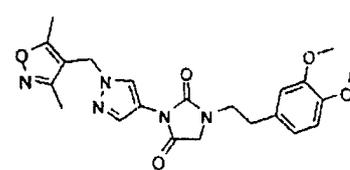
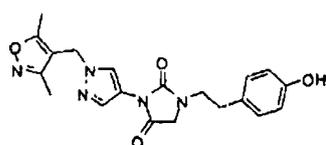
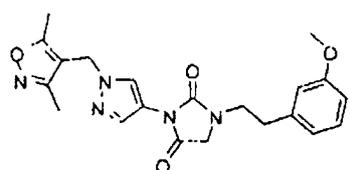
30



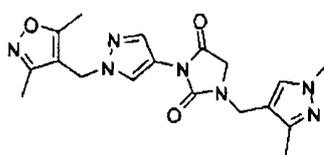
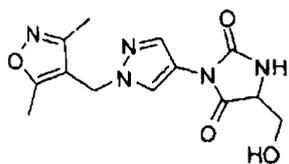
35



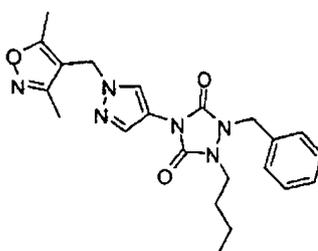
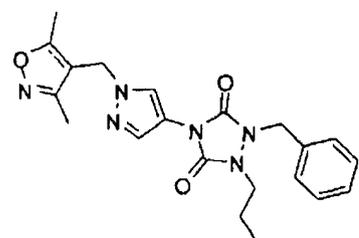
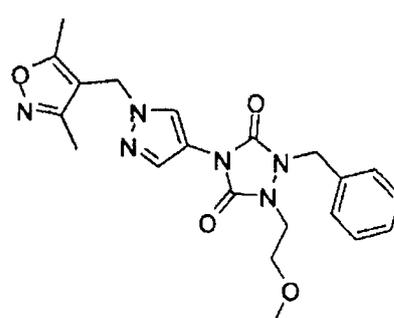
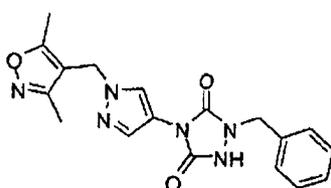
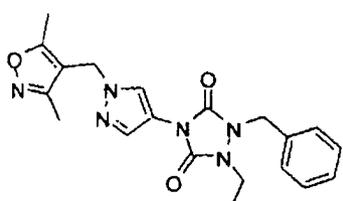
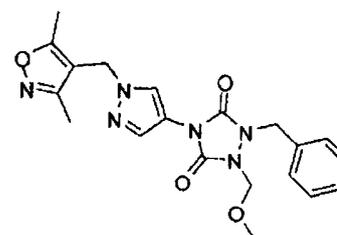
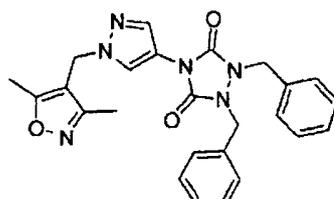
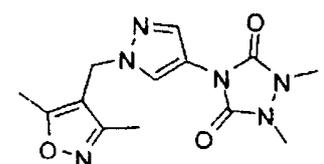
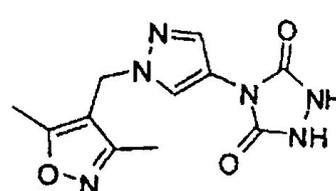
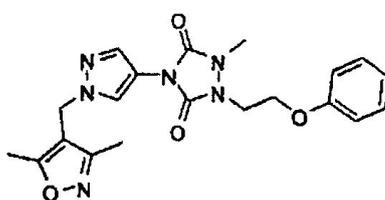
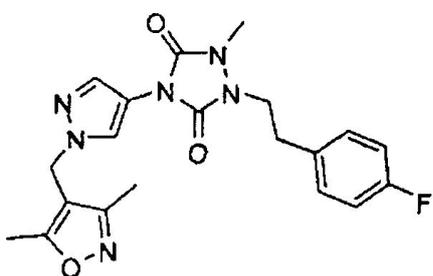
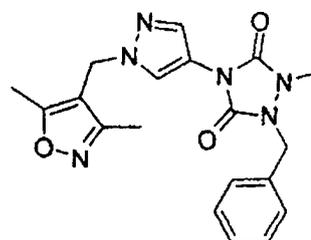
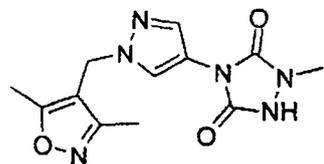
40



