

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 545 121**

51 Int. Cl.:

**C07D 307/14** (2006.01)

**C07D 317/58** (2006.01)

**C07D 333/20** (2006.01)

**C07C 311/00** (2006.01)

**G01N 33/53** (2006.01)

**A61K 31/34** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **19.08.2008 E 12162534 (7)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **20.05.2015 EP 2487169**

54 Título: **Compuestos que inhiben (bloquean) el sabor amargo en composiciones, y uso de los mismos**

30 Prioridad:

**23.04.2008 US 47187 P**  
**21.08.2007 US 957129 P**

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:  
**08.09.2015**

73 Titular/es:

**SENOMYX, INC. (100.0%)**  
**4767 Nexus Centre Drive**  
**San Diego, CA 92121, US**

72 Inventor/es:

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

74 Agente/Representante:

**LEHMANN NOVO, María Isabel**

**ES 2 545 121 T3**

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín europeo de patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre concesión de Patentes Europeas).

**DESCRIPCIÓN**

Compuestos que inhiben (bloquean) el sabor amargo en composiciones, y uso de los mismos

**CAMPO DE LA INVENCION**

5 Esta solicitud describe la identificación de receptores gustativos de tipo 2 humanos (hT2Rs) y su uso en ensayos para la identificación de ligandos que activan T2Rs específicos. Estos ligandos son útiles para modular la percepción del sabor, particularmente el sabor amargo. En nuestras solicitudes de patentes previas, se describió la expresión funcional de receptores del sabor amargo humanos, incluyendo hT2R8 y hT2R14. En esta solicitud de patente, damos a conocer que hT2R8 y hT2R14 son activados por una fracción de café enriquecida en amargor, también damos a conocer la identificación de antagonistas para hT2R8 y hT2R14 utilizando un ensayo de identificación de alto rendimiento, y que las combinaciones de los antagonistas pueden reducir el sabor amargo del café y fracciones de café. Esta invención proporciona un método para modificar y mejorar el sabor de bebidas de café.

Específicamente, la presente solicitud describe el uso de hT2R8 y/o hT2R14 en ensayos de identificación y ensayos de sabor para identificar compuestos que inhiben (bloquean) el sabor amargo de café y otros alimentos y bebidas.

15 También, esta invención se refiere al descubrimiento de un ligando que tiene amplias propiedades antagonistas del amargor, es decir, bloquea o inhibe apreciablemente la activación de muchos (13) receptores del amargor diferentes mediante un conjunto diverso de ligandos amargos, y bloquea o inhibe la activación de otros seis receptores del sabor amargo, así como inhibe el amargor provocado por algunos compuestos amargos para los que el receptor o receptores del amargor con los que interactúan todavía no se han elucidado.

20 También más específicamente, la invención proporciona el descubrimiento de que este compuesto antagonista reduce el sabor amargo de salicina, un antagonista de hT2R16, y de feniltiourea, un agonista de hT2R51.

También más específicamente, esta invención proporciona el descubrimiento de que el mismo compuesto antagonista bloquea el sabor amargo provocado por compuestos amargos que activan múltiples receptores del sabor amargo, incluyendo omeprazol, que activa hT2R10, 14 y 75; rebaudiosida A, un edulcorante natural que activa al menos 7 receptores del sabor amargo; y que este mismo antagonista también inhibe además el sabor amargo provocado por compuestos amargos en los que el receptor o receptores del amargor con los que interactúan son desconocidos, incluyendo dextrometorfano y difenhidramina.

25 En base a ello, la invención se refiere al uso de este compuesto en alimentos, bebidas, medicamentos y otras sustancias ingeribles a fin de aliviar su sabor amargo, incluyendo el sabor amargo provocado por ligandos o compuestos amargos no identificados en los que el amargor implica la activación de múltiples receptores del amargor, o para compuestos amargos en los que su especificidad por el receptor no está determinada.

También, en base a ello, la invención se refiere al uso de este antagonista a fin de elucidar un motivo conservado presente en diferentes T2Rs humanos que está implicado en la unión al ligando y la activación de T2R, y al diseño de receptores acoplados a proteína G (GPCRs) quiméricos y mutados que se manipulan para que contengan este motivo.

35 Además, la invención se refiere a cualquiera de los compuestos identificados utilizando estos ensayos de identificación, y al uso de los mismos en alimentos, bebidas y medicamentos, incluyendo café y alimentos y bebidas con sabor a café, y medicamentos.

**DESCRIPCIÓN DE LA TÉCNICA RELACIONADA**

40 Una de las modalidades gustativas básicas que los seres humanos pueden reconocer es el amargor. Hasta hace muy poco, la fisiología del sabor amargo se comprendía muy poco. Estudios recientes han comenzado a arrojar luz sobre la biología del sabor (Lindemann, Nature (2001)). Ahora se sabe que muchos compuestos amargos producen sabor amargo interactuando con receptores de la superficie celular. Estos receptores pertenecen a la familia de receptores de siete dominios transmembránicos que interactúan con proteínas G intracelulares. Se ha identificado una nueva familia de GPCRs, denominada T2Rs, en seres humanos y roedores (Adler et al., Cell 100(6):693-702 (2000); Chandrashekar et al., Cell 100(6): 703-711 (2000); Matsunami H, Montmayeur J P, Buck L B. Nature 404(6778): 601-4 (2000)). Varias líneas de pruebas antes de la invención objeto sugieren que T2Rs median respuestas frente a compuestos amargos. En primer lugar, los genes T2R se expresan específicamente en un subconjunto de células receptoras del sabor de los epitelios de la lengua y del paladar. En segundo lugar, el gen para uno de los T2Rs humanos (hT2R1) está situado en un locus cromosómico que está ligado a la sensibilidad al compuesto amargo 6-n-propil-2-tiouracilo en seres humanos (Adler et al., (Id.) (2000)). En tercer lugar, uno de los T2Rs del ratón (mT2R5) está situado en un locus cromosómico que está ligado a la sensibilidad al compuesto amargo cicloheximida en ratones. También se mostró que mT2R5 puede activar gustducina, proteína G expresada específicamente en células gustativas y ligada a la transducción de estímulos amargos (Wong et al., Nature 381:796-800 (1996)). La activación de gustducina por mT2R5 se produce solamente en respuesta a cicloheximida (Chandrashekar et al., (Id.) (2000)). De este modo, se ha propuesto que la familia de mT2R media la respuesta del sabor amargo en ratones, mientras que la familia de hT2R media la respuesta del sabor amargo en seres humanos.

Se sugirió que solamente un T2R humano tiene ligando amargo identificado – se mostró que hT2R4 es activado por denatonio (Chandrashekar et al., (Id.) 2000). Sin embargo, las concentraciones de denatonio eficaces utilizadas en este estudio (1,5 mM) fueron inusualmente elevadas, es decir, fueron 10<sup>5</sup> veces mayores que el umbral del amargor dado a conocer para denatonio para seres humanos (Saroli, *Naturwissenschaften* 71:428-429 (1984)). De este modo, ningún ligando amargo específico se adecuó de forma convincente a ningún hT2R. También se ha sugerido que cada hT2R es capaz de unirse a múltiples ligandos amargos. Esta hipótesis se basa en el hecho de que la familia de hT2R consiste solamente en 25 miembros identificados, mientras que los seres humanos pueden reconocer centenares de compuestos diferentes como amargos. Se han dado a conocer previamente secuencias de hT2Rs, y se describen en las solicitudes PCT publicadas por Zuker et al. (documento WO 01/18050 A2, (2001)) y Adler et al. (documento WO 01/77676 A1 (2001)).

Una de las dificultades de estudiar la función de T2R es que estos receptores no son expresados fácilmente en estirpes celulares de mamíferos cultivadas. Para mejorar la expresión de T2R, se unió una secuencia N-terminal procedente del GPCR bien expresado, rodopsina, a secuencias de T2R (Chandrashekar et al., (Id.) 2000). Esta etiqueta N-terminal también permitió la monitorización fácil de la expresión proteica debido a anticuerpo disponible. Además, se ha utilizado la etiqueta SSTR3 (Bufe et al., *Nat. Genet.* 32:397-400 (2002)), una etiqueta N-terminal diferente, para mejorar la expresión de T2R. Mientras que la incorporación de la etiqueta de rodopsina mejoró la expresión de algunos T2Rs en estirpes celulares de mamíferos, muchos de ellos todavía no se expresaron suficientemente bien para los estudios funcionales. En un enfoque diferente, mT2R5 se expresó con éxito en células Sf9 de insectos, y se usó para estudios funcionales utilizando ensayo de unión a GTP $\gamma$ S bioquímico (Chandrashekar et al., (Id.) 2000).

En una solicitud de patente previa del solicitante, Solicitud de EE.UU. Ser. nº 09/825.882, ahora patente de EE.UU. nº 7.105.650, los solicitantes identificaron y proporcionaron las secuencias de ácidos nucleicos y secuencias polipeptídicas para un número de receptores gustativos humanos entonces novedosos, incluyendo hT2R51, hT2R54, hT2R55, hT2R61, hT2R63, hT2R64, hT2R65, hT2R67, hT2R71, y hT2R75. Adicionalmente, en la Solicitud de EE.UU. Ser. nº 11/182.942 y 10/628.464, los solicitantes proporcionaron la secuencia polipeptídica y de ADN de otro receptor gustativo humano nuevo identificado, denominado allí hT2R76.

También, en la Solicitud de EE.UU. Ser. nº 10/191.058, los solicitantes descubrieron ligandos que activan específicamente tres T2Rs humanos diferentes. Adicionalmente, los solicitantes presentaron recientemente la Solicitud de EE.UU. Ser. nº 11/455.693 (documento US 2007/0037212), que identificó adicionalmente ligandos amargos que se unen específicamente a otros T2Rs humanos, y proporcionaron ensayos relacionados.

También, con respecto a utilidades prácticas de la invención, se ha dado a conocer que ambos receptores gustativos T2Rs y T1Rs se expresan en el sistema gastrointestinal. Por ejemplo, Wu et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 99(4):2392-7(2002) dan a conocer que los T2Rs se expresan en células enteroendocrinas (células STC1) así como subunidades de gustducina y transducina, y que estas células probablemente responden a ligandos amargos en el tubo digestivo. También, se ha dado a conocer por Chen et al., *AM J. Physiol. Cell Physiol.* 291(4):C726-39 (2006) que estímulos gustativos amargos inducen la señalización de Ca<sup>++</sup> y la liberación de colecistoquinina (CCK) en células STC-1 enteroendocrinas. También, Rozengurt, *A J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 291(2):G171-7 (2006) dan a conocer que los receptores gustativos en el intestino probablemente desempeñan un papel en la detección molecular del control de las funciones digestivas, y rutas hormonales y/o neuronales, y que pueden desempeñar un papel en la detección de fármacos dañinos y respuestas de supervivencia. Además, Sternini *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol.* 292(2):G457-61 (2007) da a conocer que los receptores gustativos en el intestino pueden estar implicados en funciones gastrointestinales tales como la detección molecular, absorción de nutrientes, protección frente a sustancias dañinas, y sugiere además que una comprensión de estos mecanismos puede ser importante para estados mórbidos y afecciones tales como trastornos alimentarios, e inflamación. Además, se ha sugerido recientemente por Mace et al., *J Physiol.* 2007 (Epub) que T2Rs y T1Rs activan fosfolipasa C beta 2, PLC beta 2, y que probablemente hay un sistema de detección intestinal molecular en el intestino similar al que está presente en células linguales, y que las células gastrointestinales tales como las células en cepillo o células quimiosensoriales solitarias que expresan receptores gustativos pueden dar como resultado aumento de GLUT2 y pueden desempeñar un papel en la detección de nutrientes, y nutrición en el tratamiento de obesidad y diabetes. También, Cui et al, *Curr Pharm Des.* 12(35):4591-600 (2006) sugieren que T1Rs expresados en el intestino se pueden utilizar para compuestos en el tratamiento de obesidad y diabetes, así como edulcorantes artificiales.

Sin embargo, a pesar de lo que se ha dado a conocer y la comprensión de que los miembros de T2R regulan el sabor amargo, y su posible papel en funciones gastrointestinales, existe la necesidad de identificar ligandos específicos que activan receptores T2R del sabor amargo humanos. Una mayor comprensión de las propiedades de unión de diferentes T2Rs, particularmente T2Rs humanos, sería muy beneficiosa ya que facilitará enormemente su uso en la selección de compuestos que tienen propiedades moduladoras del gusto deseadas, es decir, que bloquean o inhiben el sabor de compuestos amargos específicos. También, proporcionará la identificación de compuestos para tratar y modular funciones gastrointestinales y enfermedades relacionadas tales como obesidad, diabetes, absorción de alimentos, detección de alimentos, trastornos alimentarios, y en la regulación de hormonas y péptidos relacionados tales como GLUT2, colecistoquinina y otros.

SUMARIO DE LA INVENCION

Para ese fin, la presente invención se refiere al descubrimiento de que hT2R8 y hT2R14 son activados por una fracción de café enriquecida en amargor.

También, la presente invención se refiere a su uso para la identificación de antagonistas para hT2R8 y hT2R14 que inhiben o bloquean el sabor amargo de café y alimentos y bebidas relacionados con el café, y medicamentos.

- 5 Además, la invención se refiere a compuestos agonistas específicos (bloqueadores del amargor) que inhiben el sabor amargo de café y otros alimentos y bebidas con sabor a café, y medicamentos.

10 También, esta invención se refiere al descubrimiento de un ligando que tiene propiedades antagonistas del amargor más amplias, es decir, bloquea o inhibe apreciablemente la activación de muchos (13) receptores del amargor diferentes mediante un conjunto diverso de ligandos amargos, y bloquea o inhibe la activación de otros seis receptores gustativos, así como inhibe el amargor provocado por algunos compuestos amargos para los que el receptor o receptores del amargor con los que interactúan no se han elucidado todavía.

También más específicamente, la invención proporciona el descubrimiento de que este compuesto antagonista reduce el sabor amargo de salicina, un antagonista de hT2R16 y feniltiourea, un antagonista de hT2R51.

15 También más específicamente, esta invención proporciona el descubrimiento de que el mismo compuesto antagonista bloquea el sabor amargo provocado por compuestos amargos que activan múltiples receptores del sabor amargo, incluyendo omeprazol, un compuesto que activa hT2R10, 14 y 75; rebaudiosida A, un edulcorante natural que activa al menos 7 receptores del sabor amargo; y que este mismo compuesto antagonista también inhibe adicionalmente el sabor amargo provocado por compuestos amargos en el que el receptor o receptores amargos con los que interaccionan son desconocidos, incluyendo dextrometorfano y difenhidramina.

20 Basándose en ello, la invención se refiere al uso de este compuesto y compuestos relacionados según la invención en alimentos, bebidas, medicamentos y otras sustancias ingeribles a fin de aliviar su sabor amargo, incluyendo el sabor amargo provocado por ligandos o compuestos amargos sin identificar en los que el amargor implica la activación de múltiples receptores del amargor, o compuestos amargos en los que su especificidad por el receptor no está determinada.

25 También, la presente invención se refiere a alimentos, bebidas y medicamentos que contienen una cantidad de al menos uno de los compuestos antagonistas amargos identificados, suficiente para inhibir o bloquear su sabor amargo.

30 Los descubrimientos inventivos se realizaron utilizando ensayos basados en células que midieron la actividad de T2Rs utilizando células que expresan un T2R particular en presencia y ausencia de ligandos amargos específicos. En particular, como se describe con mayor detalle más abajo, estirpes celulares HEK, que expresan sobre su superficie los T2Rs específicos identificados anteriormente, y que expresaron además una proteína G quimérica que se acopla funcionalmente a dichos T2Rs, se utilizaron en ensayos basados en células que detectaron cambios en concentraciones de calcio intracelular, y se encontró que eran activados específicamente por compuestos amargos específicos, mientras que otros hT2Rs no se activaron en condiciones similares.

35 Por lo tanto, la solicitud describe el uso de estos receptores gustativos humanos en ensayos, preferiblemente ensayos de alto rendimiento, para identificar otros compuestos que modulan, preferiblemente bloquean, la activación de estos receptores por estos y otros compuestos amargos presentes en café y alimentos y bebidas relacionados.

También, la solicitud describe el uso de estos receptores para identificar compuestos, particularmente aquellos presentes en café y alimentos y bebidas con sabor a café, y medicamentos, que provocan un sabor amargo.

40 También, la solicitud describe el uso de un compuesto antagonista que posee propiedades antagonistas de amplio intervalo para uso en ensayos in vitro y pruebas de sabor in vivo para identificar compuesto o compuestos amargos o fracciones amargas para las que este compuesto inhibe el sabor amargo provocado de ese modo, y/o inhibe la activación de uno o más receptores del sabor amargo por el compuesto amargo o una fracción que contiene este compuesto amargo.

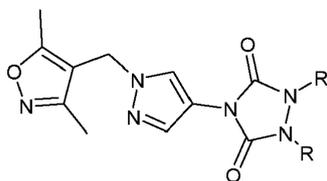
45 Además, la invención se refiere específicamente al uso de este antagonista de amplio alcance en alimentos, bebidas, medicamentos y otros productos consumidos para ingestión por seres humanos o animales, en los que el sabor amargo se alivia de forma deseable.

50 La solicitud describe ensayos que incluyen una etapa adicional que evalúa el efecto de los compuestos moduladores identificados en pruebas de sabor en seres humanos y otras pruebas de sabor, y particularmente evalúa el efecto de los compuestos identificados sobre el sabor amargo, especialmente el sabor amargo provocado por café y fracciones derivadas del café que contienen uno o más compuestos que provocan una percepción de sabor amargo.

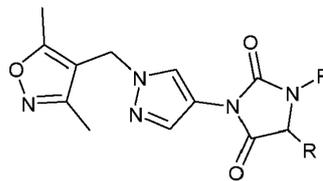
Además, la invención abarca la producción de café y alimentos y bebidas con sabor a café, y medicamentos, que se han tratado para eliminar compuestos que activan específicamente estos receptores del sabor amargo, por ejemplo alimentos y bebidas que se han procesado para eliminar o reducir la cantidad de compuestos amargos

comprendidos en ellos.

En algunos aspectos, la invención también se refiere a las clases estructurales de compuestos representados por los dos armazones dados a continuación. El armazón 1 muestra un armazón de urazol representativo, y el armazón 2 muestra un armazón de hidantoína representativo.



Armazón 1



Armazón 2

5

Es otro objeto específico de la invención el uso de compuestos mostrados más arriba y análogos del armazón 1 y del armazón 2 como bloqueadores del amargor para reducir el amargor en aplicaciones alimentarias/farmacéuticas que están mediadas por receptores T2R8, especialmente café y alimentos y bebidas con sabor a café, y medicamentos.

10

Es otro objeto de la invención confirmar que los compuestos identificados modulan, preferiblemente inhiben o bloquean, el sabor amargo, por ejemplo que es provocado por el café y productos y alimentos con sabor a café, y medicamentos, en pruebas de sabor en seres humanos o en animales, preferiblemente pruebas de sabor en seres humanos. El Ejemplo 1 muestra datos sensoriales representativos para uno de estos compuestos. Los datos demuestran claramente una disminución significativa en el amargor para un agonista de T2R8 específico, y un aumento significativo en la potencia con respecto a un bloqueador del amargor de T2R8 conocido.

15

Es otro objeto de la invención utilizar compuestos descritos en la presente memoria como aditivos o moduladores del sabor en composiciones a fin de inhibir o bloquear el sabor amargo provocado por compuestos que activan específicamente estos receptores gustativos. Un objeto preferido de la invención es el uso de un compuesto que inhibe la activación de receptores T2R8 a fin de bloquear el sabor amargo de compuestos presentes en café y alimentos y bebidas con sabor a café, y medicamentos.

20

Los compuestos identificados en la presente memoria se pueden añadir a alimentos, bebidas, composiciones cosméticas o medicinales para modular, preferiblemente bloquear el sabor amargo accionado por la activación de hT2R8 por compuestos amargos presentes en el café y alimentos y bebidas relacionados, y medicamentos, o compuestos estructuralmente relacionados u otros compuestos amargos, por ejemplo en compuestos encontrados en alimentos y bebidas o medicamentos o cosméticos que provocan una percepción de sabor amargo.

25

#### OBJETOS DE LA INVENCION

La solicitud describe ensayos que utilizan hT2R8 y/o hT2R14 y sus quimeras y variantes que identifican compuestos y composiciones que provocan o bloquean el sabor amargo asociado con café y alimentos y bebidas con sabor a café, y medicamentos.

30

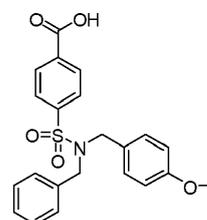
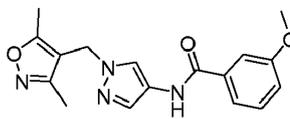
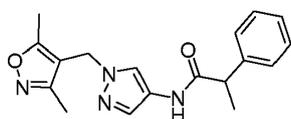
La solicitud describe específicamente ensayos que identifican compuestos que activan o que bloquean o modulan la activación y/o unión de hT2R8 a compuestos o composiciones responsables del sabor amargo del café.

También se describen ensayos que identifican compuestos que actúan o que bloquean o modulan la activación y/o unión de hT2R14 a compuestos o composiciones responsables del sabor amargo del café.

35

Es un objeto de la invención proporcionar los compuestos específicos identificados utilizando los ensayos de la invención, y composiciones que contienen especialmente café y alimentos y bebidas con sabor a café, y medicamentos.

Es un objeto específico de la invención proporcionar los compuestos mostrados a continuación que son antagonistas de T2R8 y T2R14, que se ha mostrado que bloquean el amargor del café.