45

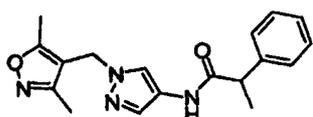


5 или его фармацевтически приемлемая соль.
16. Соединение по п.1, имеющее формулу:

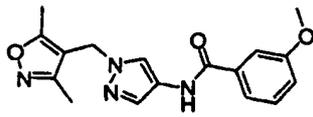


45 или его фармацевтически приемлемая соль.
17. Соединение, имеющее формулу:

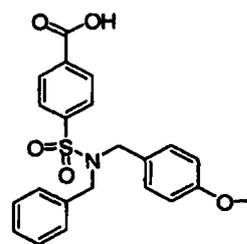
5



Соединение А
 $IC_{50}=0.3$ мкМ (hT2R08)



Соединение В
 $IC_{50}=0.4$ мкМ (hT2R08)



Соединение С
 $IC_{50}=0.2$ мкМ (hT2R14)

или его фармацевтически приемлемая соль.

10

18. Способ уменьшения или ослабления горького вкуса, включающий добавление по меньшей мере одного соединения по одному из пп. 1-17 или его аналога к композиции для приема внутрь человеком или животным в концентрации, эффективной для ослабления или уменьшения горького вкуса, связанного с этой композицией.

15

19. Способ по п.18, в котором концентрация по меньшей мере одного указанного соединения составляет от примерно 0,1 млн. частей до примерно 100 млн. частей.

20. Способ по п.18, в котором концентрация по меньшей мере одного указанного соединения составляет от примерно 1 млн. частей до примерно 25 млн. частей.

21. Способ по п.18, в котором композиция представляет собой пищевой продукт, напиток или лекарственное средство.

20

22. Способ по п.18, в котором композиция содержит горькие соединения, которые активируют один или более из hT2R3, 7, 10, 14, 16, 44, 51, 55, 61, 63, 65, 71 и/или hT2R5, 9, 13, 54, 67 и 75.

25

23. Способ по п.18, в котором композиция содержит по меньшей мере одно горькое соединение, которое активирует множественные рецепторы горького вкуса или которое имеет неопределенную специфичность к рецепторам горького вкуса.

24. Способ по п.18, в котором композиция представляет собой кофе или композицию, ароматизированную кофе.

30

25. Способ по п.24, в котором композиция содержит не менее 2 соединений, по меньшей мере одно из которых является антагонистом hT2R8 и по меньшей мере одно из которых является антагонистом hT2R14.

26. Способ по п.24, в котором кофе или ароматизированная кофе композиция представляет собой быстрорастворимый кофе или сваренный кофе.

35

27. Композиция пищевого продукта или напитка или композиция лекарственного средства или композиция непищевого продукта, которая содержит по меньшей мере одно соединение по одному из пп. 1-17 для уменьшения или смягчения горького вкуса.

28. Композиция пищевого продукта или напитка, или композиция лекарственного средства, или композиция непищевого продукта по п.27, где композиция пищевого продукта или напитка представляет собой кофе или ароматизированную кофе композицию пищевого продукта или напитка.

40

29. Композиция пищевого продукта или напитка, или композиция лекарственного средства, или композиция непищевого продукта по п.27, где композиция пищевого продукта или напитка или композиция лекарственного средства или композиция непищевого продукта содержит не менее 2 соединений, по меньшей мере одно из которых является антагонистом hT2R8 и по меньшей мере одно из которых является антагонистом hT2R14.

45

30. Композиция пищевого продукта или напитка, или композиция лекарственного средства, или композиция непищевого продукта по п.27, где композиция напитка представляет собой готовый к употреблению растворимый и сухой кофейный напиток,

смесь кофейного напитка или концентрат кофейного напитка.

31. Композиция пищевого продукта или напитка, или композиция лекарственного средства, или композиция непивного продукта по п.27, где композиция напитка представляет собой заменитель сливок на молочной основе, немолочный заменитель сливок или забеливатель для кофейных напитков.