40

Compuesto A

IC<sub>50</sub> = 0,3 uM (hT2R08)

Compuesto B

IC<sub>50</sub> = 0,4 uM (hT2R08)

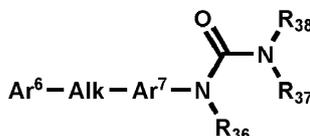
Compuesto C

IC<sub>50</sub> = 0,2 uM (hT2R14)

5 La solicitud describe el uso de los compuestos de referencia mostrados más arriba y análogos del Compuesto A, Compuesto B y Compuesto C como bloqueadores del amargor para reducir el amargor en aplicación alimentaria/farmacéutica que está mediado por receptores T2R8 y/o T2R14, especialmente café y alimentos y bebidas con sabor a café, y medicamentos.

10 La solicitud también describe el uso del Compuesto C y sus análogos como bloqueadores del amargor de amplio alcance para reducir el amargor en aplicación alimentaria/farmacéutica que está mediado por cualquiera de T2R3, 7, 10, 14, 16, 44, 51, 55, 61, 63, 64, 65, o 71 humano y/o T2R5, 9, 13, 54, 67 o 75 humano, especialmente en alimentos, bebidas y medicamentos que contienen múltiples compuestos amargos, compuestos amargos que interaccionan con múltiples receptores del sabor amargo, o composiciones que contienen compuestos amargos desconocidos o compuestos amargos en los que su especificidad por el receptor es desconocida.

Se describe en la presente memoria un compuesto de la fórmula:



o una sal, hidrato, solvato, N-óxido o profármaco del mismo,

en la que Ar<sup>6</sup> y Ar<sup>7</sup> son, iguales o diferentes independientemente entre sí, un grupo arilo de cinco o seis miembros o un grupo heteroarilo de cinco o seis miembros;

Alk es un grupo alquilo, opcionalmente interrumpido por un heteroátomo;

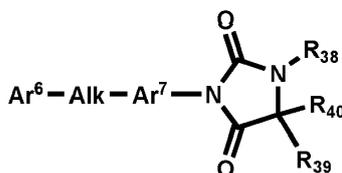
20 R<sub>36</sub> y R<sub>37</sub> son, iguales o diferentes independientemente entre sí, H, alquilo, o, R<sub>36</sub> y R<sub>37</sub>, junto con los átomos a los que están unidos, forman un heterociclo de cinco o seis miembros opcionalmente sustituido; y

25 R<sub>38</sub> es H, alquilo sustituido o no sustituido, cicloalquilalquilo sustituido o no sustituido, heterocicloalquilalquilo sustituido o no sustituido, arilo sustituido o no sustituido, arilamidoalquilo sustituido o no sustituido, heteroarilamidoalquilo sustituido o no sustituido, arilalquilo sustituido o no sustituido, arilalcoxi sustituido o no sustituido, heteroarilo sustituido o no sustituido, heteroarilalquilo sustituido o no sustituido, o haloalquilo.

En un aspecto, los compuestos descritos contienen un heterociclo de cinco miembros.

En una realización, el heterociclo de cinco miembros es una hidantoína o una urea cíclica sustituida o no sustituida.

En una realización, la hidantoína es una hidantoína de fórmula:



o una sal, hidrato, solvato, N-óxido o profármaco de la misma,

en la que Ar<sup>6</sup> y Ar<sup>7</sup> son, iguales o diferentes independientemente entre sí, un grupo arilo de cinco o seis miembros o un grupo heteroarilo de cinco o seis miembros;

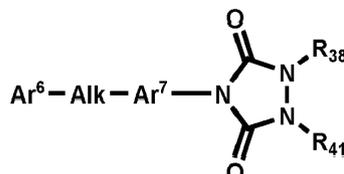
Alk es un grupo alquilo, opcionalmente interrumpido por un heteroátomo;

35 R<sub>38</sub> es H, alquilo sustituido o no sustituido, cicloalquilalquilo sustituido o no sustituido, heterocicloalquilalquilo sustituido o no sustituido, arilo sustituido o no sustituido, arilamidoalquilo sustituido o no sustituido, heteroarilamidoalquilo sustituido o no sustituido, arilalquilo sustituido o no sustituido, arilalcoxi sustituido o no sustituido, heteroarilo sustituido o no sustituido, heteroarilalquilo sustituido o no sustituido, o haloalquilo; y

40 R<sub>39</sub> y R<sub>40</sub> son, iguales o diferentes independientemente entre sí, H, alquilo sustituido o no sustituido, cicloalquilalquilo sustituido o no sustituido, heterocicloalquilalquilo sustituido o no sustituido, arilo sustituido o no sustituido, arilamidoalquilo sustituido o no sustituido, arilalquilamidoalquilo sustituido o no sustituido, heteroarilamidoalquilo

sustituido o no sustituido, heteroarilalquilamidoalquilo sustituido o no sustituido, arilalquilo sustituido o no sustituido, arilalcoxi sustituido o no sustituido, heteroarilo sustituido o no sustituido, heteroarilalquilo sustituido o no sustituido, haloalquilo, o R<sub>39</sub> y R<sub>40</sub>, junto con el átomo de carbono al que están unidos, forman un grupo C=O o un grupo alqueno sustituido o no sustituido.

- 5 También se describen compuestos que contienen un heterociclo de cinco miembros que es un urazol. En una realización, el urazol es un urazol de la fórmula:



o una sal, hidrato, solvato, N-óxido o profármaco del mismo,

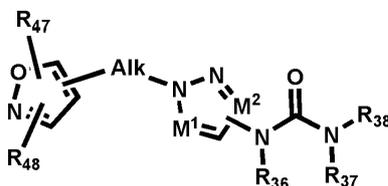
- 10 en la que Ar<sup>6</sup> y Ar<sup>7</sup> son, iguales o diferentes independientemente entre sí, un grupo arilo de cinco o seis miembros o un grupo heteroarilo de cinco o seis miembros;

Alk es un grupo alquilo, opcionalmente interrumpido por un heteroátomo;

- 15 R<sub>38</sub> es H, alquilo sustituido o no sustituido, cicloalquilalquilo sustituido o no sustituido, heterocicloalquilalquilo sustituido o no sustituido, arilo sustituido o no sustituido, arilamidoalquilo sustituido o no sustituido, arilalquilamidoalquilo sustituido o no sustituido, arilalquilo sustituido o no sustituido, arilalcoxi sustituido o no sustituido, heteroarilo sustituido o no sustituido, heteroarilalquilo sustituido o no sustituido, o haloalquilo; y

- 20 R<sub>41</sub> es H, alquilo sustituido o no sustituido, cicloalquilalquilo sustituido o no sustituido, heterocicloalquilalquilo sustituido o no sustituido, arilo sustituido o no sustituido, arilamidoalquilo sustituido o no sustituido, arilalquilamidoalquilo sustituido o no sustituido, heteroarilamidoalquilo sustituido o no sustituido, heteroarilalquilamidoalquilo sustituido o no sustituido, arilalquilo sustituido o no sustituido, arilalcoxi sustituido o no sustituido, heteroarilo sustituido o no sustituido, heteroarilalquilo sustituido o no sustituido, o haloalquilo.

La invención se refiere a un compuesto de la fórmula:



o una sal o N-óxido del mismo, en la que Alk es un grupo alquilo;

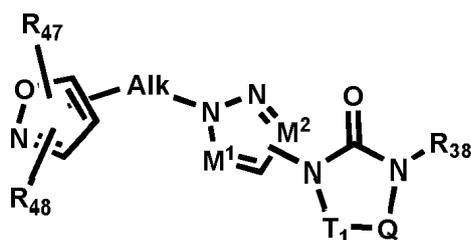
- 25 M<sup>1</sup> es N o CR<sub>49</sub>, en el que R<sub>49</sub> es H o alquilo sustituido o no sustituido;  
M<sup>2</sup> es N o CR<sub>50</sub>, en el que R<sub>50</sub> es H o alquilo sustituido o no sustituido;

R<sub>36</sub> y R<sub>37</sub>, junto con los átomos a los que están unidos, forman un heterociclo de cinco o seis miembros opcionalmente sustituido; y

- 30 R<sub>38</sub> es H, alquilo sustituido o no sustituido, cicloalquilalquilo sustituido o no sustituido, heterocicloalquilalquilo sustituido o no sustituido, arilo sustituido o no sustituido, arilamidoalquilo sustituido o no sustituido, heteroarilamidoalquilo sustituido o no sustituido, arilalquilo sustituido o no sustituido, arilalcoxi sustituido o no sustituido, heteroarilo sustituido o no sustituido, heteroarilalquilo sustituido o no sustituido, o haloalquilo;

R<sub>47</sub> es H, alquilo sustituido o no sustituido, alcoxi sustituido o no sustituido, arilo sustituido o no sustituido, arilalquilo sustituido o no sustituido, o halo; y R<sub>48</sub> es H, alquilo sustituido o no sustituido, alcoxi sustituido o no sustituido, arilo sustituido o no sustituido, arilalquilo sustituido o no sustituido, o halo.

- 35 En otro aspecto, la invención se refiere a un compuesto de la fórmula:



o una sal o N-óxido del mismo, en la que Alk es un grupo alquilo;

5 T<sub>1</sub> es C=O y Q es CR<sub>51</sub>R<sub>52</sub> o NR<sub>51</sub>, en los que R<sub>51</sub> y R<sub>52</sub> son, iguales o diferentes independientemente entre sí, H, alquilo sustituido o no sustituido, cicloalquilalquilo sustituido o no sustituido, heterocicloalquilalquilo sustituido o no sustituido, arilo sustituido o no sustituido, arilamidoalquilo sustituido o no sustituido, arilalquilamidoalquilo sustituido o no sustituido, heteroarilamidoalquilo sustituido o no sustituido, heteroarilalquilamidoalquilo sustituido o no sustituido, arilalquilo sustituido o no sustituido, arilalcoxi sustituido o no sustituido, heteroarilo sustituido o no sustituido, heteroarilalquilo sustituido o no sustituido, haloalquilo, o R<sub>51</sub> y R<sub>52</sub>, junto con el átomo de carbono al que están unidos, forman un grupo C=O o un grupo alqueno sustituido o no sustituido;

10 M<sup>1</sup> es N o CR<sub>49</sub>, en el que R<sub>49</sub> es H o alquilo sustituido o no sustituido;

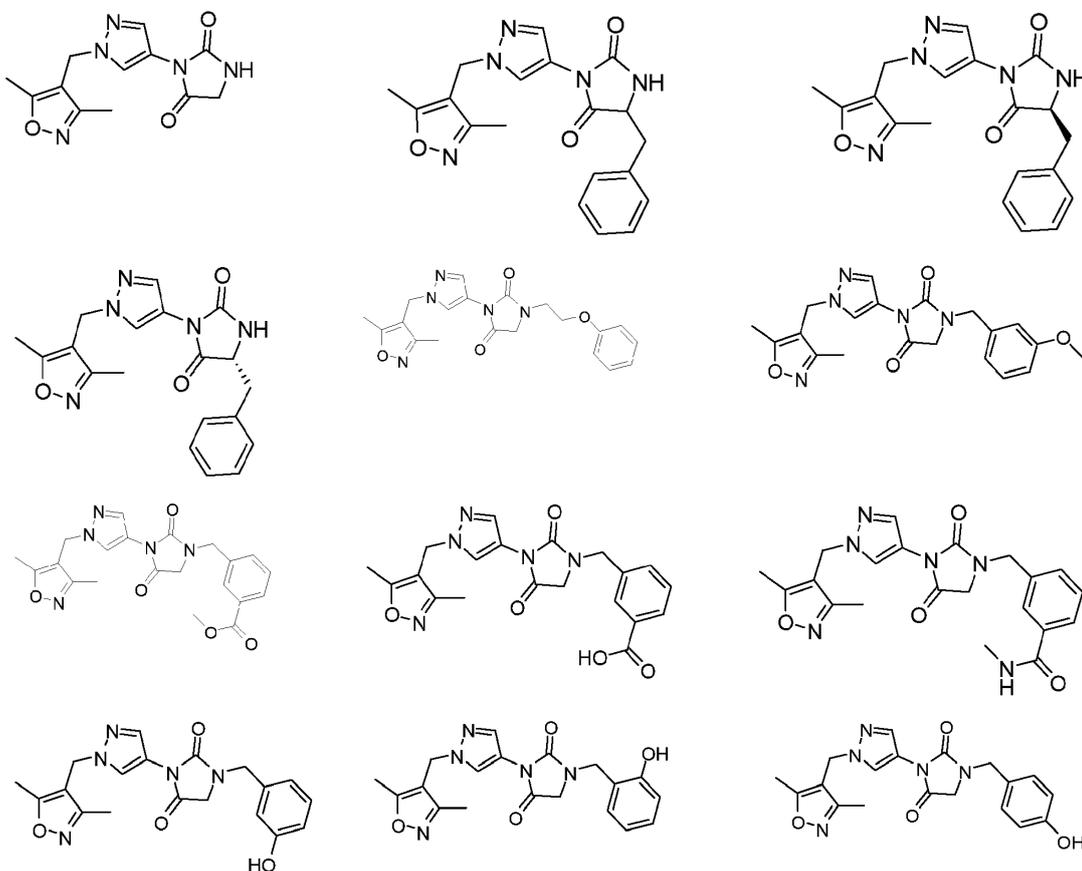
M<sup>2</sup> es N o CR<sub>50</sub>, en el que R<sub>50</sub> es H o alquilo sustituido o no sustituido;

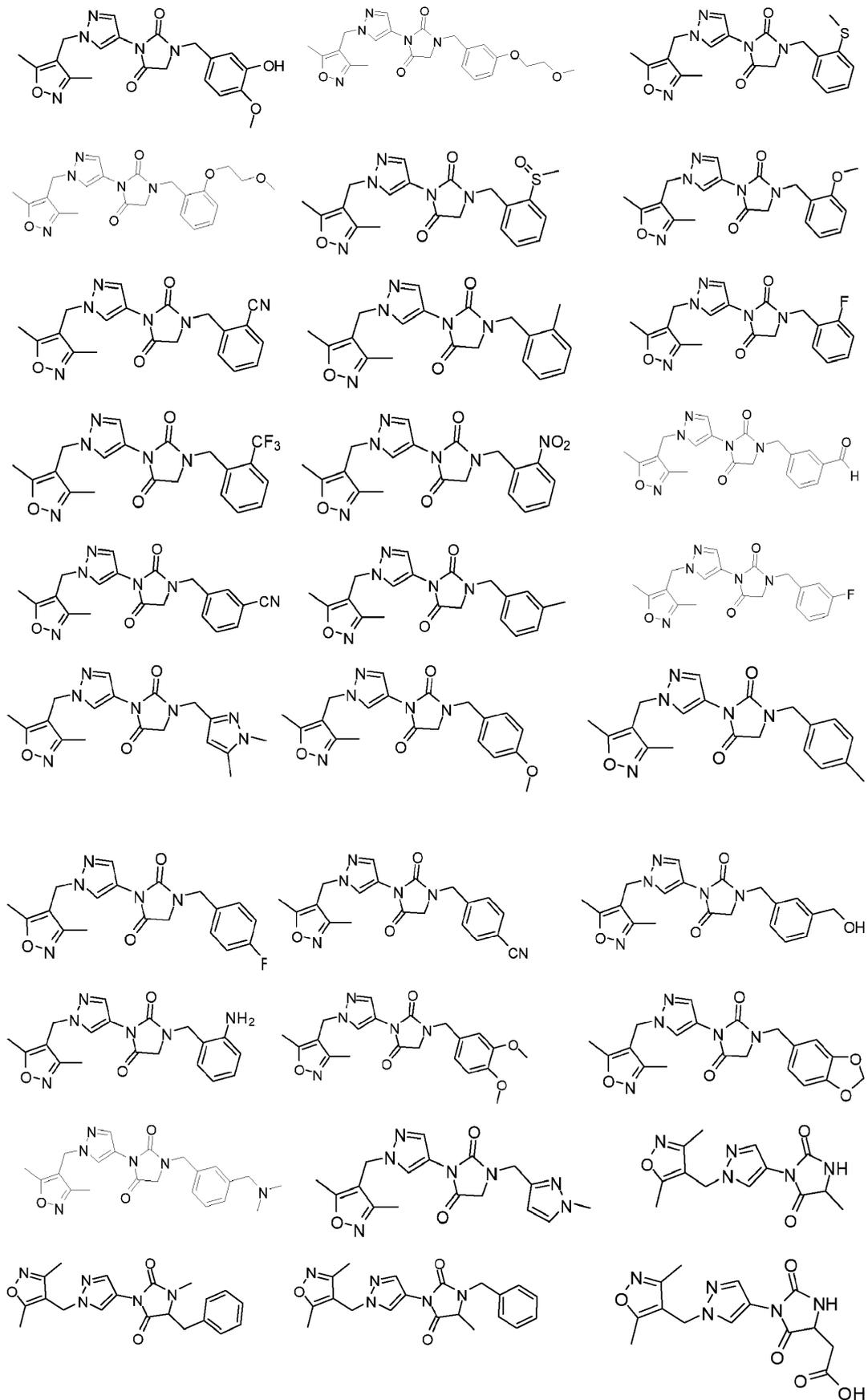
15 R<sub>38</sub> es H, alquilo sustituido o no sustituido, cicloalquilalquilo sustituido o no sustituido, heterocicloalquilalquilo sustituido o no sustituido, arilo sustituido o no sustituido, arilamidoalquilo sustituido o no sustituido, heteroarilamidoalquilo sustituido o no sustituido, arilalquilo sustituido o no sustituido, arilalcoxi sustituido o no sustituido, heteroarilo sustituido o no sustituido, heteroarilalquilo sustituido o no sustituido, o haloalquilo;

R<sub>47</sub> es H, alquilo sustituido o no sustituido, alcoxi sustituido o no sustituido, arilo sustituido o no sustituido, arilalquilo sustituido o no sustituido, o halo; y R<sub>48</sub> es H, alquilo sustituido o no sustituido, alcoxi sustituido o no sustituido, arilo sustituido o no sustituido, arilalquilo sustituido o no sustituido, o halo.

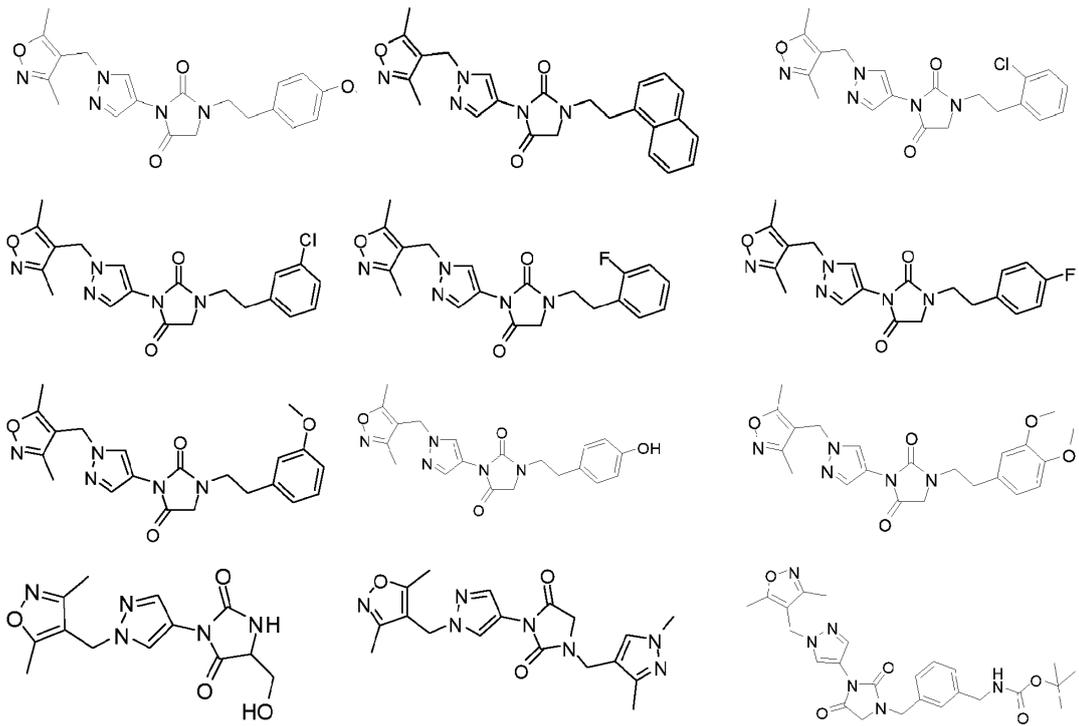
En otra realización, la invención se refiere a un compuesto de la fórmula:

20



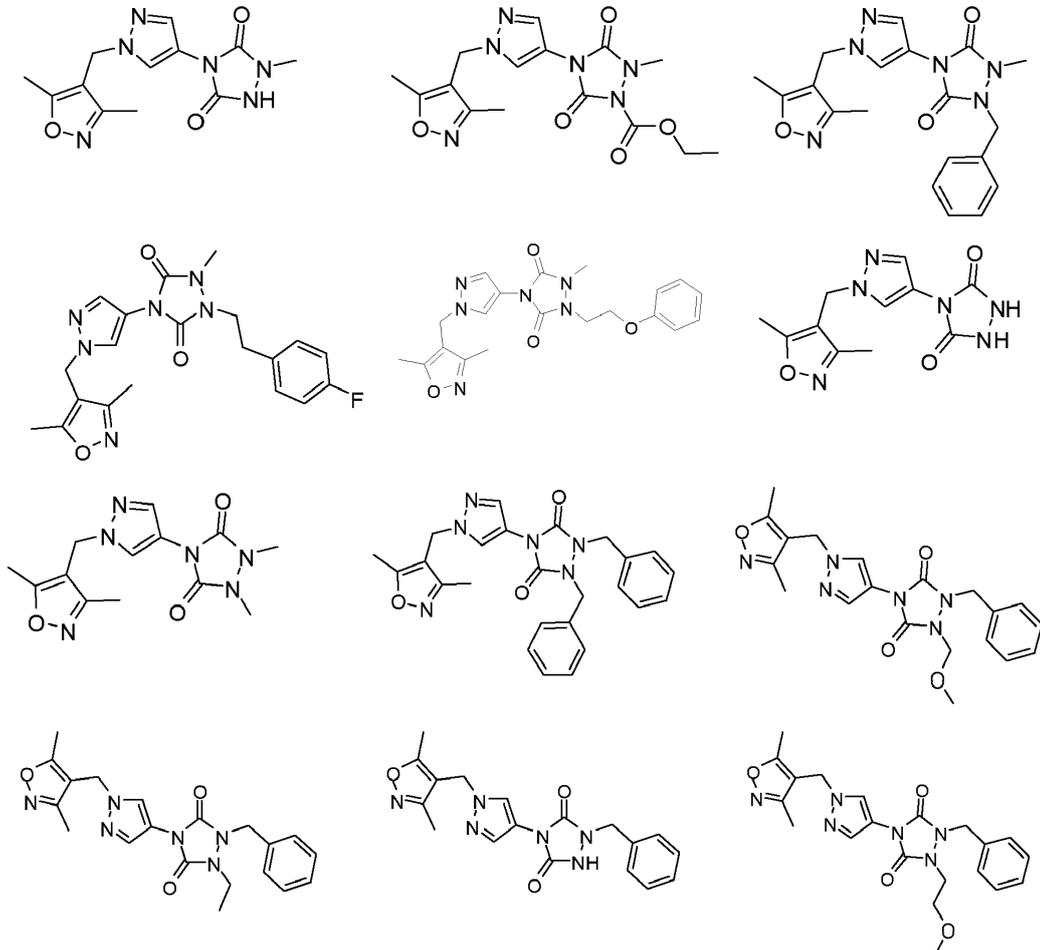


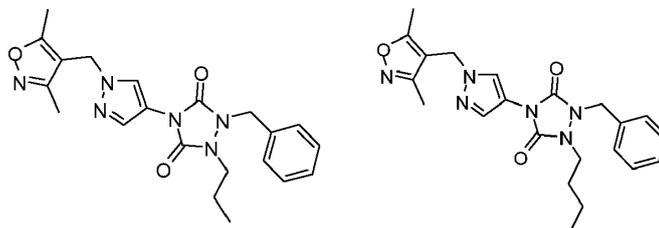




o una sal o N-óxido del mismo.

En otro aspecto, la invención se refiere a un compuesto de la fórmula:

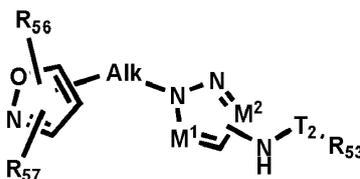




o una sal o N-óxido del mismo.

También se describe un método para obtener un compuesto de la fórmula:

5



o una sal, hidrato, solvato, N-óxido o profármaco del mismo,

en la que Alk es un grupo alquilo, opcionalmente interrumpido por un heteroátomo;

T<sub>2</sub> es C=S, C=O, o S(O)<sub>2</sub>;

10

R<sub>53</sub> es alquilo sustituido o no sustituido, cicloalquilo sustituido o no sustituido, heteroarilo sustituido o no sustituido, arilo sustituido o no sustituido, o aralquilo sustituido o no sustituido;

M<sup>1</sup> es N o CR<sub>54</sub>, en el que R<sub>54</sub> es H o alquilo sustituido o no sustituido;

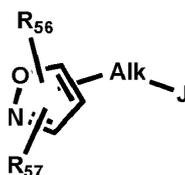
M<sup>2</sup> es N o CR<sub>55</sub>, en el que R<sub>55</sub> es H o alquilo sustituido o no sustituido;

R<sub>56</sub> es H, alquilo sustituido o no sustituido, alcoxi sustituido o no sustituido, arilo sustituido o no sustituido, arilalquilo sustituido o no sustituido, o halo; y

15

R<sub>57</sub> es H, alquilo sustituido o no sustituido, alcoxi sustituido o no sustituido, arilo sustituido o no sustituido, arilalquilo sustituido o no sustituido, o halo;

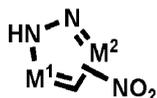
en el que el método comprende hacer reaccionar un compuesto de la fórmula:



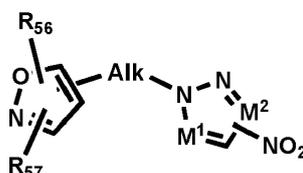
en la que R<sub>56</sub>, R<sub>57</sub>, y Alk se definen anteriormente, y J es un grupo saliente;

20

con un compuesto de la fórmula:

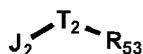


en la que M<sup>1</sup> y M<sup>2</sup> se definen anteriormente, para dar un compuesto de la fórmula



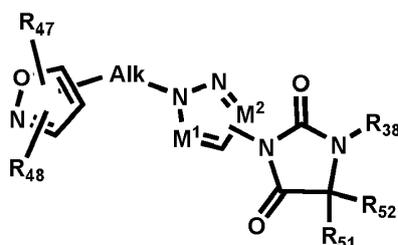
que tiene un grupo NO<sub>2</sub>;

reducir el grupo NO<sub>2</sub> para dar un compuesto que tiene un grupo NH<sub>2</sub>; y hacer reaccionar el compuesto que tiene un grupo NH<sub>2</sub> con un compuesto de la fórmula



en la que J<sub>2</sub> es un grupo saliente y T<sub>2</sub> y R<sub>53</sub> se definen anteriormente.

5 En aún otro aspecto, la invención se refiere a un método para obtener un compuesto de la fórmula:



o una sal o N-óxido del mismo, en la que Alk es un grupo alquilo, opcionalmente interrumpido por un heteroátomo;

10 R<sub>51</sub> y R<sub>52</sub> son, iguales o diferentes independientemente entre sí, H, alquilo sustituido o no sustituido, cicloalquilalquilo sustituido o no sustituido, heterocicloalquilalquilo sustituido o no sustituido, arilo sustituido o no sustituido, arilamidoalquilo sustituido o no sustituido, arilalquilamidoalquilo sustituido o no sustituido, heteroarilamidoalquilo sustituido o no sustituido, heteroarilalquilamidoalquilo sustituido o no sustituido, arilalquilo sustituido o no sustituido, arilalcoxi sustituido o no sustituido, heteroarilo sustituido o no sustituido, heteroarilalquilo sustituido o no sustituido, haloalquilo, o R<sub>51</sub> y R<sub>52</sub>, junto con el átomo de carbono al que están unidos, forman un grupo alqueno sustituido o no sustituido;

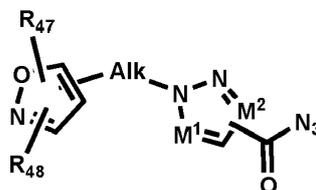
15 M<sup>1</sup> es N o CR<sub>49</sub>, en el que R<sub>49</sub> es H o alquilo sustituido o no sustituido;

M<sup>2</sup> es N o CR<sub>50</sub>, en el que R<sub>50</sub> es H o alquilo sustituido o no sustituido;

20 R<sub>38</sub> es H, alquilo sustituido o no sustituido, cicloalquilalquilo sustituido o no sustituido, heterocicloalquilalquilo sustituido o no sustituido, arilo sustituido o no sustituido, arilamidoalquilo sustituido o no sustituido, heteroarilamidoalquilo sustituido o no sustituido, arilalquilo sustituido o no sustituido, arilalcoxi sustituido o no sustituido, heteroarilo sustituido o no sustituido, heteroarilalquilo sustituido o no sustituido, o haloalquilo;

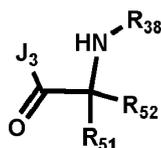
R<sub>47</sub> es H, alquilo sustituido o no sustituido, alcoxi sustituido o no sustituido, arilo sustituido o no sustituido, arilalquilo sustituido o no sustituido, o halo; y

R<sub>48</sub> es H, alquilo sustituido o no sustituido, alcoxi sustituido o no sustituido, arilo sustituido o no sustituido, arilalquilo sustituido o no sustituido, o halo; en el que el método comprende calentar un compuesto de la fórmula:



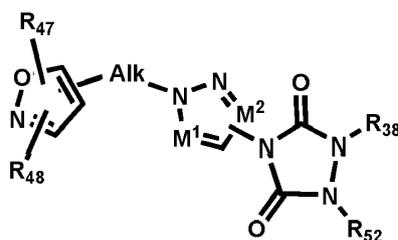
25 en la que R<sub>47</sub>, R<sub>48</sub>, Alk, M<sup>1</sup>, y M<sup>2</sup> se definen anteriormente;

para convertir el grupo -CON<sub>3</sub> en un grupo -N=C=O, y después hacer reaccionar con un compuesto de la fórmula:



en la que J<sub>3</sub> es un grupo saliente y R<sub>38</sub>, R<sub>51</sub>, y R<sub>52</sub> se definen anteriormente.

30 También se describe un método para obtener un compuesto de la fórmula:



o una sal, hidrato, solvato, N-óxido o profármaco del mismo,

en la que Alk es un grupo alquilo, opcionalmente interrumpido por un heteroátomo;

- 5  $R_{52}$  es H, alquilo sustituido o no sustituido, cicloalquilalquilo sustituido o no sustituido, heterocicloalquilalquilo sustituido o no sustituido, arilo sustituido o no sustituido, arilamidoalquilo sustituido o no sustituido, arilalquilamidoalquilo sustituido o no sustituido, heteroarilamidoalquilo sustituido o no sustituido, heteroarilalquilamidoalquilo sustituido o no sustituido, arilalquilo sustituido o no sustituido, arilalcoxi sustituido o no sustituido, heteroarilo sustituido o no sustituido, heteroarilalquilo sustituido o no sustituido, haloalquilo;

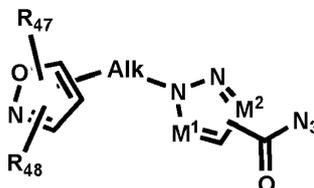
$M^1$  es N o  $CR_{49}$ , en el que  $R_{49}$  es H o alquilo sustituido o no sustituido;

- 10  $M^2$  es N o  $CR_{50}$ , en el que  $R_{50}$  es H o alquilo sustituido o no sustituido;

$R_{38}$  es H, alquilo sustituido o no sustituido, cicloalquilalquilo sustituido o no sustituido, heterocicloalquilalquilo sustituido o no sustituido, arilo sustituido o no sustituido, arilamidoalquilo sustituido o no sustituido, heteroarilamidoalquilo sustituido o no sustituido, arilalquilo sustituido o no sustituido, arilalcoxi sustituido o no sustituido, heteroarilo sustituido o no sustituido, heteroarilalquilo sustituido o no sustituido, o haloalquilo;

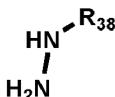
- 15  $R_{47}$  es H, alquilo sustituido o no sustituido, alcoxi sustituido o no sustituido, arilo sustituido o no sustituido, arilalquilo sustituido o no sustituido, o halo; y  $R_{48}$  es H, alquilo sustituido o no sustituido, alcoxi sustituido o no sustituido, arilo sustituido o no sustituido, arilalquilo sustituido o no sustituido, o halo;

en el que el método comprende calentar un compuesto de la fórmula:



- 20 en la que  $R_{47}$ ,  $R_{48}$ , Alk,  $M^1$ , y  $M^2$  se definen anteriormente;

para convertir el grupo  $-CON_3$  en un grupo  $-N=C=O$ , y entonces hacer reaccionar con una hidrazina de la fórmula:



en la que  $R_{38}$  se define anteriormente.

- 25 Es otro objeto de la invención utilizar compuestos identificados en los ensayos descritos en la presente memoria como aditivos o moduladores del sabor en composiciones a fin de inhibir o bloquear el sabor amargo provocado por compuestos que activan específicamente estos receptores gustativos. Un objeto preferido de la invención es utilizar un compuesto que inhibe la activación de al menos uno de los receptores T2R humanos identificados anteriormente a fin de bloquear el sabor amargo de compuestos presentes en café y alimentos y bebidas con sabor a café, y medicamentos.

- 30 Es otro objeto de la invención utilizar compuestos de la presente invención como bloqueadores del amargor de amplio alcance a fin de inhibir o bloquear el sabor amargo provocado por compuestos que activan específicamente receptores gustativos hT2R8, ligandos que activan múltiples receptores del sabor amargo, compuestos amargos que tienen especificidad desconocida por el receptor, o composiciones que contienen compuestos amargos desconocidos o múltiples compuestos amargos. En una realización, los compuestos de la invención se utilizan para inhibir la activación de al menos uno de los receptores T2R humanos identificados anteriormente bloqueando de ese modo el sabor amargo de compuestos presentes en café y alimentos y bebidas con sabor a café, y medicinas.
- 35 Es otro objeto de la invención confirmar que los compuestos identificados modulan, preferiblemente inhiben o bloquean, el sabor amargo, por ejemplo el provocado por café y alimentos y bebidas con sabor a café, y medicamentos, en

pruebas de sabor en seres humanos y en animales, preferiblemente pruebas de sabor en seres humanos.

Es otro objeto de la invención utilizar compuestos identificados en los ensayos descritos en la presente memoria como aditivos o moduladores del sabor en composiciones, a fin de inhibir o bloquear el sabor amargo provocado por compuestos que activan específicamente estos receptores gustativos. Un objeto preferido de la invención es utilizar un compuesto que inhibe la activación de al menos uno de los receptores T2R humanos identificados anteriormente a fin de bloquear el sabor amargo de compuestos presentes en café y alimentos y bebidas con sabor a café, y medicamentos.

#### DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LAS FIGURAS

La FIG. 1 se refiere a experimentos en los que se utiliza una fracción amarga parcialmente purificada del café para identificar los 25 T2Rs humanos en células HEK transfectadas transitoriamente, como se describe en solicitudes de patente previas del solicitante. Como se muestra en la FIG. 1, la fracción de café activó células HEK293 transfectadas transitoriamente con hT2R8 y hT2R14 en el ensayo de formación de imágenes de calcio. Para reducir el nivel de fluorescencia de la fracción de café, que interferiría con el ensayo, se usó el colorante azul FD&C.

La FIG. 2 es una gráfica de  $\Delta F/F$  frente al logaritmo de la fracción de café, que muestra la respuesta, dependiente de la dosis, de hT2R8 y hT2R14 a una fracción de sabor amargo derivada del café. El ensayo se llevó a cabo utilizando estirpes celulares estables de hT2R8 y hT2R14 y el detector de fluorescencia automatizado FLIPR.

La FIG. 3 es una gráfica del porcentaje de inhibición de la actividad de hT2R8 frente al logaritmo de la concentración de un compuesto, y muestra la inhibición, dependiente de la dosis, para los compuestos de referencia A y B sobre una estirpe celular estable que expresa hT2R8.

La FIG. 4 es una gráfica del porcentaje de inhibición de la actividad de hT2R14 frente al logaritmo de la concentración del compuesto de referencia C, y muestra la inhibición, dependiente de la dosis, para el compuesto C sobre una estirpe celular estable que expresa hT2R8.

La FIG. 5 muestra la actividad inhibitoria del compuesto de referencia C frente a diferentes (2) receptores del sabor amargo humanos.

La FIG. 6 es una gráfica de la actividad del receptor como una función del logaritmo de la concentración de sacarina. La FIG. 6 muestra las relaciones de respuesta a la dosis y los efectos de la sacarina sobre las actividades del receptor en células transfectadas que expresan variantes de hT2R43, hT2R44 y hT2R8. hT2R8 es menos sensible a sacarina en el ensayo in vitro que los alelos hT2R43-W35 y hT2R44-W35 "catadores", pero responde mejor que los alelos hT2R43-S35 y hT2R44-R35 "no catadores".

#### DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LA INVENCIÓN

Según la presente invención, los compuestos de la presente invención se pueden utilizar para aliviar o reducir el sabor amargo de composiciones, por ejemplo una composición ingerible. Como se utiliza en la presente memoria, una "composición ingerible" incluye cualquier sustancia destinada al consumo oral, ya sea sola o junto con otra sustancia. La composición ingerible incluye tanto "productos alimentarios o de bebidas" como "productos no comestibles". Por "productos alimentarios o de bebidas", se quiere decir cualquier producto comestible destinado al consumo por seres humanos o animales, incluyendo sólidos, semisólidos, o líquidos (por ejemplo, bebidas). La expresión "productos no comestibles" o "composición no comestible" incluye suplementos, sustancias nutracéuticas, productos alimentarios funcionales (por ejemplo, cualquier alimento fresco procesado que se afirma que tiene propiedades promotoras de la salud y/o preventivas de enfermedades, más allá de la función nutricional básica de suministrar nutrientes), sustancias farmacéuticas y medicamentos de venta sin receta, productos para el cuidado bucal tales como dentífricos y colutorios, productos cosméticos tales como bálsamos labiales y otros productos para el cuidado personal.

La composición ingerible incluye también una composición farmacéutica, medicinal o comestible, o como alternativa, en una formulación, por ejemplo una formulación farmacéutica o medicinal, o un producto o formulación alimentaria o de bebida.

Los compuestos de la presente invención también se pueden proporcionar, individualmente o en combinación, con cualquier composición ingerible conocida o descubierta más tarde. Por ejemplo, la composición ingerible puede ser una composición ingerible o una composición no comestible. Por "composición comestible", se quiere decir cualquier composición que se puede consumir como alimento por seres humanos o animales, incluyendo sólidos, gel, pasta, material espumoso, semisólidos, líquidos, o sus mezclas. Por "composición no comestible", se quiere decir cualquier composición que está destinada a ser consumida o utilizada por seres humanos o animales no como alimentos, incluyendo sólidos, gel, pasta, material espumoso, semisólidos, líquidos, o sus mezclas. La composición no comestible incluye, pero no se limita a, composición médica, que se refiere a una composición no comestible destinada a ser utilizada por seres humanos o animales con fines terapéuticos. Por "animal", se incluye cualquier

animal no humano, tal como, por ejemplo, animales de granja y mascotas.

En una realización, los compuestos de la invención se pueden añadir a una composición no comestible o producto no comestible, tal como suplementos, sustancias nutraceuticas, productos alimentarios funcionales (por ejemplo, cualquier alimento fresco o procesado que se afirma que tiene propiedades promotoras de la salud y/o preventivas de la enfermedad más allá de la función nutricional básica de suministrar nutrientes), sustancias farmacéuticas y medicamentos de venta sin receta, productos para el cuidado bucal tales como dentífricos y colutorios, productos cosméticos tales como bálsamos labiales y otros productos para el cuidado personal.

En general, el producto de venta sin receta (OTC) y el producto para la higiene bucal se refieren generalmente a producto para uso doméstico y/o personal que se puede vender sin una prescripción y/o sin una visita a un profesional médico. Los ejemplos de los productos OTC incluyen, pero no se limitan a, vitaminas y suplementos dietéticos; analgésicos y/o anestésicos tópicos; remedios para la tos, el resfriado y la alergia; antihistaminas y/o remedios para la alergia; y sus combinaciones. Las vitaminas y suplementos dietéticos incluyen, pero no se limitan a, vitaminas, suplementos dietéticos, tónicos/bebidas nutritivas embotelladas, vitaminas específicas para los niños, suplementos dietéticos, cualesquiera otros productos de o relacionados con o que proporcionan nutrición, y sus combinaciones. Los analgésicos y/o anestésicos tópicos incluyen cualesquiera cremas/ungüentos/geles tópicos utilizados para aliviar todo tipo de dolor superficial o bien arraigado, por ejemplo dolor muscular; gel para la dentición; parches con ingrediente analgésico; y sus combinaciones. Los remedios para la tos, el resfriado y la alergia incluyen, pero no se limitan a, descongestionantes, remedios para la tos, preparaciones faringeadas, golosinas medicadas, antihistaminas y remedios para la tos, el resfriado y la alergia específicos para niños; y productos de combinación. Las antihistaminas y/o remedios para la alergia incluyen, pero no se limitan a, cualesquiera tratamientos sistémicos para fiebre del heno, alergias nasales, mordeduras y picaduras de insectos. Los ejemplos de productos para la higiene bucal incluyen, pero no se limitan a, tiras para la limpieza de la boca, pasta de dientes, cepillos de dientes, colutorios/enjuagues bucales, cuidado de dentaduras, refrescantes bucales, blanqueadores domésticos de los dientes, e hilo dental.

En otra realización, los compuestos de la presente invención se pueden añadir a productos o formulaciones de alimentos o de bebidas. Los ejemplos de productos o formulaciones de alimentos y de bebidas incluyen, pero no se limitan a, revestimientos, escarchados, o glaseados para productos comestibles o cualquier entidad incluida en la categoría de sopas, la categoría de alimentos procesados secos, la categoría de bebidas, la categoría de comidas rápidas, la categoría de alimentos enlatados o conservados, la categoría de alimentos procesados congelados, la categoría de alimentos procesados refrigerados, la categoría de alimentos aperitivos, la categoría de artículos horneados, la categoría de dulces, la categoría de productos lácteos, la categoría de helados, la categoría de sustitutos de comidas, la categoría de pastas y tallarines, y la categoría de salsas, aliños, condimentos, la categoría de alimentos para bebés, y/o la categoría de productos para untar.