32. Композиция пищевого продукта или напитка, или композиция лекарственного средства, или композиция непивного продукта по п.27, где композиция непивного продукта представляет собой добавку, нутрицевтик, функциональный продукт питания, фармацевтический препарат, фармацевтический препарат, отпускаемый без рецепта, продукт для ухода за полостью рта или косметический продукт.

33. Композиция пищевого продукта или напитка, или композиция лекарственного средства, или композиция непивного продукта по п.32, где продукт для ухода за полостью рта представляет собой средство для ухода за зубами, жидкость для полоскания рта или жевательную резинку.

34. Способ обнаружения или количественного анализа возможного блокирования горького вкуса горького соединения в композиции соединением по одному из пп.1-17, причем указанный способ включает

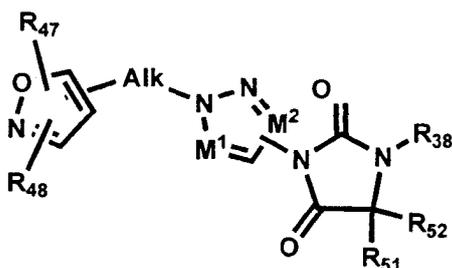
контактирование композиции, содержащей по меньшей мере одно горькое соединение, которое активирует по меньшей мере один человеческий рецептор горького вкуса, выбранный из группы, состоящей из hT2R3, 7, 10, 14, 16, 44, 51, 55, 61, 63, 64, 65 или 71 и/или hT2R5, 9, 13, 54, 67 и 75, и

выявление того, является ли активация указанного по меньшей мере одного рецептора блокированной или ингибированной соединением по одному из пп.1-17, где указанное блокирование или ингибирование ослабляет горький вкус по меньшей мере одного горького соединения.

35. Способ по п.34, дополнительно включающий вкусовой тест, в котором горькое соединение и указанное соединение-антагонист пробуют на вкус отдельно и в комбинации, чтобы подтвердить то, что горький вкус ослаблен антагонистом.

36. Способ по п.34, который представляет собой высокопроизводительный анализ.

37. Способ получения соединения формулы:



или его фармацевтически приемлемой соли,
где Alk представляет собой C₁-C₆алкильную группу;

R₅₁ и R₅₂, будучи одинаковыми или разными, независимо один от другого, представляют собой H, C₁-C₆алкил, необязательно замещенный заместителем, выбранным из группы, включающей карбокси, фенокси, бензилокси, C₁-C₆алкокси и гидроксид;

C₃-C₆циклоалкилC₁-C₆алкил; фенилC₁-C₆алкил, необязательно замещенный одним заместителем, выбранным из группы, включающей галоген; фениламидоC₁-C₆алкил; фенилC₁-C₆алкиламидоC₁-C₆алкил, необязательно замещенный C₁-C₆алкоксигруппой;

или R₅₁ и R₅₂, совместно с углеродным атомом, к которому они присоединены, образуют группу C=O или C₂-C₆алкенильную группу, необязательно замещенную фенилом;

5 M¹ представляет собой CR₄₉, где R₄₉ представляет собой H;

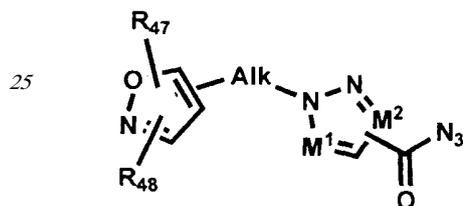
M² представляет собой CR₅₀, где R₅₀ представляет собой H;

R₃₈ представляет собой H, C₁-C₆алкил, замещенный фенокси группой; C₃-C₆ алклоалкил C₁-C₆алкил; арил C₁-C₆алкил, необязательно замещенный 1 или 2
10 заместителями, выбранными из группы, включающей C₁-C₆алкил, C₁-C₆алкокси, C₁-C₆алкоксикарбонил, карбоксил, N-метиламидо, гидроксид, C₁-C₆алкокси C₁-C₆алкокси, C₁-C₆алкилтио, C₁-C₆алкилсульфинил, циано, галоген, перфтор C₁-C₆алкил, нитро, формил, гидроксид C₁-C₆алкил и amino, причем арильный фрагмент представляет собой
15 фенил или нафтил; и гетероарил C₁-C₆алкил, где гетероарильный фрагмент представляет собой пиридинил, необязательно замещенный 1 или 2 группами, выбранными из C₁-C₆ алкокси или гидроксид C₁-C₆алкила, пиразолил или изоксазоллил, замещенные 1 или 2 C₁-C₆алкильными группами;