En general, la categoría de sopas se refiere a sopa enlatada/conservada, deshidratada, instantánea, refrigerada, UHT y congelada. Para los fines de esta definición, sopa o sopas significa un alimento preparado a partir de carne, aves, pescado, vegetales, granos, fruta y otros ingredientes, cocinado en un líquido que puede incluir trozos visibles de algunos o de todos estos ingredientes. Puede ser transparente (como un caldo) o espesa (como sopa de pescado), uniforme, en puré o con trozos, lista para servir, semicondensada o condensada, y se puede servir caliente o fría, como un primer plato o como el plato principal de una comida, o como un aperitivo entre comidas (sorbida como una bebida). La sopa se puede utilizar como un ingrediente para preparar otros componentes de la comida, y puede abarcar desde caldos (consomé) hasta salsas (sopas a base de nata o queso).

“Categoría de alimentos deshidratados y culinarios” significa habitualmente: (i) productos adyuvantes de la cocción tales como: polvos, gránulos, pastas, productos líquidos concentrados, incluyendo caldo concentrado, caldo y productos semejantes a caldo en cubos prensados, comprimidos o en forma de polvo o granulada, que se venden separadamente como un producto acabado o como un ingrediente en un producto, salsas y mezclas de recetas (independientemente de la tecnología); (ii) productos de disoluciones de carne tales: sopas deshidratadas y liofilizadas, incluyendo mezclas de sopas deshidratadas, sopas instantáneas deshidratadas, sopas deshidratadas listas para cocinar, preparaciones deshidratadas o ambientales de platos ya cocinados, comidas y entradas de un solo servicio, incluyendo platos de pasta, de patata y de arroz; y (iii) productos para mejorar las comidas, tales como: condimentos, adobos, aliños de ensaladas, aderezo de ensaladas, salsas para mojar, empanado, mezclas para rebozar, productos para untar estables durante el almacenamiento, salsas para barbacoa, mezclas de recetas líquidas, concentrados, salsas o mezclas de salsas, incluyendo mezclas de recetas para ensalada, vendidos como un producto acabado o como un ingrediente en un producto, ya sea deshidratado, líquido o congelado.

La categoría de bebidas significa habitualmente bebidas, mezclas de bebidas y concentrados, incluyendo, pero sin limitarse a, bebidas carbonatadas y no carbonatadas, bebidas alcohólicas y no alcohólicas, bebidas listas para beber, formulaciones de concentrados líquidas para preparar bebidas, tales como sodas, y mezclas precursoras de bebidas en polvo secas. La categoría de bebidas también incluye las bebidas alcohólicas, los refrescos, bebidas deportivas, bebidas isotónicas, y bebidas calientes. Las bebidas alcohólicas incluyen, pero no se limitan a, sidra/sidra de peras, bebidas alcohólicas aromatizadas (FABs), vino, y bebidas espirituosas. Los refrescos incluyen, pero no se limitan a, carbonatos, tales como colas y carbonatos no de cola; zumo de frutas, tales como zumo, néctares, bebidas de zumo y bebidas con sabor a frutas; agua embotellada, que incluye agua con gas, agua mineral

- 5 y agua pura/de mesa; bebidas funcionales, que pueden estar carbonatadas o sin gas, e incluyen bebidas deportivas, energéticas o elixires; concentrados, tales como concentrados líquidos y en polvo en una medida lista para beber. Las bebidas calientes incluyen, pero no se limitan a, café, tal como bebidas de café recientemente preparadas (por ejemplo, en infusión), instantáneas, de café combinado, líquidas, listas para beber, solubles y secas, mezclas de bebidas de café y concentrados (jarabes, puré, formulados, o en forma de polvo; un ejemplo de una “forma de polvo” es un producto que comprende café, edulcorante, y un blanqueador, todo en forma de polvo); té, tal como té negro, verde, blanco, oolong, y de sabores; y otras bebidas calientes que incluyen polvos, gránulos, bloques o tabletas basados en aromas, maltas o plantas, mezclados con leche o agua.
- 10 La categoría de alimentos aperitivos se refiere generalmente a cualquier alimento que puede ser una comida informal ligera, incluyendo, pero sin limitarse a, aperitivos dulces y salados y barras de aperitivos. Los ejemplos de alimento aperitivo incluyen, pero no se limitan a, aperitivos de frutas, patatas fritas de bolsa/patatas fritas crujientes, aperitivos extruidos, tortilla/crujientes de maíz, palomitas de maíz, pretzels, frutos secos y otros aperitivos dulces y salados. Los ejemplos de barras de aperitivos incluyen, pero no se limitan a, barras de granola/muesli, barras de desayuno, barras energéticas, barras de frutas y otras barras de aperitivos.
- 15 La categoría de artículos horneados se refiere generalmente a cualquier producto comestible cuyo procedimiento de preparación implica la exposición a calor o luz solar excesiva. Los ejemplos de artículos horneados incluyen, pero no se limitan a, pan, bollitos, galletas, panecillos, cereal, hojaldres de tostadora, hojaldres, obleas, tortillas, galletas, pasteles, bageles, tartas, quiches, tortas, cualquier alimento horneado, y cualquier combinación de los mismos.
- 20 La categoría de helados se refiere generalmente a postre congelado que contiene nata y azúcar y aromatizantes. Los ejemplos de helado incluyen, pero no se limitan a: helado de antojo; helado para llevar a casa; yogur congelado y helado artesanal; helados basados de soja, avena, haba (por ejemplo, haba roja y haba mungo), y arroz.
- La categoría de dulces se refiere generalmente a producto comestible que es dulce al gusto. Los ejemplos de dulces incluyen, pero no se limitan a, caramelos, gelatinas, dulces de chocolate, dulces de azúcar, goma de mascar, y similares, y cualesquiera productos de combinación.
- 25 La categoría de sustituto de comidas se refiere generalmente a cualquier alimento destinado a sustituir las comidas normales, particularmente para personas que tienen problemas de salud o de forma física. Los ejemplos de sustituto de comidas incluyen, pero no se limitan a, productos adelgazantes y productos de convalecencia.
- 30 La categoría de comida rápida se refiere generalmente a cualquier alimento que se puede servir como una comida sin preparación o procesamiento exhaustivo. La comida rápida incluye productos a los que se les han añadido “talentos” de recetas por el fabricante, dando como resultado un grado elevado de rapidez, terminación y conveniencia. Los ejemplos de comida rápida incluyen, pero no se limitan a, comidas listas enlatadas/conservadas, congeladas, secas, refrigeradas; mezclas de comidas; pizza congelada; pizza refrigerada; y ensaladas preparadas.
- La categoría de pasta y tallarines incluye cualesquiera pastas y/o tallarines, incluyendo, pero sin limitarse a, pasta enlatada, seca y refrigerada/fresca; y tallarines enteros, instantáneos, refrigerados, congelados y de aperitivos.
- 35 La categoría de alimentos enlatados/conservados incluye, pero no se limita a, carne y productos de carne enlatados/conservados, pescado/marisco, vegetales, tomates, habas, fruta, comidas rápidas, sopa, pasta, y otros alimentos enlatados/conservados.
- 40 La categoría de alimentos procesados congelados incluye, pero no se limita a, carne roja procesada congelada, carne de ave procesada, pescado/marisco procesado, vegetales procesados, sustitutos de carne, patatas procesadas, productos de panadería, postres, comidas rápidas, pizza, sopa, tallarines, y otro alimento congelado.
- La categoría de alimento procesado seco incluye, pero no se limita a, arroz, mezclas de postres, comidas rápidas secas, sopa deshidratada, sopa instantánea, pasta seca, tallarines enteros, y tallarines instantáneos.
- 45 La categoría de alimento procesado refrigerado incluye, pero no se limita a, carnes procesadas refrigeradas, productos de pescado/marisco procesados, kits de almuerzo, frutas cortadas frescas, comidas rápidas, pizza, ensaladas preparadas, sopa, pasta y tallarines frescos.
- 50 La categoría de salsas, aliños y condimentos incluye, pero no se limita a, pastas y purés de tomate, caldo/cubitos de caldo, hierbas y especias, glutamato monosódico (MSG), salsas de mesa, salsas a base de soja, salsas para pasta, salsas húmedas/para cocinar, salsas secas/mezclas en polvo, ketchup, mahonesa, mostaza, aliños para ensaladas, vinagretas, salsas para mojar, productos encurtidos, y otras salsas, aliños y condimentos.
- La categoría de alimentos para bebés incluye, pero no se limita a, fórmula a base de leche y de soja; y alimento para bebés preparado, seco y otro alimento para bebés.
- La categoría de productos para untar incluye, pero no se limita a, mermeladas y conservas, miel, productos para untar de chocolate, productos para untar a base de frutos secos, y productos para untar a base de levadura.

La categoría de producto lácteo se refiere generalmente a producto comestible producido a partir de leche de mamífero. Los ejemplos de producto lácteo incluyen, pero no se limitan a, productos de leche para beber, queso, yogur y bebidas de leche cortada, y otros productos lácteos.

5 Ejemplos adicionales para composición comestible, particularmente productos o formulaciones de alimentos y de  
 10 bebidas, se proporcionan a continuación. Las composiciones comestibles ejemplares incluyen uno o más dulces,  
 dulce de chocolate, tabletas, barras de chocolate, barritas de chocolate pequeñas/chocolates del mismo tipo en  
 bolsitas, surtidos en cajas, surtidos en cajas estándar, miniaturas en envoltorios retorcidos, chocolate de temporada,  
 15 chocolate con juguetes, alfajores, otros dulces de chocolate, mentas, mentas estándar, mentas en polvo, dulces  
 hervidos, pastillas, gomas de mascar, jaleas y productos para mascar, caramelos de dulce de leche, caramelos y  
 20 turrón, dulces medicados, piruletas, regaliz, otros dulces de azúcar, gomas, goma de mascar, goma de mascar para  
 chupar, goma de mascar con azúcar, goma de mascar sin azúcar, goma de mascar funcional, goma de mascar en  
 esferas, pan, pan envasado/industrial, pan sin envasar/artesanal, hojaldres, tortas, tortas envasadas/industriales,  
 25 tortas sin envasar/artesanales, galletas, galletitas revestidas de chocolate, galletitas de sándwich, galletitas rellenas,  
 galletitas saladas y galletitas de agua, sustitutos del pan, cereales para el desayuno, cereales listos para comer,  
 30 cereales para el desayuno de la familia, copos, muesli, otros cereales, cereales para el desayuno de los niños,  
 cereales calientes, helado, helado de antojo, helado de leche de una sola porción, helado de agua de una sola  
 porción, helado de leche de múltiples envases, helado de agua de múltiples envases, helado para llevar a casa,  
 35 helado de leche para llevar a casa, postres de helado, helado a granel, helado de agua para llevar a casa, yogur  
 congelado, helado artesanal, productos lácteos, leche, leche fresca/pasteurizada, leche fresca/pasteurizada entera,  
 40 leche fresca/pasteurizada semidesnatada, leche de larga duración/UHT, leche de larga duración/UHT entera, leche  
 de larga duración/UHT semidesnatada, leche de larga duración/UHT desnatada, leche de cabra, leche  
 condensada/evaporada, leche condensada/evaporada pura, leche aromatizada, funcional y otra leche condensada,  
 45 bebidas de leche aromatizadas, bebidas de leche aromatizadas solamente lácteas, bebidas de leche aromatizadas  
 con zumo de frutas, leche de soja, bebidas de leche cortada, bebidas lácteas fermentadas, blanqueadores del café  
 (por ejemplo, sustitutos de la nata o blanqueadores a base de leche y no basados en leche para bebidas de café),  
 50 leche en polvo, bebidas de leche en polvo aromatizadas, nata, queso, queso procesado, queso procesado untable,  
 queso procesado no untable, queso no procesado, queso no procesado untable, queso curado, queso curado  
 envasado, queso curado no envasado, yogur, yogur entero/natural, yogur aromatizado, yogur con frutas, yogur  
 55 probiótico, yogur para beber, yogur para beber normal, yogur para beber probiótico, postres refrigerados y estables  
 en la estantería, postres a base de leche, postres a base de soja, aperitivos refrigerados, queso fresco y batido,  
 queso freso y batido enteros, queso fresco y batido aromatizados, queso fresco y batido salados, aperitivos dulces y  
 60 salados, aperitivos de frutas, patatas fritas de bolsa/crujientes/aperitivos extruidos, tortilla/patatas de maíz, palomitas  
 de maíz, pretzels, frutos secos, otros aperitivos dulces y salados, barritas de aperitivos, barras de granola, barras  
 para desayuno, barras energéticas, barras de frutas, otras barras de aperitivos, productos de sustitución de comidas,  
 65 productos adelgazantes, bebidas para convalecencia, comidas rápidas, comidas rápidas enlatadas, comidas rápidas  
 congeladas, comidas rápidas secas, comidas rápidas refrigeradas, mezclas de comidas, pizza congelada, pizza  
 refrigerada, sopa, sopa enlatada, sopa deshidratada, sopa instantánea, sopa refrigerada, sopa caliente, sopa  
 70 congelada, pasta, pasta enlatada, pasta seca, pasta refrigerada/fresca, tallarines, tallarines enteros, tallarines  
 instantáneos, tallarines instantáneos de copas/boles, tallarines instantáneos de saquitos, tallarines refrigerados,  
 tallarines de aperitivos, alimento enlatado, carne y productos cárnicos enlatados, pescado/marisco enlatado,  
 75 vegetales enlatados, tomates enlatados, habas enlatadas, fruta enlatada, comidas rápidas enlatadas, sopa enlatada,  
 pasta enlatada, otros alimentos enlatados, alimento congelado, carne roja procesada congelada, carne de ave  
 procesada congelada, pescado/marisco procesado congelado, vegetales procesados congelados, sustitutos de  
 80 carne congelados, patatas congeladas, patatas fritas homeadas, otros productos de patatas homeados, patatas  
 congeladas no homeadas, productos de panadería congelados, postres congelados, comidas rápidas congeladas,  
 pizza congelada, sopa congelada, tallarines congelados, otro alimento congelado, alimento seco, mezclas de  
 85 postres, comidas rápidas secas, sopa deshidratada, sopa instantánea, pasta seca, tallarines enteros, tallarines  
 instantáneos, tallarines instantáneos de copas/boles, tallarines instantáneos de saquitos, alimento refrigerado,  
 carnes procesadas refrigeradas, productos de pescado/marisco refrigerados, pescado procesado refrigerado,  
 90 pescado revestido refrigerado, pescado ahumado refrigerado, kit de almuerzo refrigerado, comidas rápidas  
 refrigeradas, pizza refrigerada, sopa refrigerada, pasta refrigerada/fresca, tallarines refrigerados, aceites y grasas,  
 95 aceite de oliva, aceite vegetal y de semillas, grasas para cocinar, mantequilla, margarina, aceites y grasas untables,  
 aceites y grasas untables funcionales, salsas, aliños y condimentos, pastas y purés de tomate, caldo/cubos de caldo,  
 100 cubos de caldo, gránulos de jugo de carne, caldos y caldos concentrados líquidos, hierbas y especias, salsas  
 fermentadas, salsas a base de soja, salsas para pasta, salsas húmedas, salsas secas/mezclas en polvo, ketchup,  
 mahonesa, mahonesa normal, mostaza, aliños para ensaladas, aliños para ensalada normales, aliños para ensalada  
 105 bajos en grasa, vinagretas, salsas para mojar, productos encurtidos, otras salsas, aliños y condimentos, alimento  
 para bebés, fórmula de leche, fórmula de leche estándar, fórmula de leche de continuación, fórmula de leche para  
 niño pequeño, fórmula de leche hipoalérgica, alimento para bebés preparado, alimento para bebés seco, otro  
 110 alimento para bebés, productos para untar, mermeladas y conservas, miel, productos para untar de chocolate,  
 productos para untar a base de frutos secos, y productos para untar a base de levadura. Las composiciones  
 comestibles ejemplares también incluyen dulces, productos de panadería, helados, productos lácteos, aperitivos  
 115 dulces y salados, barritas de aperitivos, productos sustitutos de las comidas, comidas rápidas, sopas, pastas,  
 tallarines, alimentos enlatados, alimentos congelados, alimentos secos, alimentos refrigerados, aceites y grasas,  
 120 alimentos para bebés, o productos para untar o una mezcla de los mismos. Las composiciones comestibles

ejemplares también incluyen cereales para desayuno, bebidas dulces o composiciones de concentrado sólidas o líquidas para preparar bebidas. Las composiciones comestibles ejemplares también incluyen alimento con sabor a café (por ejemplo, helado con sabor a café).

5 Típicamente, una cantidad suficiente para aliviar o reducir el sabor amargo asociado con una composición, por ejemplo una composición ingerible, se añade a la composición para aliviar o reducir el sabor amargo asociado con la composición, en comparación con composiciones que se preparan sin los compuestos de la presente invención, según se valora por seres humanos o animales. O, en el caso de pruebas de formulaciones, según se valora por una mayoría de un panel de, por ejemplo, ocho catadores del sabor humanos, vía procedimientos conocidos habitualmente en el campo.

10 La concentración de los compuestos de la presente invención eficaz para aliviar o reducir el sabor amargo asociado con una composición dependerá por supuesto de muchas variables, incluyendo el tipo específico de composición comestible y sus diversos ingredientes adicionales, la variabilidad genética natural y preferencias individuales y estados de salud de los diversos seres humanos que ingieren las composiciones, y el efecto subjetivo del compuesto particular sobre el sabor de tales compuestos quimiosensoriales. En algunas realizaciones, la  
 15 concentración de los compuestos de la presente invención eficaz para aliviar o reducir el sabor amargo asociado con una composición es de alrededor de 0,001 ppm a alrededor de 100 ppm, por ejemplo de alrededor de 0,1 ppm a alrededor de 100 ppm, de alrededor de 1 ppm a alrededor de 25 ppm, de alrededor de 1 ppm a alrededor de 10 ppm, de alrededor de 0,1 ppm a alrededor de 10 ppm, de alrededor de 0,01 ppm a alrededor de 30 ppm, de  
 20 alrededor de 0,05 ppm a alrededor de 10 ppm, de alrededor de 0,01 ppm a alrededor de 5 ppm, de alrededor de 0,02 ppm a alrededor de 2 ppm, o de alrededor de 0,01 ppm a alrededor de 1 ppm.

Se contempla que, en algunas realizaciones de la presente invención, se utilizará una mezcla de uno o más compuestos de la presente invención para aliviar o reducir el sabor amargo asociado con una composición. La concentración del uno o más compuestos puede ser la misma, o la concentración de cada compuesto puede ser diferente.

25 Antes de describir adicionalmente la invención, se proporcionan las siguientes definiciones.

La expresión familia de "T2R" incluye variantes polimórficas, alelos, mutantes, y homólogos que: (1) tienen alrededor de 30-40% de identidad de secuencia de aminoácidos, más específicamente alrededor de 40, 50, 60, 70, 75, 80, 85, 90, 95, 96, 97, 98, o 99% de identidad de secuencia de aminoácidos con los T2Rs descritos más abajo, y en las solicitudes de Zuker (Id) (2001) y Adler (Id.) (2001) a lo largo de una ventana de alrededor de 25 aminoácidos, óptimamente 50-100 aminoácidos; (2) se unen específicamente a anticuerpos generados contra un inmunógeno que comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en las secuencias de T2R descritas más abajo, y sus variantes modificadas de forma conservativa; (3) se hibridan específicamente (con un tamaño de al menos alrededor de 100, opcionalmente al menos alrededor de 500-1000 nucleótidos) en condiciones de hibridación restrictivas a una secuencia seleccionada del grupo que consiste en las secuencias de ADN de T2R descritas más  
 30 abajo, y sus variantes modificadas de forma conservativa; (4) comprenden una secuencia de al menos alrededor de 40% idéntica a una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en las secuencias de aminoácidos de T2R descritas más abajo; o (5) se amplifican mediante cebadores que se hibridan específicamente en condiciones de hibridación restrictivas a las secuencias de T2R descritas.

En particular, estos "T2Rs" incluyen receptores gustativos GPCRs denominados en la presente memoria como hT2R8 y hT2R14, que tienen las secuencias de ácidos nucleicos y secuencias de aminoácidos proporcionadas en esta solicitud, y sus variantes, alelos, mutantes, ortólogos y quimeras que se unen específicamente a ligandos amargos que se identifican en la presente memoria u otros compuestos estructuralmente relacionados y compuestos amargos.

45 Mientras que los genes T2R exhiben una divergencia sustancial de secuencias tanto a nivel proteico como de ADN, se ha encontrado que todos los T2Rs aislados hasta la fecha contienen ciertas secuencias de consenso, en particular regiones que son idénticas o que poseen al menos 70-75% de identidad de secuencia con la secuencia de consenso de T2R identificada previamente en los documentos de Adler et al (WO 01/77676 A1 (2001) y Zuker et al. WO 01/18050 A2.

Topológicamente, ciertos GPCRs quimiosensoriales tienen un "dominio N-terminal", "dominios extracelulares", un "dominio transmembránico" que comprende siete regiones transmembránicas, y que corresponden a bucles citoplásmicos y extracelulares, "regiones citoplásmicas", y una "región C-terminal" (véanse, por ejemplo, Hoon et al, Cell, 96:541-51 (1999); Buck y Axel, Cell, 65:175-87 (1991)). Estas regiones se pueden identificar estructuralmente utilizando métodos conocidos por aquellos de pericia en la técnica, tales como programas de análisis de secuencias que identifican dominios hidrófobos e hidrófilos (véase, por ejemplo, Stryer, Biochemistry, (3<sup>a</sup> ed. 1988); véase también cualquiera de un número de programas de análisis de secuencias basados en internet, tales como los encontrados en dot.imgen.bcm.tmc.edu). Estas regiones son útiles para obtener proteínas quiméricas y para ensayos in vitro de la invención, por ejemplo ensayos de unión al ligando. Por ejemplo, los T2Rs quiméricos se pueden obtener combinando la región extracelular de un T2R y la región transmembránica de otro T2R de la misma especie o de diferentes especies.

Por lo tanto, “dominios extracelulares” se refiere a los dominios de polipéptidos de T2R que sobresalen de la membrana celular y están expuestos a la cara extracelular de la célula. Tales regiones incluirían el “dominio N-terminal” que está expuesto a la cara extracelular de la célula, así como los bucles extracelulares del dominio transmembránico que se exponen a la cara extracelular de la célula, es decir, los bucles extracelulares entre las regiones transmembránicas 2 y 3, regiones transmembránicas 4 y 5, y regiones transmembránicas 6 y 7. El “dominio N-terminal” comienza en el término N y se extiende hasta una región próxima al comienzo de la región transmembránica. Estas regiones extracelulares son útiles para ensayos de unión al ligando in vitro, tanto solubles como en fase sólida. Además, las regiones transmembránicas, descritas más abajo, también pueden estar implicadas en la unión al ligando, ya sea en combinación con la región extracelular o sola, y por lo tanto también son útiles para ensayos de unión al ligando in vitro.

“Célula que expresa T2R” engloba en la presente memoria células recombinantes que expresan una secuencia de T2R humano según la invención, así como células que expresan T2R endógeno. Tales células están comprendidas en el sistema lingual y gastrointestinal, e incluyen células en la cavidad bucal tales como papilas gustativas expresadas en la lengua, así como células en el sistema gastrointestinal y órganos asociados, tales como células en cepillo en el aparato digestivo, células enteroendocrinas tales como células STC-1. Estas células también pueden expresar una proteína G tal como gustducina, transducina,  $G_{\alpha 15}$  o  $G_{\alpha 16}$ . Las células que expresan T2Rs específicos se pueden identificar y aislar mediante métodos conocidos tales como procedimientos de separación celular mediante FACS y/o aislamiento de células mediante perlas magnéticas.

“Dominio transmembránico”, que comprende las siete “regiones” transmembránicas, se refiere al dominio de polipéptidos de T2R que se extiende a través de la membrana plasmática, y también puede incluir los correspondientes bucles citoplásmicos (intracelulares) y extracelulares, también denominados como “regiones” transmembránicas. Las siete regiones transmembránicas y los bucles extracelulares y citoplásmicos pueden identificarse utilizando métodos estándar, tal como se describe en Kyte y Doolittle, *J. Mol. Biol.*, 157:105-32 (1982), o en Stryer, más arriba.

Los “dominios citoplásmicos” se refieren a dominios de proteínas T2R que miran hacia el interior de la célula, por ejemplo el “dominio C-terminal” y los bucles intracelulares del dominio transmembránico, por ejemplo los bucles intracelulares entre las regiones transmembránicas 1 y 2, las regiones transmembránicas 3 y 4, y las regiones transmembránicas 5 y 6. El “dominio C-terminal” se refiere a la región que abarca desde el extremo de la última región transmembránica hasta el término C-terminal de la proteína, y que normalmente está localizado dentro del citoplasma.

La expresión “receptor 7-transmembránico” significa un polipéptido que pertenece a una superfamilia de proteínas transmembránicas que tienen siete regiones que atraviesan la membrana plasmática siete veces (de este modo, las siete regiones se denominan dominios “transmembránicos” o “TM” TM I a TM VII). Las familias de receptores olfativos y de ciertos receptores gustativos pertenecen cada una a esta superfamilia. Los polipéptidos de los receptores 7-transmembránicos tienen estructuras primarias, secundarias y terciarias similares y características, como se explica con mayor detalle más abajo.

La expresión “región de unión al ligando” se refiere a secuencias derivadas de un receptor quimiosensorial o gustativo que incorpora sustancialmente dominios transmembránicos II a VII (TM II a VII). La región puede ser capaz de unirse a un ligando, y más particularmente, a un compuesto que provoca sabor.

La expresión “dominio de translocación de membrana plasmática” o simplemente “dominio de translocación” significa un dominio polipeptídico que cuando se incorpora en el término amino de una secuencia codificante de un polipéptido puede “chaperonar” o “translocar” con gran eficacia la proteína híbrida (“de fusión”) hacia la membrana plasmática celular. Por ejemplo, se puede utilizar un “dominio de translocación” particular derivado inicialmente del término amino del polipéptido del receptor de rodopsina humano, un receptor 7-transmembránico. Se ha derivado otro dominio de translocación a partir de la secuencia de rodopsina bovina, y también es útil para facilitar la translocación. Las secuencias derivadas de rodopsina son particularmente eficientes translocando proteínas de fusión 7-transmembránicas hacia la membrana plasmática.

“Equivalencia funcional” significa la capacidad y eficiencia del dominio para translocar proteínas recientemente traducidas a la membrana plasmática tan eficientemente como un dominio de translocación ejemplar, tal como el derivado de rodopsina, en condiciones similares; las eficiencias relativas se pueden medir (en términos cuantitativos) y se pueden comparar, como se describe en la presente memoria. Los dominios que caen dentro del alcance de la invención se pueden determinar mediante identificación habitual en busca de su eficiencia para translocar polipéptidos recientemente sintetizados hacia la membrana plasmática en una célula (de mamífero, *Xenopus*, y similar) con la misma eficiencia que el dominio de translocación de veinte aminoácidos de longitud SEC ID NO: 1.

La expresión “efectos funcionales”, en el contexto de ensayos para ensayar compuestos que modulan la transducción del gusto mediada por miembros de la familia de T2R, incluye la determinación de cualquier parámetro que esté directa o indirectamente bajo la influencia del receptor, por ejemplo efectos funcionales, físicos y químicos. Incluye la unión a ligandos, cambios en el flujo de iones, potencial de membrana, flujo de corriente, transcripción, unión a proteína G, fosforilación o desfosforilación de GPCR, transducción de señales, interacciones receptor-

ligando, concentraciones de segundos mensajeros (por ejemplo, AMPc, GMPc, IP3, o  $Ca^{2+}$  intracelular), in vitro, in vivo y ex vivo, y también incluye otros efectos fisiológicos tales como aumentos o disminuciones en la liberación de neurotransmisores u hormonas.

5 Por “determinar el efecto funcional” se quiere decir ensayos para un compuesto que aumenta o disminuye un parámetro que está directa o indirectamente bajo la influencia de un miembro de la familia de T2R, por ejemplo efectos funcionales, físicos y químicos. Tales efectos funcionales pueden medirse por cualquier medio conocido por los expertos en la técnica, por ejemplo cambios en las características espectroscópicas (por ejemplo, fluorescencia, absorbancia, índice de refracción), hidrodinámicas (por ejemplo, forma), cromatográficas, o de solubilidad, fijación de parches, colorantes sensibles al voltaje, corrientes de células completas, eflujo de radioisótopos, marcadores inducibles, expresión del gen T2R en oocitos; expresión de T2R en células de cultivos de tejidos; activación transcripcional de genes T2R; ensayos de unión a ligandos; cambios en el voltaje, el potencial de membrana y la conductancia; ensayos de flujo de iones; cambios en segundos mensajeros intracelulares, tales como GMPc, AMPc e inositol trifosfato (IP3); cambios en los niveles de calcio intracelular; liberación de neurotransmisores, y similares.

15 Los “inhibidores”, “activadores” y “moduladores” de proteínas receptoras T2R se utilizan para referirse a moléculas inhibitoras, activadoras o moduladoras identificadas utilizando ensayos in vitro e in vivo para la transducción del gusto, por ejemplo ligandos, agonistas, antagonistas, y sus homólogos y miméticos. Los inhibidores son compuestos que, por ejemplo, se unen a, bloquean parcial o totalmente la estimulación, disminuyen, previenen, retrasan la activación, inactivan, desensibilizan o disminuyen la transducción del gusto, por ejemplo antagonistas. Los activadores son compuestos que, por ejemplo, se unen a, estimulan, aumentan, abren, activan, facilitan, potencian la activación, sensibilizan o aumentan la transducción del gusto, por ejemplo agonistas. Los moduladores incluyen compuestos que, por ejemplo, alteran la interacción de un receptor con proteínas extracelulares que se unen a activadores o inhibidores (por ejemplo, ebnerina y otros miembros de la familia de portadores hidrófobos); proteínas G; cinasas (por ejemplo, homólogos de rodopsina cinasa y cinasas del receptor beta-adrenérgico que están implicados en la desactivación y desensibilización de un receptor); y arrestinas; y también desactivan y desensibilizan receptores. Los moduladores incluyen versiones genéticamente modificadas de miembros de la familia de T2R, por ejemplo con actividad alterada, así como ligandos de origen natural y sintéticos, antagonistas, agonistas, moléculas químicas pequeñas, y similares.

20 Tales ensayos para inhibidores y activadores incluyen, por ejemplo, expresar miembros de la familia de T2R en células o membranas celulares, aplicar compuestos moduladores putativos en presencia o en ausencia de compuestos que modulan, por ejemplo, compuestos amargos, y después determinar los efectos funcionales sobre la transducción del gusto, como se describió anteriormente. Las muestras o ensayos que comprenden miembros de la familia de T2R que se tratan con un activador, inhibidor o modulador potencial se comparan con muestras de control sin el inhibidor, activador o modulador, para estudiar el grado de modulación. A las muestras de control (no tratadas con moduladores) se les asigna un valor de actividad de T2R relativo del 100%. La inhibición de un T2R se logra cuando el valor de actividad de T2R con respecto al control es alrededor de 80%, opcionalmente 50% o 25-0%. La activación de un T2R se logra cuando el valor de actividad de T2R con respecto al control es 110%, opcionalmente 150%, opcionalmente 200-500%, o 1000-3000% o mayor.

30 Las expresiones “purificado”, “sustancialmente purificado” y “aislado”, tal como se emplean en la presente memoria, se refieren al estado de estar exento de otros compuestos diferentes con los que el compuesto de la invención normalmente está asociado en su estado natural. Preferiblemente “purificado”, “sustancialmente purificado” y “aislado” significan que la composición comprende al menos 0,5%, 1%, 5%, 10% o 20%, y lo más preferiblemente al menos 50% o 75% de la masa, en peso, de una muestra dada. En una realización preferida, estas expresiones se refieren al compuesto de la invención que comprende al menos 95% de la masa, en peso, de una muestra dada. Tal como se emplean en la presente memoria, las expresiones “purificado”, “sustancialmente purificado” y “aislado”, cuando se refieren a un ácido nucleico o a una proteína, o ácidos nucleicos o proteínas, también se refieren a un estado de purificación o concentración diferente de aquel que se produce de modo natural en el cuerpo de un mamífero, en especial de un ser humano. Cualquier grado de purificación o concentración mayor que aquel que se produce de modo natural en el cuerpo de un mamífero, en especial de un ser humano, incluyendo (1) la purificación de otras estructuras o compuestos asociados, o (2) la asociación con estructuras o compuestos con los que normalmente no está asociado en el cuerpo de un mamífero, en especial de un ser humano, está dentro del significado de “aislado”. El ácido nucleico o la proteína, o las clases de ácidos nucleicos o de proteínas descritos en la presente memoria, pueden estar aislados, o asociados de otra forma con estructuras o compuestos con los que normalmente no están asociados en la naturaleza, según una diversidad de métodos y procedimientos conocidos por los expertos en la técnica.

45 Tal como se emplea en la presente memoria, el término “aislado”, cuando se refiere a un ácido nucleico o polipéptido, se refiere a un estado de purificación o concentración diferente de aquel que se produce de modo natural en el cuerpo de un mamífero, en especial de un ser humano. Cualquier grado de purificación o concentración mayor que aquel que se produce de modo natural en el cuerpo, incluyendo (1) la purificación de otras estructuras o compuestos asociados de origen natural, o (2) la asociación con estructuras o compuestos con los que normalmente no está asociado en el cuerpo, está dentro del significado de “aislado” como se utiliza en la presente memoria. Los ácidos nucleicos o polipéptidos descritos en la presente memoria pueden estar aislados o asociados de otra forma

con estructuras o compuestos con los que normalmente no están asociados en la naturaleza, según una diversidad de métodos y procedimientos conocidos por los expertos en la técnica.

5 Como se utiliza en la presente memoria, los términos “amplificar” y “amplificación” se refieren al uso de cualquier metodología de amplificación adecuada para generar o detectar ácido nucleico recombinante o expresado de forma natural, como se describe con detalle más abajo. Por ejemplo, la invención proporciona métodos y reactivos (por ejemplo, pares de cebadores oligonucleotídicos específicos) para amplificar (por ejemplo, mediante reacción en cadena de la polimerasa, PCR) ácidos nucleicos expresados de forma natural (por ejemplo, genómico o ARNm) o recombinantes (por ejemplo, ADNc) de la invención (por ejemplo, secuencias de la invención que se unen a compuestos que estimulan el sabor) in vivo o in vitro.

10 La expresión “vector de expresión” se refiere a cualquier sistema de expresión recombinante con el objetivo de expresar una secuencia de ácido nucleico de la invención in vitro o in vivo, de manera constitutiva o inducible, en cualquier célula, incluyendo células procariotas, de levadura, fúngicas, vegetales, de insecto o de mamífero. La expresión incluye sistemas de expresión lineales o circulares. La expresión incluye sistemas de expresión que permanecen episómicos o se integran en el genoma de la célula hospedante. Los sistemas de expresión pueden tener la capacidad de autorreplicarse o no, es decir, dirigir sólo una expresión transitoria en una célula. La expresión incluye “casetes” de expresión recombinante que contienen sólo los elementos mínimos necesarios para la transcripción del ácido nucleico recombinante.

15 El término “genoteca” significa una preparación que es una mezcla de diferentes moléculas de ácidos nucleicos o polipéptidos, tal como la genoteca de regiones sensoriales generadas recombinantemente, particularmente de unión a ligandos del receptor gustativo, generadas mediante amplificación de ácido nucleico con pares de cebadores degenerados, o una colección aislada de vectores que incorporan las regiones de unión al ligando amplificadas, o una mezcla de células transfectadas cada una aleatoriamente con al menos un vector que codifica un receptor gustativo.

20 La expresión “ácido nucleico” o “secuencia de ácido nucleico” se refiere a un oligonucleótido desoxirribonucleótido o ribonucleótido en forma monocatenaria o bicatenaria. La expresión engloba ácidos nucleicos, es decir, oligonucleótidos, que contienen análogos conocidos de nucleótidos naturales. La expresión también engloba estructuras de tipo ácido nucleico con esqueletos sintéticos.

25 A menos que se indique lo contrario, una secuencia de ácido nucleico particular también engloba implícitamente sus variantes modificadas de modo conservativo (por ejemplo, sustituciones de codones degenerados) y secuencias complementarias, así como la secuencia explícitamente indicada. De modo específico, las sustituciones de codones degenerados pueden lograrse generando, por ejemplo, secuencias en las que la tercera posición de uno o más codones seleccionados está sustituida por restos de bases mixtas y/o desoxiinosina (Batzler et al., *Nucleic Acids Res.*, 19:5081 (1991); Ohtsuka et al., *J. Biol. Chem.*, 260:2605-2608 (1985); Rossolini et al., *Mol. Cell. Probes*, 8:91-98 (1994)). La expresión “ácido nucleico” se utiliza de modo intercambiable con gen, ADNc, ARNm, oligonucleótido, y polinucleótido.

30 Los términos “polipéptido”, “péptido” y “proteína” se emplean en la presente memoria de modo intercambiable para referirse a un polímero de restos de aminoácidos. Los términos se aplican a polímeros de aminoácidos en los que uno o más restos de aminoácidos son un mimético químico artificial de un aminoácido de origen natural correspondiente, así como a polímeros de aminoácidos de origen natural y polímeros de aminoácidos de origen no natural.

35 Como se utiliza en la presente memoria, “alquilo”, así como otros grupos que tienen el prefijo “alk”, tales como, por ejemplo, alcoxi, alcanilo, alqueno, alquino y similares, significa cadenas de carbono que pueden ser lineales o ramificadas, o sus combinaciones. Ejemplos de grupos alquilo incluyen metilo, etilo, propilo, isopropilo, butilo, sec- y terc-butilo, pentilo, hexilo, heptilo y similares. Los grupos alquilo preferidos tienen 1-4 carbonos. “Alqueno” y otros términos similares incluyen cadenas de carbono que contienen al menos un enlace carbono-carbono insaturado. “Alquino” y otros términos similares incluyen cadenas de carbono que contienen al menos un triple enlace carbono-carbono.

40 El término “cicloalquilo” se refiere a carbociclos que no contienen heteroátomos, e incluye carbociclos mono-, bi- y tricíclico saturados, así como sistemas anulares condensados. Ejemplos de cicloalquilo incluyen ciclobutilo, ciclopentilo, ciclohexilo, decahidronaftaleno, adamantano, indanilo, indenilo, fluorenilo, 1,2,3,4-tetrahidronaftaleno y similares.

45 El término “arilo” significa un sustituyente aromático que es un solo anillo o múltiples anillos condensados juntos. Los grupos arilo ejemplares incluyen, sin limitación, grupos fenilo, naftilo, antraceno, piridinilo, pirazinilo, pirimidinilo, triazinilo, tiofenilo, furanilo, pirrolilo, oxazolilo, imidazolilo, triazolilo, y tetrazolilo. Los grupos arilo que contienen uno o más heteroátomos (por ejemplo piridinilo) se denominan a menudo como “grupos heteroarilo”. Cuando están formados de múltiples anillos, al menos uno de los anillos constituyentes es aromático. En algunas realizaciones, al menos uno de los múltiples anillos comprende un heteroátomo, formando de ese modo grupos arilo que contienen heteroátomo. Los grupos arilo que contienen heteroátomo incluyen, sin limitación, grupos benzoxazolilo,

- bencimidazolilo, quinoxalinilo, benzofuranilo, y 1H-benzo[d][1,2,3]triazolilo. Los grupos arilo que contienen heteroátomo incluyen también, sin limitación, grupos 2,3-dihidrobenzo[b][1,4]dioxinilo y benzo[d][1,3]dioxolilo. Los grupos arilo que contienen heteroátomo incluyen también anillos aromáticos condensados a un anillo heterocíclico que comprende al menos un heteroátomo y al menos un grupo carbonilo. Tales grupos incluyen, sin limitación, grupos dioxotetrahydroquinoxalinilo y dioxotetrahydroquinazolinilo.
- 5 El término “arilalcoxi” se refiere a un grupo arilo enlazado a un grupo alcoxi.
- El término “arilamidoalquilo” se refiere a un aril-C(O)NR-alquilo o aril-NRC(O)-alquilo.
- El término “arilalquilamidoalquilo” se refiere a un aril-alquil-C(O)NR-alquilo o aril-alquil-NRC(O)-alquilo, en los que R es cualquier grupo adecuado enunciado más abajo.
- 10 El término “arilalquilo” se refiere a un grupo arilo enlazado a un grupo alquilo.
- El término “halógeno” o “halo” se refiere a cloro, bromo, flúor o yodo.
- El término “grupo saliente” se refiere a un grupo o átomo funcional que se puede desplazar por otro grupo o átomo funcional en una reacción de sustitución, tal como una reacción de sustitución nucleófila. A título de ejemplo, los grupos salientes representativos incluyen grupos cloro, bromo y yodo; grupos éster sulfónico, tal como mesilato, tosilato, brosilato, nosilato y similares; y grupos aciloxi, tal como acetoxi, trifluoroacetoxi y similares.
- 15 El término “haloalquilo” se refiere a un grupo alquilo que tiene uno o más átomos de halógeno (por ejemplo, CF<sub>3</sub>).
- El término “heteroalquilo” se refiere a un resto alquilo que comprende un heteroátomo tal como N, O, P, B, S, o Si. El heteroátomo puede estar conectado al resto del resto heteroalquílico mediante un enlace saturado o insaturado. De este modo, un alquilo sustituido con un grupo, tal como heterocicloalquilo, heterocicloalquilo sustituido, heteroarilo, heteroarilo sustituido, alcoxi, ariloxi, borilo, fosfino, amino, sililo, tio, o seleno, está dentro del alcance del término heteroalquilo. Ejemplos de heteroalquilos incluyen, pero no se limitan a, ciano, benzoílo, 2-piridilo y 2-furilo.
- 20 El término “heteroarilalquilo” se refiere a un grupo heteroarilo al que está enlazado un grupo alquilo.
- El término “heterociclo” se refiere a un anillo monocíclico o policíclico que comprende átomos de carbono y de hidrógeno, que tiene opcionalmente 1 o 2 múltiples enlaces, y los átomos anulares contienen al menos un heteroátomo, específicamente 1 a 4 heteroátomos, seleccionados independientemente de nitrógeno, oxígeno, y azufre. Las estructuras de anillos heterocíclicos incluyen, pero no se limitan a, compuestos mono-, bi-, y tricíclicos. Heterociclos específicos son monocíclicos o bicíclicos. Heterociclos representativos incluyen ureas cíclicas, morfolinilo, pirrolidinonilo, pirrolidinilo, piperidinilo, piperazinilo, hidantoinilo, valerolactamilo, oxiranilo, oxetanilo, tetrahydrofuranilo, tetrahydropiranilo, tetrahydropiridinilo, tetrahydroprimidinilo, tetrahydrotiofenilo, tetrahydrotiopiranilo, tetrazolilo, y urazolilo. Un anillo heterocíclico puede estar no sustituido o sustituido. Heterociclos preferidos son heterociclos de 5 o 6 miembros, particularmente hidantoinilo y urazolilo.
- 25 El término “heterocicloalquilo” se refiere a un grupo cicloalquilo en el que al menos uno de los átomos de carbono en el anillo está reemplazado por un heteroátomo (por ejemplo, O, S o N).
- El término “heterocicloalquilalquilo” significa un grupo heterocicloalquilo al que está enlazado un grupo alquilo.
- 35 El término “sustituido” concibe específicamente y permite una o más sustituciones que son habituales en la técnica. Sin embargo, se entiende generalmente por los expertos en la técnica que los sustituyentes deberían de seleccionarse para no afectar de forma adversa a las características útiles del compuesto, o interferir de forma adversa con su función. Los sustituyentes adecuados pueden incluir, por ejemplo, grupos halo, grupos perfluoroalquilo, grupos perfluoroalcoxi, grupos alquilo, grupos alqueno, grupos alquino, grupos hidroxilo, grupos oxo, grupos mercapto, grupos alquiltio, grupos alcoxi, grupos arilo o heteroarilo, grupos ariloxi o heteroariloxi, grupos aralquilo o heteroaralquilo, grupos aralcoxi o heteroaralcoxi, grupos amino, grupos alquil- y dialquilamino, grupos carbamoilo, grupos alquilcarbonilo, grupos carboxilo, grupos alcocarbonilo, grupos alquilaminocarbonilo, grupos dialquilaminocarbonilo, grupos arilcarbonilo, grupos ariloxycarbonilo, grupos alquilsulfonilo, grupos arilsulfonilo, grupos cicloalquilo, grupos ciano, grupos alquil C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>-tio, grupos ariltio, grupos nitro, grupos ceto, grupos acilo, grupos boronato o boronilo, grupos fosfato o fosfonilo, grupos sulfamilo, grupos sulfonilo, grupos sulfino, y combinaciones de los mismos. En el caso de combinaciones sustituidas, tales como “arilalquilo sustituido”, el grupo arilo o el grupo alquilo puede estar sustituido, o tanto el grupo arilo como el grupo alquilo pueden estar sustituidos con uno o más sustituyentes. Adicionalmente, en algunos casos, los sustituyentes adecuados se pueden combinar para formar uno o más anillos como es conocido por los expertos en la técnica.
- 40 El término “sustituido” concibe específicamente y permite una o más sustituciones que son habituales en la técnica. Sin embargo, se entiende generalmente por los expertos en la técnica que los sustituyentes deberían de seleccionarse para no afectar de forma adversa a las características útiles del compuesto, o interferir de forma adversa con su función. Los sustituyentes adecuados pueden incluir, por ejemplo, grupos halo, grupos perfluoroalquilo, grupos perfluoroalcoxi, grupos alquilo, grupos alqueno, grupos alquino, grupos hidroxilo, grupos oxo, grupos mercapto, grupos alquiltio, grupos alcoxi, grupos arilo o heteroarilo, grupos ariloxi o heteroariloxi, grupos aralquilo o heteroaralquilo, grupos aralcoxi o heteroaralcoxi, grupos amino, grupos alquil- y dialquilamino, grupos carbamoilo, grupos alquilcarbonilo, grupos carboxilo, grupos alcocarbonilo, grupos alquilaminocarbonilo, grupos dialquilaminocarbonilo, grupos arilcarbonilo, grupos ariloxycarbonilo, grupos alquilsulfonilo, grupos arilsulfonilo, grupos cicloalquilo, grupos ciano, grupos alquil C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>-tio, grupos ariltio, grupos nitro, grupos ceto, grupos acilo, grupos boronato o boronilo, grupos fosfato o fosfonilo, grupos sulfamilo, grupos sulfonilo, grupos sulfino, y combinaciones de los mismos. En el caso de combinaciones sustituidas, tales como “arilalquilo sustituido”, el grupo arilo o el grupo alquilo puede estar sustituido, o tanto el grupo arilo como el grupo alquilo pueden estar sustituidos con uno o más sustituyentes. Adicionalmente, en algunos casos, los sustituyentes adecuados se pueden combinar para formar uno o más anillos como es conocido por los expertos en la técnica.
- 45 Los compuestos descritos en la presente memoria contienen uno o más dobles enlaces, y de este modo pueden dar lugar a isómeros cis/trans así como a otros isómeros conformacionales. La presente invención incluye todos los isómeros posibles citados, así como mezclas de tales isómeros.
- 50 Los compuestos descritos en la presente memoria, particularmente los sustituyentes descritos anteriormente, pueden contener uno o más centros asimétricos, y de este modo pueden dar lugar a diastereómeros e isómeros