20 R₄₇ представляет собой C₁-C₆алкил; и

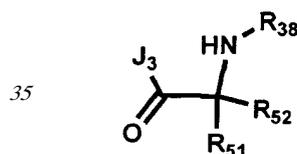
R₄₈ представляет собой C₁-C₆алкил;

где способ включает нагревание соединения формулы:



30 где R₄₇, R₄₈, Alk, M¹ и M² определены выше;

для преобразования группы -CON₃ в группу -N=C=O и последующего взаимодействия с соединением формулы:



где J₃ представляет собой уходящую группу и R₃₈, R₅₁ и R₅₂ определены выше.

40

45

<211> 374
 <212> PRT
 <213> Искусственная последовательность

<220>
 <223> Синтетический химерный белок

<400> 2

Met Ala Arg Ser Leu Thr Trp Arg Cys Cys Pro Trp Cys Leu Thr Glu
 1 5 10 15

Asp Glu Lys Ala Ala Ala Arg Val Asp Gln Glu Ile Asn Arg Ile Leu
 20 25 30

Leu Glu Gln Lys Lys Gln Asp Arg Gly Glu Leu Lys Leu Leu Leu Leu
 35 40 45

Gly Pro Gly Glu Ser Gly Lys Ser Thr Phe Ile Lys Gln Met Arg Ile
 50 55 60

Ile His Gly Ala Gly Tyr Ser Glu Glu Glu Arg Lys Gly Phe Arg Pro
 65 70 75 80

Leu Val Tyr Gln Asn Ile Phe Val Ser Met Arg Ala Met Ile Glu Ala
 85 90 95

Met Glu Arg Leu Gln Ile Pro Phe Ser Arg Pro Glu Ser Lys His His
 100 105 110

Ala Ser Leu Val Met Ser Gln Asp Pro Tyr Lys Val Thr Thr Phe Glu
 115 120 125

Lys Arg Tyr Ala Ala Ala Met Gln Trp Leu Trp Arg Asp Ala Gly Ile
 130 135 140

Arg Ala Cys Tyr Glu Arg Arg Arg Glu Phe His Leu Leu Asp Ser Ala
 145 150 155 160

Val Tyr Tyr Leu Ser His Leu Glu Arg Ile Thr Glu Glu Gly Tyr Val
 165 170 175

Pro Thr Ala Gln Asp Val Leu Arg Ser Arg Met Pro Thr Thr Gly Ile
 180 185 190

Asn Glu Tyr Cys Phe Ser Val Gln Lys Thr Asn Leu Arg Ile Val Asp
 195 200 205

Val Gly Gly Gln Lys Ser Glu Arg Lys Lys Trp Ile His Cys Phe Glu
 210 215 220

RU 2522456 C2

Asn Val Ile Ala Leu Ile Tyr Leu Ala Ser Leu Ser Glu Tyr Asp Gln
 225 230 235 240

Cys Leu Glu Glu Asn Asn Gln Glu Asn Arg Met Lys Glu Ser Leu Ala
 245 250 255

Leu Phe Gly Thr Ile Leu Glu Leu Pro Trp Phe Lys Ser Thr Ser Val
 260 265 270

Ile Leu Phe Leu Asn Lys Thr Asp Ile Leu Glu Glu Lys Ile Pro Thr
 275 280 285

Ser His Leu Ala Thr Tyr Phe Pro Ser Phe Gln Gly Pro Lys Gln Asp
 290 295 300

Ala Glu Ala Ala Lys Arg Phe Ile Leu Asp Met Tyr Thr Arg Met Tyr
 305 310 315 320

Thr Gly Cys Val Asp Gly Pro Glu Gly Ser Asn Leu Lys Lys Glu Asp
 325 330 335

Lys Glu Ile Tyr Ser His Met Thr Cys Ala Thr Asp Thr Gln Asn Val
 340 345 350

Lys Phe Val Phe Asp Ala Val Thr Asp Ile Ile Ile Lys Glu Asn Leu
 355 360 365

Lys Asp Cys Gly Leu Phe
 370

<210> 3

<211> 930

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 3

atgttcagtc ctgcagataa catctttata atcctaataa ctggagaatt catactagga 60

atattgggga atggatacat tgcactagtc aactggattg actggattaa gaagaaaaag 120