ópticos. La presente invención incluye todos los diastereómeros posibles citados así como sus mezclas racémicas, sus enantiómeros resueltos sustancialmente puros, todos los isómeros geométricos posibles, y sus sales aceptables. Además, también se incluyen mezclas de estereoisómeros así como estereoisómeros específicos aislados. Durante el transcurso de los procedimientos sintéticos utilizados para preparar tales compuestos, o en el uso de procedimientos de racemización o epimerización conocidos por los expertos en la técnica, los productos de tales procedimientos pueden ser una mezcla de estereoisómeros.

Como se utiliza en la presente memoria, las expresiones “sales” y “sales farmacéuticamente aceptables” se refieren a derivados de los compuestos descritos, en los que el compuesto parental se modifica obteniendo sus sales de ácidos o de bases. Los ejemplos de sales farmacéuticamente aceptables incluyen, pero no se limitan a, sales de ácidos minerales u orgánicos de grupos básicos tales como aminas; sales alcalinas u orgánicas de grupos ácidos tales como ácidos carboxílicos. Las sales farmacéuticamente aceptables incluyen las sales no tóxicas convencionales o las sales de amonio cuaternario del compuesto parental formadas, por ejemplo, a partir de ácidos inorgánicos u orgánicos no tóxicos. Por ejemplo, tales sales no tóxicas convencionales incluyen las derivadas de ácidos inorgánicos tales como clorhídrico, bromhídrico, sulfúrico, sulfámico, fosfórico, y nítrico; y las sales preparadas de ácidos orgánicos tales como acético, propiónico, succínico, glicólico, esteárico, láctico, málico, tartárico, cítrico, ascórbico, pamoico, maleico, hidroximaleico, fenilacético, glutámico, benzoico, salicílico, sulfanílico, 2-acetoxibenzoico, fumárico, toluenosulfónico, metanosulfónico, etanodisulfónico, oxálico, e isetiónico, y similares.

Las sales farmacéuticamente aceptables de la presente invención se pueden sintetizar a partir del compuesto parental que contiene un resto básico o ácido por medios químicos convencionales. Generalmente, tales sales se pueden preparar haciendo reaccionar las formas de ácido o de base libres de estos compuestos con una cantidad estequiométrica de la base o ácido apropiado en agua o en un disolvente orgánico, o en una mezcla de los dos; generalmente, se prefieren medios no acuosos tales como éter, acetato de etilo, etanol, isopropanol, o acetonitrilo. Se encuentran listas de sales adecuadas en Remington's Pharmaceutical Sciences, 17<sup>a</sup> ed., Mack Publishing Company, Easton, Pa., 1985, p. 14 18.

El término “solvato” significa un compuesto, o una sal del mismo, que incluye además una cantidad estequiométrica o no estequiométrica de disolvente unido mediante fuerzas intermoleculares no covalentes. Cuando el disolvente es agua, el solvato es un hidrato.

El término “profármaco” significa un derivado de un compuesto que se puede hidrolizar, oxidar, o de otro modo reaccionar en condiciones biológicas (*in vitro* o *in vivo*) para proporcionar un compuesto activo, particularmente un compuesto de la invención. Los ejemplos de profármacos incluyen, pero no se limitan a, derivados y metabolitos de un compuesto de la invención que incluye restos biohidrolizables tales como amidas biohidrolizables, ésteres biohidrolizables, carbamatos biohidrolizables, carbonatos biohidrolizables, ureidos biohidrolizables, y análogos de fosfato biohidrolizables. Los profármacos específicos de compuestos con grupos funcionales carboxílicos son los ésteres de alquilos inferiores del ácido carboxílico. Los ésteres de carboxilato se forman convenientemente esterificando cualquiera de los restos de ácido carboxílico presentes en la molécula. Los profármacos se pueden preparar típicamente utilizando métodos bien conocidos, tales como los descritos por Burger's Medicinal Chemistry and Drug Discovery 6<sup>o</sup> ed. (Donald J. Abraham ed., 2001, Wiley) y Design and Application of Prodrugs (H. Bundgaard ed., 1985, Harwood Academic Publishers Gmfh).

Como se utiliza en la presente memoria, y excepto que se indique de otro modo, las expresiones “amida biohidrolizable”, “éster biohidrolizable”, “carbamato biohidrolizable”, “carbonato biohidrolizable”, “ureido biohidrolizable”, “fosfato biohidrolizable” significan una amida, éster, carbamato, carbonato, ureido, o fosfato, respectivamente de un compuesto que: 1) no interfiere con la actividad biológica del compuesto sino que puede conferir a ese compuesto propiedades ventajosas *in vivo*, tal como captación, duración de acción, o comienzo de acción; o 2) es biológicamente inactivo pero se convierte *in vivo* en el compuesto biológicamente activo. Los ejemplos de ésteres biohidrolizables incluyen, pero no se limitan a, ésteres de alquilos inferiores, ésteres de alcoxiaciloxi, ésteres de alquilamilinoalquilo, y ésteres de colina. Los ejemplos de amidas biohidrolizables incluyen, pero no se limitan a, amidas de alquilos inferiores, amidas de alfa-aminoácidos, amidas de alcoxiacilo, y amidas de alquilaminoalquilcarbonilo. Los ejemplos de carbamatos biohidrolizables incluyen, pero no se limitan a, alquilaminas inferiores, etilendiaminas sustituidas, aminoácidos, hidroxialquilaminas, aminas heterocíclicas y heteroaromáticas, y politeraminas.

Como se utiliza en la presente memoria, la expresión “su análogo” en el contexto de los compuestos descritos en la presente memoria incluye diastereómeros, hidratos, solvatos, sales, profármacos, y N-óxidos de los compuestos.

El “dominio de translocación”, la “región de unión al ligando”, y las composiciones de receptores quiméricos descritos en la presente memoria también incluyen “análogos”, o “variantes conservativas” y “miméticos” (“peptidomiméticos”) con unas estructuras y una actividad que corresponden sustancialmente a las secuencias ejemplares. Así, la expresión “variante conservativa” o los términos “análogo” o “mimético” se refieren a un polipéptido que tiene una secuencia de aminoácidos modificada, de forma que el cambio o cambios no alteran sustancialmente la estructura y/o la actividad del polipéptido (la variante conservativa), según se define en la presente memoria. Estos incluyen variaciones modificadas de forma conservativa de una secuencia de aminoácidos, es decir, sustituciones, adiciones o supresiones de aminoácidos de aquellos restos que no son críticos para la actividad de la proteína, o la sustitución

de aminoácidos por restos que tienen propiedades similares (por ejemplo, ácidos, básicos, cargados positiva o negativamente, polares o no polares, etc.), de forma que incluso las sustituciones de aminoácidos críticos no alteran sustancialmente la estructura y/o la actividad.

5 Más particularmente, la expresión “variantes modificadas de forma conservativa” se aplica a secuencias tanto de aminoácidos como de ácidos nucleicos. Con respecto a secuencias de ácidos nucleicos particulares, las variantes modificadas de forma conservativa se refieren a aquellos ácidos nucleicos que codifican secuencias de aminoácidos idénticas o fundamentalmente idénticas, o cuando el ácido nucleico no codifica una secuencia de aminoácidos, a secuencias esencialmente idénticas. Debido a la degeneración del código genético, un gran número de ácidos nucleicos funcionalmente idénticos codifican cualquier proteína dada.

10 Por ejemplo, todos los codones GCA, GCC, GCG y GCU codifican el aminoácido alanina. Así, en cada posición en la que un codón especifica una alanina, el codón puede alterarse a cualquiera de los correspondientes codones descritos sin alterar el polipéptido codificado.

15 Estas variaciones en los ácidos nucleicos son “variaciones silenciosas”, que son un tipo de variaciones modificadas de forma conservativa. Cada secuencia de ácido nucleico de la presente memoria que codifica un polipéptido también describe cualquier variación silenciosa posible del ácido nucleico. Un experto reconocerá que cada codón en un ácido nucleico (excepto AUG, que normalmente es el único codón para la metionina, y TGG, que normalmente es el único codón para el triptófano) puede modificarse para producir una molécula funcionalmente idéntica. Por consiguiente, cada variación silenciosa de un ácido nucleico que codifica un polipéptido está implícita en cada secuencia descrita.

20 Las tablas de sustituciones conservativas que proporcionan aminoácidos funcionalmente similares son muy conocidas en la técnica. Por ejemplo, una guía ejemplar para seleccionar sustituciones conservativas incluye (el resto original seguido de la sustitución ejemplar): ala/gly o ser; arg/lys; asn/gln o his; asp/glu; cys/ser; gln/asn; gly/asp; gly/ala o pro; his/asn o gln; ile/leu o val; leu/ile o val; lys/arg o gln o glu; met/leu o tyr o ile; phe/met o leu o tyr; ser/thr; thr/ser; trp/tyr; tyr/trp o phe; val/ile o leu. Una guía ejemplar alternativa emplea los siguientes seis grupos, conteniendo cada uno los aminoácidos que son sustituciones conservativas entre sí: 1) alanina (A), serina (S), treonina (T); 2) ácido aspártico (D), ácido glutámico (E); 3) asparagina (N), glutamina (Q); 4) arginina (R), lisina (I); 5) isoleucina (I), leucina (L), metionina (M), valina (V); y 6) fenilalanina (F), tirosina (Y), triptófano (W) (véase también por ejemplo, Creighton, *Proteins*, W.H. Freeman and Company (1984); Schultz y Schimer, *Principles of Protein Structure*, Springer-Verlag (1979)). Un experto en la técnica apreciará que las sustituciones identificadas anteriormente no son las únicas sustituciones conservativas posibles. Por ejemplo, para algunos fines, se pueden considerar todos los aminoácidos cargados como sustituciones conservativas entre sí, tanto si son positivos como negativos. Además, las sustituciones, supresiones o adiciones individuales que alteran, añaden o suprimen un único aminoácido o un pequeño porcentaje de aminoácidos en una secuencia codificada también pueden considerarse “variaciones modificadas de forma conservativa”.

35 Los términos “mimético” y “peptidomimético” se refieren a un compuesto químico sintético que tiene sustancialmente las mismas características estructurales y/o funcionales de los polipéptidos, por ejemplo dominios de translocación, regiones de unión al ligando, o receptores quiméricos de la invención. El mimético puede estar totalmente compuesto de análogos de aminoácidos no naturales, sintéticos, o puede ser una molécula quimérica de aminoácidos peptídicos parcialmente naturales y análogos parcialmente no naturales de aminoácidos. El mimético también puede incorporar cualquier cantidad de sustituciones conservativas de aminoácidos naturales, siempre que dichas sustituciones tampoco alteren sustancialmente la estructura y/o la actividad del mimético.

45 Al igual que con los polipéptidos de la invención que son variantes conservativas, la experimentación habitual determinará si un mimético está dentro del alcance de la invención, es decir, que su estructura y/o su función no están sustancialmente alteradas. Las composiciones de miméticos de polipéptidos pueden contener cualquier combinación de componentes estructurales no naturales, que típicamente pertenecen a tres grupos estructurales: a) grupos de enlace de restos distintos de los enlaces mediante enlace amídico naturales (“enlace peptídico”); b) restos no naturales en lugar de restos de aminoácidos de origen natural; o c) restos que inducen una imitación estructural secundaria, es decir, para inducir o estabilizar una estructura secundaria, por ejemplo una conformación de giro beta, giro gamma, lámina beta, hélice alfa, y similares. Un polipéptido puede caracterizarse como un mimético cuando todos o parte de sus restos están unidos por medios químicos distintos de los enlaces peptídicos naturales. Los restos de los peptidomiméticos individuales pueden estar unidos mediante enlaces peptídicos, otros enlaces químicos o medios de acoplamiento tales como, por ejemplo, glutaraldehído, ésteres de N-hidroxisuccinimida, maleimidias bifuncionales, N,N'-díciclohexilcarbodiimida (DCC) o N,N'-diisopropilcarbodiimida (DIC). Los grupos conectores que pueden ser una alternativa a los enlaces de enlace de amida tradicional (“enlace peptídico”) incluyen, por ejemplo, cetometileno (por ejemplo, -C(=O)-CH<sub>2</sub>- para -C(=O)-NH-), aminometileno (CH<sub>2</sub>-NH), etileno, olefina (CH=CH), éter (CH<sub>2</sub>O), tioéter (CH<sub>2</sub>-S), tetrazol (CN<sub>4</sub>), tiazol, retroamida, tioamida, o éster (véase, por ejemplo, Spatola, *Chemistry and Biochemistry of Amino Acids, Peptides and Proteins*, vol. 7, 267-357, *Peptide Backbone Modifications*, N.Y. (1983)). Un polipéptido también puede caracterizarse como un mimético porque contiene todos o algunos restos no naturales en lugar de restos de aminoácidos de origen natural; los restos no naturales están bien descritos en la bibliografía científica y de patentes.

Un “marcador” o un “resto detectable” es una composición detectable por medios espectroscópicos, fotoquímicos, bioquímicos, inmunquímicos, o químicos. Por ejemplo, los marcadores útiles incluyen <sup>32</sup>P, colorantes fluorescentes, reactivos electrodenso, enzimas (por ejemplo, como se emplean habitualmente en un ELISA), biotina, digoxigenina, o haptenos y proteínas que pueden hacerse detectables, por ejemplo, incorporando un marcador radiactivo en el péptido, o utilizarse para detectar anticuerpos específicamente reactivos con el péptido.

Un “oligonucleótido o sonda de ácido nucleico marcado” es aquel que está unido, ya sea covalentemente, a través de un conector o un enlace químico, o no covalentemente, a través de enlaces iónicos, de van der Waals, electrostáticos o de hidrógeno, a un marcador de forma que la presencia de la sonda puede detectarse mediante la detección de la presencia del marcador unido a la sonda.

Tal como se emplea en la presente memoria, un “oligonucleótido o sonda de ácido nucleico” se define como un ácido nucleico capaz de unirse a un ácido nucleico diana de secuencia complementaria a través de uno o más tipos de enlaces químicos, habitualmente a través de apareamiento de bases complementarias, habitualmente a través de la formación de enlaces de hidrógeno. Tal como se emplea en la presente memoria, una sonda puede incluir bases naturales (es decir, A, G, C o T) o modificadas (7-desazaguanosina, inosina, etc.). Además, las bases en una sonda pueden estar unidas mediante un enlace distinto de un enlace fosfodiéster, con la condición de que no interfiera con la hibridación. Así, por ejemplo, las sondas pueden ser ácidos nucleicos peptídicos en los que las bases constituyentes están unidas por enlaces peptídicos en lugar de enlaces fosfodiéster. Los expertos en la técnica entenderán que las sondas pueden unirse a secuencias diana que carezcan de complementariedad completa con la secuencia de la sonda, dependiendo de la rigurosidad de las condiciones de hibridación. Opcionalmente, las sondas se marcan directamente por ejemplo con isótopos, cromóforos, lumíforos, cromógenos, o se marcan indirectamente tal como con biotina, a la cual puede unirse después un complejo de estreptavidina. Mediante el ensayo de la presencia o la ausencia de la sonda, se puede detectar la presencia o la ausencia de la secuencia o subsecuencia seleccionada.

El término “heterólogo”, cuando se emplea en referencia a porciones de un ácido nucleico, indica que el ácido nucleico comprende dos o más subsecuencias que no se encuentran en la misma relación entre sí en la naturaleza. Por ejemplo, el ácido nucleico típicamente se produce de modo recombinante, y tiene dos o más secuencias procedentes de genes no relacionados dispuestos para fabricar un nuevo ácido nucleico funcional, por ejemplo, un promotor procedente de una fuente y una región codificante procedente de otra fuente. De manera similar, una proteína heteróloga indica que la proteína comprende dos o más subsecuencias que no se encuentran en la misma relación entre sí en la naturaleza (por ejemplo, una proteína de fusión).

Un “promotor” se define como un conjunto de secuencias de ácidos nucleicos que dirigen la transcripción de un ácido nucleico. Tal como se emplea en la presente memoria, un promotor incluye las secuencias de ácidos nucleicos necesarias cerca del sitio de inicio de la transcripción, tal como, en el caso de un promotor de tipo polimerasa II, un elemento TATA. Un promotor también incluye opcionalmente elementos potenciadores o represores distales, que pueden localizarse tan lejos como varias miles de pares de bases del sitio de inicio de la transcripción. Un promotor “constitutivo” es un promotor que es activo bajo la mayoría de las condiciones ambientales y de desarrollo.

Un promotor “inducible” es un promotor que es activo bajo regulación ambiental o de desarrollo. La expresión “unido operablemente” se refiere a un enlace funcional entre una secuencia de control de la expresión del ácido nucleico (tal como un promotor, o un conjunto de sitios de unión al factor de transcripción) y una segunda secuencia de ácido nucleico, en el que la secuencia de control de la expresión dirige la transcripción del ácido nucleico correspondiente a la segunda secuencia.

Tal como se emplea en la presente memoria, “recombinante” se refiere a un polinucleótido sintetizado o manipulado de otro modo in vitro (por ejemplo, un “polinucleótido recombinante”), a métodos para utilizar los polinucleótidos recombinantes para producir productos génicos en células u otros sistemas biológicos, o a un polipéptido (una “proteína recombinante”) codificado por un polinucleótido recombinante. Un “medio recombinante” también engloba la ligación de ácidos nucleicos que tienen diversas regiones codificantes o dominios o secuencias promotoras procedentes de diferentes fuentes en un casete de expresión o vector para la expresión, por ejemplo, la expresión inducible o constitutiva de una proteína de fusión que comprende un dominio de translocación de la invención y una secuencia de ácido nucleico amplificada utilizando un cebador de la invención.

La expresión “se hibrida selectivamente (o específicamente) a” se refiere a la unión, la formación de dúplex o la hibridación de una molécula solamente a una secuencia nucleotídica particular bajo condiciones de hibridación restrictivas cuando esta secuencia está presente en una mezcla compleja (por ejemplo, ADN o ARN celular total o de biblioteca).

La expresión “condiciones de hibridación restrictivas” se refiere a condiciones bajo las cuales una sonda se hibridará a su subsecuencia diana, típicamente en una mezcla compleja de ácidos nucleicos, pero a ninguna otra secuencia. Las condiciones restrictivas dependen de la secuencia y serán diferentes en circunstancias diferentes. Las secuencias más largas se hibridan específicamente a temperaturas más altas. Una guía exhaustiva acerca de la hibridación de ácidos nucleicos se encuentra en Tijssen, Techniques in Biochemistry and Molecular Biology - Hybridization with Nucleic Probes, “Overview of principles of hybridization and the strategy of nucleic acid assays”

(1993). En general, las condiciones restrictivas se seleccionan para que sean aproximadamente 5-10°C más bajas que el punto de fusión térmico ( $T_m$ ) para la secuencia específica a un pH y fuerza iónica definidos. La  $T_m$  es la temperatura (bajo una fuerza iónica, pH y concentración de ácidos nucleicos definidos) en la que 50% de las sondas complementarias a la diana se hibridan a la secuencia diana en el equilibrio (puesto que las secuencias diana están presentes en exceso, a la  $T_m$ , 50% de las sondas están ocupadas en el equilibrio). Las condiciones restrictivas serán aquellas en las que la concentración salina es menor que aproximadamente 1,0 M de ion sodio, típicamente de aproximadamente 0,01 a 1,0 M de concentración de ion sodio (u otras sales) a un pH 7,0 a 8,3, y la temperatura es al menos aproximadamente 30°C para sondas cortas (por ejemplo, 10 a 50 nucleótidos) y al menos aproximadamente 60°C para sondas largas (por ejemplo, mayores que 50 nucleótidos). Las condiciones restrictivas también pueden lograrse con la adición de agentes desestabilizantes, tales como formamida. Para una hibridación selectiva o específica, una señal positiva es al menos dos veces el fondo, opcionalmente 10 veces la hibridación de fondo. Las condiciones de hibridación restrictivas ejemplares pueden ser las siguientes: formamida al 50%, 5x SSC, y SDS al 1%, incubación a 42°C, o 5x SSC, SDS al 1%, incubación a 65°C, con lavado en 0,2x SSC, y SDS al 0,1% a 65°C. Tales hibridaciones y etapas de lavado pueden realizarse durante, por ejemplo, 1, 2, 5, 10, 15, 30, 60 o más minutos.

Los ácidos nucleicos que no se hibridan entre sí bajo condiciones restrictivas siguen estando sustancialmente relacionados si los polipéptidos que codifican están sustancialmente relacionados. Esto ocurre, por ejemplo, cuando una copia de un ácido nucleico se crea utilizando la máxima degeneración de codones permitida por el código genético. En estos casos, los ácidos nucleicos típicamente se hibridan bajo condiciones de hibridación moderadamente restrictivas. Las "condiciones de hibridación moderadamente restrictivas" ejemplares incluyen una hibridación en un tampón de formamida al 40%, NaCl 1 M, SDS al 1% a 37°C, y un lavado en 1x SSC a 45°C. Tales hibridaciones y etapas de lavado pueden realizarse durante, por ejemplo, 1, 2, 5, 10, 15, 30, 60 o más minutos. Una hibridación positiva es al menos el doble del fondo. Los expertos normales reconocerán con facilidad que pueden utilizarse otras condiciones de hibridación y lavado para proporcionar condiciones de restricción similar.

Un "anticuerpo" se refiere a un polipéptido que comprende una región de marco procedente de un gen de inmunoglobulina, o sus fragmentos, que se une específicamente y reconoce un antígeno. Los genes de inmunoglobulina reconocidos incluyen los genes de las regiones constantes kappa, lambda, alfa, gamma, delta, épsilon, y mu, así como la miríada de genes de la región variable de inmunoglobulinas. Las cadenas ligeras se clasifican como kappa o lambda. Las cadenas pesadas se clasifican como gamma, mu, alfa, delta o épsilon, que a su vez definen las clases de inmunoglobulinas, IgG, IgM, IgA, IgD e IgE, respectivamente.

Una unidad estructural de inmunoglobulina (anticuerpo) ejemplar comprende un tetrámero. Cada tetrámero está compuesto por dos parejas idénticas de cadenas polipeptídicas, teniendo cada pareja una cadena "ligera" (aproximadamente 25 kDa) y una cadena "pesada" (aproximadamente 50-70 kDa). El término N de cada cadena define una región variable de aproximadamente 100 a 110 o más aminoácidos principalmente responsables del reconocimiento del antígeno. Las expresiones cadena ligera variable ( $V_L$ ) y cadena pesada variable ( $V_H$ ) se refieren a estas cadenas ligeras y pesadas respectivamente.

Un "anticuerpo quimérico" es una molécula de anticuerpo en la que (a) la región constante, o una porción de ésta, está alterada, reemplazada o intercambiada de modo que el sitio de unión al antígeno (región variable) está unido a una región constante de una clase, función efectora y/o especie diferente o alterada, o una molécula completamente diferente que confiere nuevas propiedades al anticuerpo quimérico, por ejemplo una enzima, toxina, hormona, factor del crecimiento, fármaco, etc.; o (b) la región variable, o una porción de ésta, está alterada, reemplazada o intercambiada con una región variable que tiene una especificidad por el antígeno diferente o alterada.

Un anticuerpo "anti-T2R" es un anticuerpo o un fragmento de anticuerpo que se une específicamente a un polipéptido codificado por un gen T2R, ADNc o una subsecuencia de estos.

El término "inmunoensayo" es un ensayo que emplea un anticuerpo para que se una específicamente a un antígeno. El inmunoensayo se caracteriza por el uso de las propiedades de unión específica de un anticuerpo concreto para aislar, dirigirse a y/o cuantificar el antígeno.

La expresión "se une específicamente (o selectivamente)" a un anticuerpo, o "es específicamente (o selectivamente) inmunorreactivo con", cuando se refiere a una proteína o a un péptido, se refiere a una reacción de unión que es determinativa de la presencia de la proteína en una población heterogénea de proteínas y otros compuestos biológicos. Así, bajo unas condiciones de inmunoensayo determinadas, los anticuerpos especificados se unen a una proteína concreta en al menos dos veces el fondo, y no se unen sustancialmente en una cantidad significativa a otras proteínas presentes en la muestra. La unión específica a un anticuerpo bajo estas condiciones puede requerir un anticuerpo que se selecciona por su especificidad por una proteína concreta.

Por ejemplo, pueden seleccionarse anticuerpos policlonales generados contra un miembro de la familia de T2R a partir de una especie específica, tal como rata, ratón o ser humano, para obtener sólo los anticuerpos policlonales que sean específicamente inmunorreactivos con el polipéptido de T2R o una porción inmunogénica de éste, y no con otras proteínas, excepto por ortólogos o variantes polimórficas y alelos del polipéptido de T2R. Esta selección puede lograrse extrayendo los anticuerpos que presentan reacción cruzada con moléculas de T2R de otras especies u

otras moléculas de T2R. También pueden seleccionarse anticuerpos que reconozcan sólo a miembros de la familia de GPCR T2R pero no a GPCRs de otras familias.

5 Puede emplearse una diversidad de formatos de inmunoensayo para seleccionar anticuerpos específicamente inmunorreactivos con una proteína concreta. Por ejemplo, pueden utilizarse habitualmente inmunoensayos de ELISA en fase sólida para seleccionar anticuerpos específicamente inmunorreactivos con una proteína (véase, por ejemplo, Harlow y Lane, *Antibodies, A Laboratory Manual*, (1988), para una descripción de formatos y condiciones de inmunoensayos que pueden utilizarse para determinar la inmunorreactividad específica). Típicamente, una reacción específica o selectiva será al menos dos veces la señal o ruido de fondo, y más típicamente más de 10 a 100 veces el fondo.

10 La expresión “se asocia selectivamente con” se refiere a la capacidad de un ácido nucleico para “hibridarse selectivamente” con otro según se definió anteriormente, o la capacidad de un anticuerpo para “unirse selectivamente (o específicamente)” a una proteína, tal como se definió anteriormente.

15 La expresión “vector de expresión” se refiere a cualquier sistema de expresión recombinante con el objetivo de expresar una secuencia de ácido nucleico de la invención in vitro o in vivo, de manera constitutiva o inducible, en cualquier célula, incluyendo células procariotas, de levadura, fúngicas, vegetales, de insecto o de mamífero. La expresión incluye sistemas de expresión lineales o circulares. La expresión incluye sistemas de expresión que permanecen episómicos o se integran en el genoma de la célula hospedante. Los sistemas de expresión pueden tener la capacidad de autorreplicarse o no, es decir, dirigir sólo una expresión transitoria en una célula. La expresión incluye “casetes” de expresión recombinante, que contienen sólo los elementos mínimos necesarios para la transcripción del ácido nucleico recombinante.

20 Por “célula hospedante” se quiere decir una célula que contiene un vector de expresión y que apoya la replicación o la expresión del vector de expresión. Las células hospedantes pueden ser células procariotas, tales como *E. coli*, o células eucariotas, tales como células de levadura, de insecto, de anfibio, o de mamífero, tales como células CHO, HeLa, HEK-293 y similares, por ejemplo células cultivadas, explantes, y células in vivo.

25 Basándonos en lo anterior, la presente invención proporciona ensayos para identificar compuestos que modulan, preferiblemente bloquean, la activación específica del receptor del sabor amargo humano previamente identificado por compuestos amargos, por ejemplo compuestos amargos presentes en café y extractos derivados de él, y compuestos amargos estructuralmente relacionados y otros compuestos amargos. Particularmente, la invención proporciona ensayos basados en células para identificar compuestos que modulan (por ejemplo, bloquean) la activación de hT2R8 y hT2R14. Estos compuestos modularán el sabor amargo asociado con estos receptores gustativos en sujetos humanos. Esto se confirmará en pruebas de sabor.

30 También, la invención identifica y proporciona un antagonista con propiedades antagonistas de amplio alcance que se puede utilizar en alimentos, bebidas, medicamentos u otros materiales para la ingestión por seres humanos o por animales que contiene compuestos amargos conocidos y desconocidos, en los que el sabor amargo se minimiza o elimina de forma deseable.

35 Utilizando el sistema de expresión de HEK293 y métodos de formación de imágenes de calcio dados a conocer en otras publicaciones así como solicitudes de patentes presentadas por el presente cesionario, por ejemplo EE.UU. Serie nº 10/191.058 y 09/825.882, se determinó esencialmente que los receptores gustativos anteriores responden específicamente a compuesto o compuestos amargos presentes en el café y a compuestos amargos específicos que interactúan con un receptor del sabor amargo, o múltiples, o receptores desconocidos.

40 Más particularmente, los presentes inventores transfectaron células HEK293 con un hT2R particular etiquetado con una etiqueta de 35 aminoácidos de rodopsina (SEC ID NO:1) junto con una proteína G quimérica (G16gust44) que comprende la secuencia de proteína G  $G_{\alpha 16}$  modificada por la sustitución de restos de 44 aminoácidos carboxílicos por los de gustducina, y registraron respuestas de estas células a ligandos amargos específicos mediante métodos de formación de imágenes de calcio.

45 Específicamente, los inventores utilizaron un ensayo basado en células de mamífero para monitorizar las actividades de hT2R. Para ensayos de formación de imágenes de calcio, las células se sembraron en placas de cultivo tisular de 48 pocillos. 24 horas más tarde, las células se transfectaron transitoriamente con un plásmido de expresión (pEAK10) que contiene una secuencia de ácido nucleico de hT2R, y un plásmido (pEAK10) que contiene una proteína G quimérica (G16gust44). Otras 24 horas más tarde, las células se incubaron con un colorante fluorescente específico para calcio (Fluo-4; Molecular Probes). Las células cargadas se expusieron a diferentes moléculas amargas, y la activación de un hT2R conduce a la activación de G16gust44, que a su vez conduce a la movilización del calcio en el interior de las células. Este incremento en la concentración de calcio cambia las propiedades de fluorescencia del colorante de calcio en el interior de las células. Estos cambios se monitorizan utilizando microscopía de fluorescencia.

50 Los inventores también utilizaron el sistema de puntería fluorométrico automatizado FLIPR utilizando un protocolo ligeramente diferente. Una estirpe celular HEK293 que expresa de forma estable G16gust44 se transfectó con un plásmido de expresión de hT2R; 24 horas más tarde, las células se cargaron y se analizaron en el FLIPR.

Después de que se identificó un ligando para un hT2R particular, se generó una estirpe celular HEK293 que expresa de forma estable tanto el hT2R como G16gust44, facilitando ensayos de identificación futuros para identificar otros ligandos que activan el hT2R particular o que modulan (bloquean o potencian) la activación de este hT2R por otro ligando amargo, tal como un compuesto amargo contenido en el café. Esto evita la necesidad de transfección transitoria.

Como se muestra en las Figuras, tales experimentos revelaron que hT2R8 y hT2R14 responden a compuestos amargos presentes en el café y a compuestos identificados que inhiben o bloquean el sabor amargo del café. También, los experimentos en la Figura 5 y en el Ejemplo 3 más abajo revelan las propiedades antagonistas amplias del Compuesto C en particular.

Estos resultados indican que las células que identificaron receptores gustativos hT2R se pueden utilizar en ensayos para identificar ligandos que modulan el sabor amargo asociado con al menos uno de dichos hT2Rs particulares, así como ensayos para detectar compuestos responsables del sabor amargo.

Preferiblemente, estos ensayos utilizarán una célula de ensayo que expresa un ADN que codifica un hT2R que tiene una de las secuencias de aminoácidos identificadas más abajo. Sin embargo, se anticipa que en estos ensayos también serán útiles fragmentos, ortólogos, variantes o quimeras de estos polipéptidos del receptor que retienen las propiedades funcionales de estos receptores del sabor amargo, es decir, responden a algunos compuestos amargos. Los ejemplos de tales variantes incluyen variantes de ajuste, polimorfismos de un solo nucleótido, variantes alélicas, y mutaciones producidas por medios recombinantes o químicos, o de origen natural. Más abajo se exponen medios para el aislamiento y expresión de T2Rs, que se utilizan en los ensayos de la presente invención y en ensayos que se contemplan para la utilización en la presente invención para identificar compuestos que inhiben la activación de estos receptores.

#### Aislamiento y expresión de T2Rs

El aislamiento y la expresión de los T2Rs, o sus fragmentos o variantes, de la invención se puede efectuar mediante procedimientos de clonación bien establecidos utilizando sondas o cebadores construidos basándose en las secuencias de ácidos nucleicos de T2R descritas en la solicitud. Las secuencias de T2R relacionadas también se pueden identificar a partir de bases de datos genómicas de ser humano o de otras especies utilizando las secuencias descritas en la presente memoria y tecnologías de búsqueda basadas en ordenador conocidas, por ejemplo búsqueda de secuencias BLAST. En una realización particular, los pseudogenes descritos en la presente memoria se pueden utilizar para identificar alelos funcionales o genes relacionados.

Los vectores de expresión pueden entonces utilizarse para infectar o transfectar células hospedantes para la expresión funcional de estas secuencias. Estos genes y vectores pueden fabricarse y expresarse in vitro o in vivo. Un experto reconocerá que pueden obtenerse los fenotipos deseados para alterar y controlar la expresión de ácidos nucleicos mediante la modulación de la expresión o de la actividad de los genes y ácidos nucleicos (por ejemplo, promotores, potenciadores y similares) dentro de los vectores de la invención. Puede utilizarse cualquiera de los métodos descritos para aumentar o disminuir la expresión o la actividad. La invención puede practicarse junto con cualquier método o protocolo conocido en la técnica, que están bien descritos en la bibliografía científica y de patentes.

Como alternativa, estos ácidos nucleicos pueden sintetizarse in vitro mediante técnicas de síntesis química muy conocidas, según se describe, por ejemplo, en Carruthers, Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol., 47:411-418 (1982); Adams, Am. Chem. Soc., 105:661 (1983); Belousov, Nucleic Acids Res., 25:3440-3444 (1997); Frenkel, Free Radic. Biol. Med., 19:373-380 (1995); Blommers, Biochemistry, 33:7886-7896 (1994); Narang, Meth. Enzymol., 68:90 (1979); Brown, Meth. Enzymol. 68:109 (1979); Beaucage, Tetra. Lett., 22:1859 (1981); patente de EE.UU. nº 4.458.066. Los fragmentos de ADN bicatenario pueden obtenerse después sintetizando la hebra complementaria y reasociando las hebras entre sí bajo condiciones apropiadas, o añadiendo la hebra complementaria utilizando ADN polimerasa con una secuencia cebadora apropiada.

Las técnicas para la manipulación de ácidos nucleicos tales como, por ejemplo, para generar mutaciones en las secuencias, subclonación, marcaje de sondas, secuenciación, hibridación y similares, están bien descritas en la bibliografía científica y de patentes. Véase, por ejemplo, Sambrook, ed., Molecular Cloning: a Laboratory Manual (2ª ed.), Vols. 1-3, Cold Spring Harbor Laboratory (1989); Ausubel, ed., Current Protocols in Molecular Biology, John Wiley & Sons, Inc., Nueva York (1997); Tijssen, ed., Laboratory Techniques in Biochemistry and Molecular Biology: Hybridization With Nucleic Acid Probes, Parte I, Theory and Nucleic Acid Preparation, Elsevier, N.Y (1993).

Los ácidos nucleicos, vectores, cápsidas, polipéptidos y similares pueden analizarse y cuantificarse mediante cualquiera de una serie de medios generales muy conocidos por los expertos en la técnica. Estos incluyen, por ejemplo, métodos bioquímicos analíticos, tales como RMN, espectrofotometría, radiografía, electroforesis, electroforesis capilar, cromatografía de líquidos de alta resolución (HPLC), cromatografía de capa fina (TLC), y cromatografía de hiperdifusión, diversos métodos inmunológicos, por ejemplo, reacciones de precipitina fluidas o en gel, inmunodifusión, inmunoelectroforesis, radioinmunoensayos (RIAs), ensayos inmunoabsorbentes ligados a enzimas (ELISAs), ensayos inmunofluorescentes, análisis Southern, análisis Northern, análisis de la transferencia

por puntos, electroforesis en gel (por ejemplo, SDS-PAGE), RT-PCR, PCR cuantitativa, otros métodos de amplificación de señales, dianas o ácidos nucleicos, radiomarcaje, recuento de centelleo, y cromatografía de afinidad.

5 Pueden emplearse sondas oligonucleotídicas para amplificar ácidos nucleicos que codifican una región de unión al ligando de T2R. Los ácidos nucleicos descritos en la presente memoria también pueden clonarse o medirse cuantitativamente utilizando técnicas de amplificación. Los métodos de amplificación también son muy conocidos en la técnica e incluyen, por ejemplo, la reacción en cadena de la polimerasa, PCR (Innis ed., PCR Protocols, a Guide to Methods and Applications, Academic Press, N.Y (1990); Innis ed., PCR Strategies, Academic Press, Inc., N.Y (1995)); reacción en cadena de la ligasa (LCR) (Wu, Genomics, 4:560 (1989); Landegren, Science, 241:1077 (1988); Barringer, Gene, 89:117 (1990)); amplificación de la transcripción (Kwoh, PNAS, 86:1173 (1989)); replicación de secuencia autosostenida (Guatelli, PNAS, 87:1874 (1990)); amplificación de Q Beta replicasa (Smith, J. Clin. Microbiol., 35:1477-91 (1997)); ensayo de amplificación de Q-beta replicasa automatizado (Burg, Mol. Cell. Probes, 10:257-71 (1996)); y otras técnicas mediadas por ARN polimerasa (por ejemplo, NASBA, Cangene, Mississauga, Ontario). Véanse también, Berger, Methods Enzymol., 152:307-16 (1987); Sambrook; Ausubel; patentes de EE.UU. n<sup>os</sup> 4.683.195 y 4.683.202; Sooknanan, Biotechnology, 13:563-64 (1995).

Una vez amplificados, los ácidos nucleicos, de modo individual o en forma de biblioteca, pueden clonarse según métodos conocidos en la técnica, si se desea, en cualquiera de una diversidad de vectores utilizando métodos de biología molecular habituales; los métodos para clonar ácidos nucleicos amplificados in vitro se describen, por ejemplo, en la patente de EE.UU. n<sup>o</sup> 5.426.039. Para facilitar la clonación de secuencias amplificadas, se pueden "construir en" el par de cebadores de PCR sitios de enzimas de restricción. Por ejemplo, se diseñaron los sitios Pst I y Bsp E1 en los pares de cebadores ejemplares de la invención. Estos sitios de restricción concretos tienen una secuencia que, cuando se ligan, están "en el marco" con respecto a la secuencia codificante "donante" del receptor 7-membránico en la que se ajustan (la secuencia codificante de la región de unión al ligando es interna al polipéptido 7-membránico; de este modo, se desea que el constructo sea traducido en dirección 3' de un sitio de ajuste de la enzima de restricción, se deberían de evitar resultados fuera del marco; esto puede no ser necesario si la región de unión al ligando insertada comprende sustancialmente la mayoría de la región transmembránica VII). Los cebadores pueden diseñarse para que conserven la secuencia original del receptor 7-membránico "donante". Como alternativa, los cebadores pueden codificar restos de aminoácidos que son sustituciones conservativas (por ejemplo, un resto hidrófobo por un resto hidrófobo, véase la explicación anterior) o sustituciones funcionalmente benignas (por ejemplo, que no evitan la inserción en la membrana plasmática, ni provocan la ruptura por peptidasas, ni provocan el plegamiento anómalo del receptor, y similares).