atttccacag ttgactacat ccttaccat ttagttatcg ccagaatttg tttgatcagt 180

gtaatggttg taaatggcat tgtaatagta ctgaaccag atgtttatac aaaaaataaa 240

caacagatag tcattttttac cttctggaca tttgccaact acttaaatat gtggattacc 300

acctgcctta atgtcttcta ttttctgaag atagccagtt cctctcatcc actttttctc 360

tggtggaagt ggaaaattga tatggtggtg cactggatcc tgctgggatg ctttgccatt 420

tccttgttgg tcagccttat agcagcaata gtactgagtt gtgattatag gtttcatgca 480

attgccaac ataaaagaaa cattactgaa atgttccatg tgagtaaaat accatacttt 540

gaacccttaa ctctctttaa cctgtttgca attgtcccat ttattgtgtc actgatatca 600
 tttttccttt tagtaagatc tttatggaga cataccaagc aaataaaaact ctatgctacc 660
 ggagtagag accccagcac agaagttcat gtgagagcca ttaaaaactat gacttcattt 720
 atcttctttt ttttcctata ctatatttct tctattttga tgaccttag ctatcttatg 780
 acaaaataca agttagctgt ggagtttga gagattgcag caattctcta ccccttgggt 840
 cactcactta ttttaattgt tttaaataat aaactgaggc agacatttgt cagaatgctg 900
 acatgtagaa aaattgcctg catgatatga 930

<210> 4
 <211> 309
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 4

Met Phe Ser Pro Ala Asp Asn Ile Phe Ile Ile Leu Ile Thr Gly Glu
 1 5 10 15

Phe Ile Leu Gly Ile Leu Gly Asn Gly Tyr Ile Ala Leu Val Asn Trp
 20 25 30

Ile Asp Trp Ile Lys Lys Lys Lys Ile Ser Thr Val Asp Tyr Ile Leu
 35 40 45

Thr Asn Leu Val Ile Ala Arg Ile Cys Leu Ile Ser Val Met Val Val
 50 55 60

Asn Gly Ile Val Ile Val Leu Asn Pro Asp Val Tyr Thr Lys Asn Lys
 65 70 75 80

Gln Gln Ile Val Ile Phe Thr Phe Trp Thr Phe Ala Asn Tyr Leu Asn
 85 90 95

Met Trp Ile Thr Thr Cys Leu Asn Val Phe Tyr Phe Leu Lys Ile Ala
 100 105 110

Ser Ser Ser His Pro Leu Phe Leu Trp Leu Lys Trp Lys Ile Asp Met
 115 120 125

Val Val His Trp Ile Leu Leu Gly Cys Phe Ala Ile Ser Leu Leu Val
 130 135 140

Ser Leu Ile Ala Ala Ile Val Leu Ser Cys Asp Tyr Arg Phe His Ala
 145 150 155 160

Ile Ala Lys His Lys Arg Asn Ile Thr Glu Met Phe His Val Ser Lys

RU 2 522 456 C2

	165		170		175
Ile Pro Tyr Phe Glu Pro Leu Thr Leu Phe Asn Leu Phe Ala Ile Val	180		185		190
Pro Phe Ile Val Ser Leu Ile Ser Phe Phe Leu Leu Val Arg Ser Leu	195		200		205
Trp Arg His Thr Lys Gln Ile Lys Leu Tyr Ala Thr Gly Ser Arg Asp	210		215		220
Pro Ser Thr Glu Val His Val Arg Ala Ile Lys Thr Met Thr Ser Phe	225		230		235
Ile Phe Phe Phe Phe Leu Tyr Tyr Ile Ser Ser Ile Leu Met Thr Phe	245		250		255
Ser Tyr Leu Met Thr Lys Tyr Lys Leu Ala Val Glu Phe Gly Glu Ile	260		265		270
Ala Ala Ile Leu Tyr Pro Leu Gly His Ser Leu Ile Leu Ile Val Leu	275		280		285
Asn Asn Lys Leu Arg Gln Thr Phe Val Arg Met Leu Thr Cys Arg Lys	290		295		300
Ile Ala Cys Met Ile	305				

<210> 5
 <211> 954
 <212> DNA
 <213> Homo sapiens

<400> 5
 atgggtggtg tcataaagag catatttaca ttcgttttaa ttgtggaatt tataattgga 60
 aatttaggaa atagtttcat agcactggtg aactgtattg actgggtcaa ggaagaaag 120
 atctcttcgg ttgatcggat cctcactgct ttggcaatct ctogaattag cctggtttgg 180
 ttaatattcg gaagctggtg tgtgtctgtg tttttcccag ctttatttgc cactgaaaaa 240
 atgttcagaa tgcttactaa tatctggaca gtgatcaatc attttagtgt ctggttagct 300
 acaggcctcg gtacttttta ttttctcaag atagccaatt tttctaactc tatttttctc 360
 tacctaaagt ggagagttaa aaaggtggtt ttggtgctgc ttcttgtgac ttcggctctc 420
 ttgtttttaa atattgcact gataaacatc catataaatg ccagtatcaa tggatacaga 480
 agaaacaaga cttgcagttc tgattcaagt aactttacac gattttccag tcttattgta 540
 ttaaccagca ctgtgttcat tttcataccc tttactttgt ccctggcaat gtttcttctc 600

ctcatcttct ccatgtggaa acatcgcaag aagatgcagc aactgtcaa aatatccgga 660
 gagccagca ccaaagccca cagaggagtt aaaagtgtga tcactttctt cctactctat 720
 gccattttct ctctgtcttt tttcatatca gtttggacct ctgaaagggt ggaggaaaat 780
 ctaattattc tttcccaggt gatgggaatg gcttaccctt catgtcactc atgtgttctg 840
 attcttgaa acaagaagct gagacaggcc tctctgtcag tgctactgtg gctgaggtag 900
 atgttcaaag atggggagcc ctgaggtcac aaagaattta gagaatcatc ttga 954

<210> 6
 <211> 317
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 6

Met Gly Gly Val Ile Lys Ser Ile Phe Thr Phe Val Leu Ile Val Glu
 1 5 10 15

Phe Ile Ile Gly Asn Leu Gly Asn Ser Phe Ile Ala Leu Val Asn Cys
 20 25 30

Ile Asp Trp Val Lys Gly Arg Lys Ile Ser Ser Val Asp Arg Ile Leu
 35 40 45

Thr Ala Leu Ala Ile Ser Arg Ile Ser Leu Val Trp Leu Ile Phe Gly
 50 55 60

Ser Trp Cys Val Ser Val Phe Phe Pro Ala Leu Phe Ala Thr Glu Lys
 65 70 75 80

Met Phe Arg Met Leu Thr Asn Ile Trp Thr Val Ile Asn His Phe Ser
 85 90 95

Val Trp Leu Ala Thr Gly Leu Gly Thr Phe Tyr Phe Leu Lys Ile Ala
 100 105 110

Asn Phe Ser Asn Ser Ile Phe Leu Tyr Leu Lys Trp Arg Val Lys Lys
 115 120 125

Val Val Leu Val Leu Leu Leu Val Thr Ser Val Phe Leu Phe Leu Asn
 130 135 140

Ile Ala Leu Ile Asn Ile His Ile Asn Ala Ser Ile Asn Gly Tyr Arg
 145 150 155 160

Arg Asn Lys Thr Cys Ser Ser Asp Ser Ser Asn Phe Thr Arg Phe Ser
 165 170 175

Ser Leu Ile Val Leu Thr Ser Thr Val Phe Ile Phe Ile Pro Phe Thr
 180 185 190

Leu Ser Leu Ala Met Phe Leu Leu Leu Ile Phe Ser Met Trp Lys His
 195 200 205

Arg Lys Lys Met Gln His Thr Val Lys Ile Ser Gly Asp Ala Ser Thr
 210 215 220

Lys Ala His Arg Gly Val Lys Ser Val Ile Thr Phe Phe Leu Leu Tyr
 225 230 235 240

Ala Ile Phe Ser Leu Ser Phe Phe Ile Ser Val Trp Thr Ser Glu Arg
 245 250 255

Leu Glu Glu Asn Leu Ile Ile Leu Ser Gln Val Met Gly Met Ala Tyr
 260 265 270

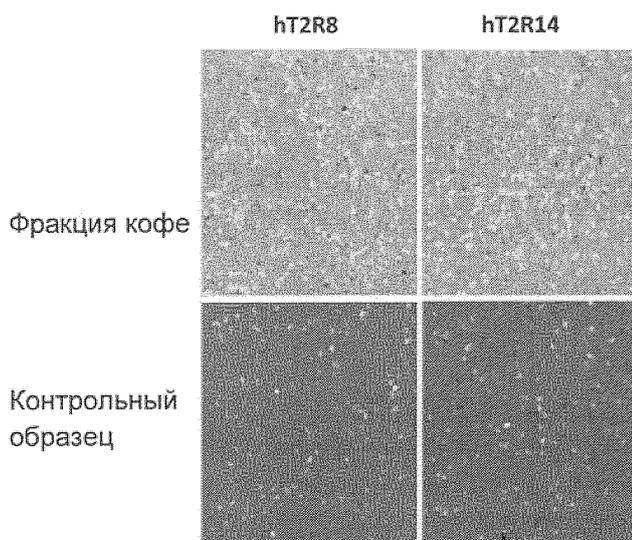
Pro Ser Cys His Ser Cys Val Leu Ile Leu Gly Asn Lys Lys Leu Arg
 275 280 285

Gln Ala Ser Leu Ser Val Leu Leu Trp Leu Arg Tyr Met Phe Lys Asp
 290 295 300

Gly Glu Pro Ser Gly His Lys Glu Phe Arg Glu Ser Ser
 305 310 315

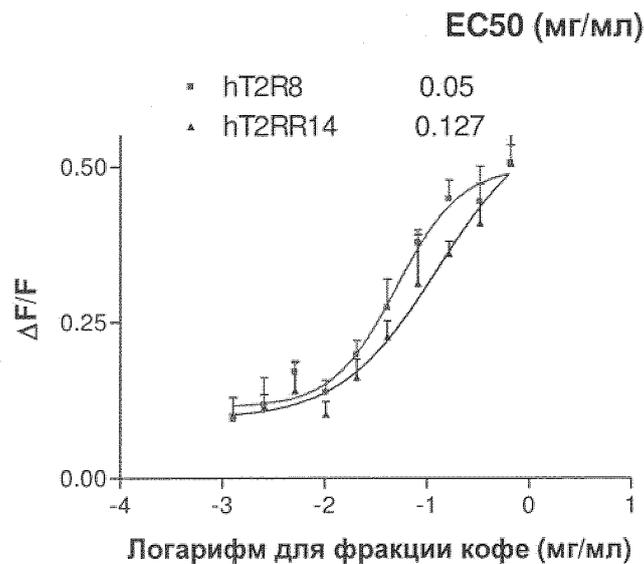
hT2R8 и hT2R14, активированные горькой фракцией кофе

[Фракция кофе] = 1 мг/мл
 Синий краситель = 1,9 мМ FD&C1



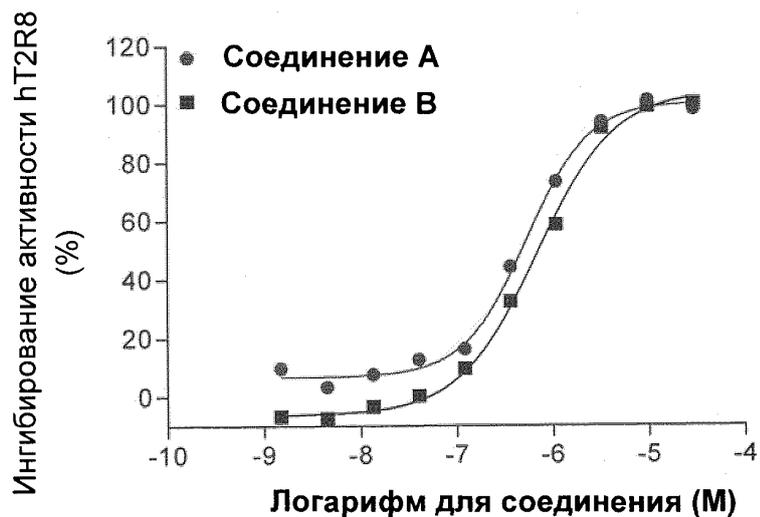
Фиг. 1

Дозозависимый ответ hT2R8 и hT2R14 на фракцию кофе



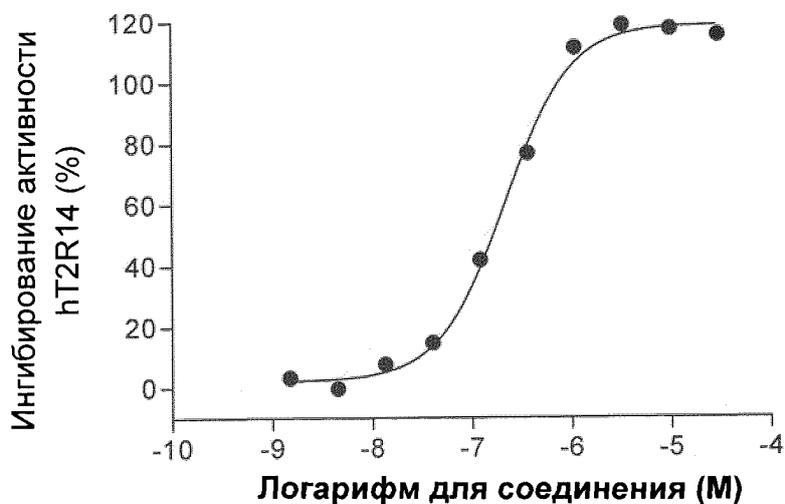
Фиг. 2

Кривые дозозависимого ингибирования для соединения А и В в стабильной клеточной линии hT2R8



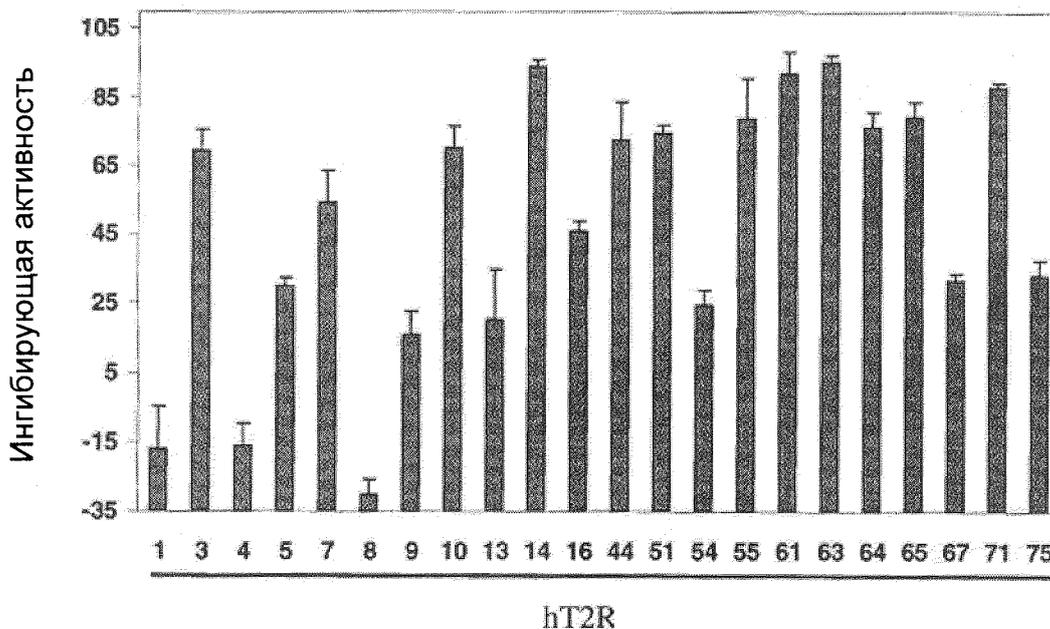
Фиг. 3

Кривые дозозависимого ингибирования для соединения С в стабильной клеточной линии hT2R14



Фиг. 4

Ингибирующая активность S5105 по отношению к 22 hT2R



Фиг. 5