Las parejas de cebadores pueden diseñarse para amplificar selectivamente regiones de unión al ligando de proteínas T2R. Estas regiones de unión pueden variar para diferentes ligandos; así, lo que podría ser una región de unión mínima para un ligando, puede ser demasiado limitante para un segundo ligando potencial. Así, pueden amplificarse regiones de unión de diferentes tamaños que comprenden diferentes estructuras de dominios; por ejemplo, dominios transmembránicos (TM) II a VII, III a VII, III a VI o II a VI, o sus variaciones (por ejemplo, sólo una subsecuencia de un dominio particular, mezclando el orden de los dominios, y similar), de un T2R 7-transmembránico.

Puesto que las estructuras y secuencias de dominio de muchas proteínas de T2R 7-membránicas son conocidas, el experto puede seleccionar fácilmente secuencias que flanquean el dominio y secuencias de dominio internas como secuencias modelo para diseñar pares de cebadores de amplificación degenerados. Por ejemplo, una secuencia de ácido nucleico que codifica las regiones II a VII de dominio se puede generar mediante amplificación por PCR utilizando un par de cebadores. Para amplificar un ácido nucleico que comprende una secuencia del dominio transmembránico I (TM I), se puede diseñar un cebador degenerado a partir de un ácido nucleico que codifica la secuencia de aminoácidos de la secuencia 1 de consenso descrita anteriormente de la familia de T2R. Tal cebador degenerado se puede utilizar para generar una región de unión que incorpora TM I a TM III, TM I a TM IV, TM I a TM V, TM I a TM VI, o TM I a TM VII). Otros cebadores degenerados se pueden diseñar basándose en otras secuencias de consenso de la familia de T2R proporcionadas aquí. Tal cebador degenerado se puede utilizar para generar una región de unión que incorpora TM III a TM IV, TM III a TM V, TM III a TM VI, o TM III a TM VII.

50 Los paradigmas para diseñar parejas de cebadores degenerados son muy conocidos en la técnica. Por ejemplo, el programa informático de estrategia de cebadores oligonucleotídicos híbridos degenerados de consenso (CODEHOP) es accesible como en <http://blocks.fhcrc.org/codehop.html>, y está conectado directamente con el sitio de alineamiento de múltiples secuencias BlockMaker para la predicción de cebadores híbridos que comienza con un conjunto de secuencias proteicas relacionadas, tales como regiones de unión al ligando de receptores gustativos conocidas (véase, por ejemplo, Rose, Nucleic Acids Res., 26:1628-35 (1998); Singh, Biotechniques, 24:318-19 (1998)).

Los medios para sintetizar parejas de cebadores oligonucleotídicos son muy conocidos en la técnica. Pueden utilizarse pares de bases "naturales" o pares de bases sintéticas. Por ejemplo, el uso de nucleobases artificiales ofrece una estrategia versátil para manipular secuencias de cebadores y genera una mezcla más compleja de productos de amplificación. Diversas familias de nucleobases artificiales son capaces de asumir múltiples orientaciones de enlaces de hidrógeno a través de rotaciones de enlaces internos para proporcionar un medio para

el reconocimiento molecular degenerado. La incorporación de estos análogos en una única posición de un cebador de PCR permite la generación de una biblioteca compleja de productos de amplificación. Véase, por ejemplo, Hoops, *Nucleic Acids Res.*, 25:4866-71 (1997). También pueden utilizarse moléculas no polares para imitar la forma de las bases del ADN naturales. Un imitador de la forma sin enlaces de hidrógeno para la adenina puede replicarse de modo eficaz y selectivo frente a un imitador de la forma no polar para la timina (véase, por ejemplo, Morales, *Nat. Struct. Biol.*, 5:950-54 (1998)). Por ejemplo, dos bases degeneradas pueden ser la base de pirimidina 6H,8H-3,4-dihidropirimido[4,5-c][1,2]oxazin-7-ona, o la base de purina N6-metoxi-2,6-diaminopurina (véase, por ejemplo, Hill, *PNAS*, 95:4258-63 (1998)). Los cebadores degenerados ejemplares de la invención incorporan el análogo de nucleobase 5'-dimetoxitritil-N-benzoil-2'-desoxicitidina, 3'-[(2-cianoetil)-(N,N-diisopropil)]fosforamidito (el término "P" en las secuencias; véase anteriormente). Este análogo de pirimidina se une mediante enlaces de hidrógeno con purinas, incluyendo los restos A y G.

Los variantes polimórficas, alelos, y homólogos entre especies que son sustancialmente idénticos a un receptor gustativo descrito en la presente memoria pueden aislarse utilizando las sondas de ácidos nucleicos descritas anteriormente. Como alternativa, pueden emplearse bibliotecas de expresión para clonar polipéptidos de T2R y sus variantes polimórficas, alelos, y homólogos entre especies, mediante la detección de los homólogos expresados de forma inmunológica con antisuero o anticuerpos purificados generados contra un polipéptido de T2R, que también reconocen y se unen selectivamente al homólogo de T2R.

Los ácidos nucleicos que codifican regiones de unión al ligando de receptores gustativos pueden generarse mediante amplificación (por ejemplo, PCR) de las secuencias de ácidos nucleicos apropiadas utilizando parejas de cebadores (perfectos o degenerados) apropiadas. El ácido nucleico amplificado puede ser ADN genómico procedente de cualquier célula o tejido, o ARNm o ADNc derivado de células que expresan receptores gustativos.

En una realización, pueden construirse secuencias que codifican proteínas híbridas que comprenden ácidos nucleicos que codifican T2Rs fusionadas a secuencias de translocación. También se proporcionan T2Rs híbridos que comprenden los motivos de translocación y las regiones de unión a compuestos estimulantes del gusto de otras familias de receptores quimiosensoriales, en particular receptores gustativos. Estas secuencias de ácidos nucleicos pueden estar operablemente unidas a elementos de control transcripcionales o traduccionales, por ejemplo, secuencias de inicio de la transcripción y de la traducción, promotores y potenciadores, terminadores de la transcripción y de la traducción, secuencias de poliadenilación, y otras secuencias útiles para transcribir el ADN en ARN. En la construcción de casetes de expresión recombinante, vectores y transgénicos, puede emplearse un fragmento promotor para dirigir la expresión del ácido nucleico deseado en todas las células o tejidos deseados.

En otra realización, las proteínas de fusión pueden incluir secuencias de translocación C-terminales o N-terminales. Además, las proteínas de fusión pueden comprender otros elementos, por ejemplo para la detección, la purificación de proteínas u otras aplicaciones. Los dominios que facilitan la detección y la purificación incluyen, por ejemplo, péptidos quelantes de metales, tales como tramos de polihistidina, módulos de histidina-triptófano, u otros dominios que permitan la purificación sobre metales inmovilizados; proteína de unión a la maltosa; dominios de proteína A que permiten la purificación sobre inmunoglobulina inmovilizada; o el dominio utilizado en el sistema de purificación por afinidad/extensión de FLAGS (Immunex Corp., Seattle, Wash.).

La inclusión de secuencias conectoras escindibles, tales como Factor Xa (véase, por ejemplo, Ottavi, *Biochimie*, 80:289-93 (1998)), motivo de reconocimiento de proteasas de subtilisina (véase, por ejemplo, Polyak, *Protein Eng.*, 10:615-19 (1997)); enterocinasa (Invitrogen, San Diego, Calif.), y similares, entre el dominio de translocación (para una expresión en la membrana plasmática eficaz) y el resto del polipéptido recién traducido, puede ser útil para facilitar la purificación. Por ejemplo, un constructo puede incluir un polipéptido que codifica una secuencia de ácido nucleico unida a seis restos de histidina, seguido de una tiorredoxina, un sitio de escisión de enterocinasas (véase, por ejemplo, Williams, *Biochemistry*, 34:1787-97 (1995)), y un dominio de translocación C-terminal. Los restos de histidina facilitan la detección y la purificación, mientras que el sitio de escisión de enterocinasas proporciona un medio para purificar la proteína o proteínas deseadas a partir del resto de la proteína de fusión. La tecnología perteneciente a los vectores que codifican proteínas de fusión y la aplicación de las proteínas de fusión están bien descritas en la bibliografía científica y de patentes (véase, por ejemplo, Kroll, *DNA Cell. Biol.*, 12:441-53 (1993)).

Los vectores de expresión, ya sea como vectores de expresión individuales o como bibliotecas de vectores de expresión, que comprenden secuencias que codifican la región de unión al ligando, pueden introducirse en un genoma o en el citoplasma o en un núcleo de una célula y expresarse mediante una diversidad de técnicas convencionales, bien descritas en la bibliografía científica y de patentes. Véase, por ejemplo, Roberts, *Nature*, 328:731 (1987); Berger, más arriba; Schneider, *Protein Expr. Purif.*, 6435:10 (1995); Sambrook; Tijssen; Ausubel. La información del producto suministrada por los fabricantes de reactivos biológicos y equipos experimentales también proporciona información con respecto a métodos biológicos conocidos. Los vectores pueden aislarse a partir de fuentes naturales, obtenerse a partir de fuentes tales como bibliotecas de la ATCC o del GenBank, o prepararse por métodos sintéticos o recombinantes.

Los ácidos nucleicos pueden expresarse en casetes de expresión, vectores o virus, que se expresan de modo estable o transitorio en células (por ejemplo, sistemas de expresión episómicos). Pueden incorporarse marcadores de selección en casetes de expresión y vectores para conferir un fenotipo seleccionable en secuencias y células

transformadas. Por ejemplo, los marcadores de selección pueden codificar para el mantenimiento y la replicación episómicos, de modo que no sea necesaria la integración en el genoma del hospedante. Por ejemplo, el marcador puede codificar la resistencia a antibióticos (por ejemplo, cloranfenicol, kanamicina, G418, bleomicina, higromicina), o la resistencia a herbicidas (por ejemplo, clorosulfurona o Basta) para permitir la selección de las células transformadas con las secuencias de ADN deseadas (véase, por ejemplo, Blondelet-Rouault, *Gene*, 190:315-17 (1997); Aubrecht, *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, 281:992-97 (1997)). Debido a que los genes marcadores seleccionables que confieren resistencia a sustratos como neomicina o higromicina sólo pueden utilizarse en cultivos de tejidos, también se emplean genes quimiorresistentes como marcadores seleccionables *in vitro* e *in vivo*.

Una secuencia de ácido nucleico quimérica puede codificar una región de unión al ligando de T2R dentro de cualquier polipéptido 7-transmembránico. Debido a que los polipéptidos de receptores 7-transmembránicos tienen secuencias primarias y estructuras secundarias y terciarias similares, los dominios estructurales (por ejemplo, dominio extracelular, dominios TM, dominio citoplásmico, etc.) pueden identificarse con facilidad mediante el análisis de la secuencia. Por ejemplo, la formación de modelos de homología, el análisis de Fourier, y la detección de la periodicidad helicoidal pueden identificar y caracterizar los siete dominios con una secuencia de receptor 7-transmembránico. Pueden emplearse los algoritmos de la transformada de Fourier rápida (FFT) para evaluar los periodos dominantes que caracterizan los perfiles de la hidrofobia y variabilidad de las secuencias analizadas. La potenciación de la detección de la periodicidad y el índice de periodicidad de hélices alfa pueden realizarse, por ejemplo, como en Donnelly, *Protein Sci.*, 2:55-70 (1993). Otros algoritmos de alineamiento y formación de modelos son muy conocidos en la técnica (véase, por ejemplo, Peitsch, *Receptors Channels*, 4:161-64 (1996); Kyte y Doolittle, *J. Med. Biol.*, 157:105-32 (1982); y Cronet, *Protein Eng.*, 6:59-64 (1993).

La presente solicitud también describe no sólo las moléculas de ácidos nucleicos y polipéptidos que tienen las secuencias de ácidos nucleicos y de aminoácidos especificadas, sino también sus fragmentos, particularmente fragmentos de, por ejemplo, 40, 60, 80, 100, 150, 200, o 250 nucleótidos o más, así como fragmentos polipeptídicos de, por ejemplo, 10, 20, 30, 50, 70, 100, o 150 aminoácidos o más. Opcionalmente, los fragmentos de ácidos nucleicos pueden codificar un polipéptido antigénico que es capaz de unirse a un anticuerpo generado contra un miembro de la familia de T2R. Además, un fragmento de proteína de la invención puede ser opcionalmente un fragmento antigénico que es capaz de unirse a un anticuerpo generado contra un miembro de la familia de T2R.

También se contemplan proteínas quiméricas, que comprenden al menos 10, 20, 30, 50, 70, 100 ó 150 aminoácidos, o más, de uno de al menos uno de los polipéptidos de T2R descritos en la presente memoria, acopladas a aminoácidos adicionales que representan todo o parte de otro GPCR, preferiblemente un miembro de la superfamilia 7-transmembránica. Estas quimeras pueden obtenerse a partir de los actuales receptores y de otro GPCR, o pueden obtenerse combinando dos o más de los presentes receptores. En una realización, una porción de la quimera corresponde a o deriva del dominio transmembránico de un polipéptido de T2R de la invención. En otra realización, una porción de la quimera corresponde a o deriva de una o más de las regiones transmembránicas de un polipéptido de T2R descrito en la presente memoria, y la porción o porciones restantes pueden proceder de otro GPCR. Los receptores quiméricos son muy conocidos en la técnica, y las técnicas para crearlos y la selección y los límites de los dominios o fragmentos de receptores acoplados a proteína G para su incorporación en ellos también son muy conocidos. Así, este conocimiento de los expertos en la técnica puede utilizarse con facilidad para crear dichos receptores quiméricos. El uso de estos receptores quiméricos puede proporcionar, por ejemplo, una característica de selectividad gustativa de uno de los receptores específicamente descritos en la presente memoria, acoplado con las características de transducción de señales de otro receptor, tal como un receptor muy conocido utilizado en los sistemas de ensayo de la técnica anterior.

Por ejemplo, una región, tal como una región de unión al ligando, un dominio extracelular, un dominio transmembránico, un dominio transmembránico, un dominio citoplásmico, un dominio N-terminal, un dominio C-terminal, o cualquiera de sus combinaciones, puede unirse covalentemente a una proteína heteróloga. Por ejemplo, una región transmembránica de T2R puede unirse a un dominio transmembránico de GPCR heterólogo, o un dominio extracelular de GPCR heterólogo puede unirse a una región transmembránica de T2R. Otras proteínas heterólogas de elección pueden incluir, por ejemplo, la proteína fluorescente verde, polipéptidos de beta-galactosidasa, receptor de glutamato, y los polipéptidos de rodopsina, por ejemplo fragmentos N-terminales de rodopsina, por ejemplo rodopsina bovina.

También se describe la utilización de diferentes células hospedantes para expresar los T2Rs, fragmentos o variantes de la invención. Para obtener unos niveles altos de expresión de un ácido nucleico o gen clonado, tales como ADNc que codifican los T2Rs, fragmentos o variantes de la invención, el experto típicamente subclona la secuencia de ácido nucleico de interés en un vector de expresión que contiene un promotor fuerte para dirigir la transcripción, un terminador de la transcripción/traducción, y para un ácido nucleico que codifica una proteína, un sitio de unión al ribosoma para el inicio de la traducción. Los promotores bacterianos adecuados son muy conocidos en la técnica y se describen, por ejemplo, en Sambrook et al. Preferiblemente, los sistemas de expresión eucariotas se utilizan para expresar el receptor hT2R objeto.

Pueden emplearse cualquiera de los procedimientos bien conocidos para introducir secuencias nucleotídicas extrañas en células hospedantes. Estos incluyen el uso de transfección con fosfato de calcio, polibreno, fusión de protoplastos, electroporación, liposomas, microinyección, vectores plasmáticos, vectores víricos y cualquiera de los

otros métodos muy conocidos para introducir ADN genómico, ADNc, y ADN sintético clonados u otro material genético extraño en una célula hospedante (véase, por ejemplo, Sambrook et al.). Sólo es necesario que el procedimiento de modificación genética concreto utilizado sea capaz de introducir con éxito al menos una molécula de ácido nucleico en la célula hospedante que sea capaz de expresar el T2R, fragmento, o variante de interés.

- 5 Después de introducir el vector de expresión en las células, las células transfectadas se cultivan en condiciones que favorecen la expresión del receptor, fragmento, o variante de interés, que entonces se recupera del cultivo utilizando técnicas estándar. Los ejemplos de dichas técnicas son muy conocidos en la técnica. Véase, por ejemplo, el documento WO 00/06593.

Ensayos para la detección de compuestos que modulan la actividad de un hT2R según la invención

- 10 Las composiciones y los métodos para determinar si un compuesto de ensayo se une específicamente a un polipéptido de T2R de la invención, tanto in vitro como in vivo, se describen a continuación. Muchos aspectos de la fisiología celular pueden monitorizarse para evaluar el efecto de la unión del ligando a T2Rs de origen natural o quiméricos. Estos ensayos pueden realizarse sobre células intactas que expresen un polipéptido de T2R, sobre células permeabilizadas, o sobre fracciones de membranas producidas por métodos estándar.
- 15 Los receptores gustativos se unen a compuestos estimulantes del gusto e inician la transducción de estímulos químicos en señales eléctricas. Una proteína G activada o inhibida, a su vez, alterará las propiedades de enzimas diana, canales y otras proteínas efectoras. Algunos ejemplos son la activación de la GMPc fosfodiesterasa por la transducina en el sistema visual, de la adenilato ciclasa por la proteína G estimuladora, de la fosfolipasa C por Gq y otras proteínas G cognadas, y la modulación de diversos canales por Gi y otras proteínas G. También pueden estudiarse las consecuencias aguas abajo, tales como la generación de diacilglicerol e IP3 por la fosfolipasa C y, a su vez, para la movilización del calcio por IP3.

Las proteínas o polipéptidos de hT2R objeto del ensayo se seleccionarán típicamente a partir de un polipéptido que tiene una secuencia contenida en el listado de secuencias que precede a las reivindicaciones en la presente memoria, o sus fragmentos o variantes modificadas de forma conservativa.

- 25 Como alternativa, las proteínas o polipéptidos de T2R del ensayo pueden derivar de una célula hospedante eucariota, y pueden incluir una secuencia de aminoácidos que tiene un cierto porcentaje de identidad de secuencia de aminoácidos con estos polipéptidos de hT2R o sus variantes modificadas de forma conservativa. En general, la identidad de secuencia de aminoácidos será al menos 30%, preferiblemente 30-40%, más específicamente 50-60, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, o 99%. Opcionalmente, las proteínas o los polipéptidos de T2R de los ensayos pueden comprender una región de un polipéptido de T2R, tal como un dominio extracelular, región transmembránica, dominio citoplásmico, dominio de unión al ligando, y similares. Opcionalmente, como se ejemplifica en la presente memoria, el polipéptido de T2R, o una porción del mismo, puede enlazarse covalentemente a una proteína heteróloga para crear una proteína quimérica utilizada en los ensayos descritos en la presente memoria.
- 30
- 35 Los moduladores de la actividad de T2R se pueden ensayar utilizando proteínas o polipéptidos de T2R según se describió anteriormente, tanto recombinantes o de origen natural. Las proteínas o los polipéptidos de T2R pueden aislarse, expresarse en una célula, expresarse en una membrana derivada de una célula, expresarse en un tejido o en un animal, tanto recombinantes o de origen natural. Por ejemplo, pueden emplearse cortes de lengua, células disociadas de una lengua, células transformadas, o membranas. La modulación puede ensayarse utilizando uno de los ensayos in vitro o in vivo descritos en la presente memoria.
- 40

Detección de moduladores

Las composiciones y los métodos para determinar si un compuesto de ensayo se une específicamente a un receptor T2R de la invención, tanto in vitro como in vivo, se describen a continuación. Muchos aspectos de la fisiología celular pueden monitorizarse para evaluar el efecto de la unión del ligando a un polipéptido de T2R de la invención. Estos ensayos pueden realizarse sobre células intactas que expresen un receptor quimiosensorial, sobre células permeabilizadas, o sobre fracciones de membranas producidas por métodos estándar o in vitro utilizando proteínas sintetizadas de novo.

45

In vivo, los receptores gustativos se unen a compuestos moduladores del gusto e inician la transducción de estímulos químicos en señales eléctricas. Una proteína G activada o inhibida, a su vez, alterará las propiedades de enzimas diana, canales, y otras proteínas efectoras. Algunos ejemplos son la activación de la GMPc fosfodiesterasa por la transducina en el sistema visual, de la adenilato ciclasa por la proteína G estimuladora, de la fosfolipasa C por Gq y otras proteínas G cognadas, y la modulación de diversos canales por Gi y otras proteínas G. También pueden estudiarse las consecuencias aguas abajo, tales como la generación de diacilglicerol e IP3 por la fosfolipasa C y, a su vez, para la movilización del calcio por IP3.

50

- 55 Como alternativa, las proteínas o polipéptidos de T2R del ensayo pueden derivarse de una célula hospedante eucariota, y pueden incluir una subsecuencia de aminoácidos que tiene una identidad de secuencia de aminoácidos con los polipéptidos de T2R descritos en la presente memoria, o sus fragmentos o variantes modificadas de forma

conservativa. En general, la identidad de secuencia de aminoácidos será al menos 35 a 50%, u opcionalmente 75%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98% o 99%. Opcionalmente, las proteínas o polipéptidos de T2R de los ensayos pueden comprender un dominio de una proteína de T2R, tal como un dominio extracelular, región transmembránica, dominio transmembránico, dominio citoplásmico, dominio de unión al ligando, y similares. Además, tal como se describió anteriormente, la proteína de T2R, o un dominio de ésta, puede enlazarse covalentemente a una proteína heteróloga para crear una proteína quimérica utilizada en los ensayos descritos en la presente memoria.

Los moduladores de la actividad del receptor T2R se ensayan utilizando proteínas o polipéptidos de T2R según se describió anteriormente, tanto recombinantes como de origen natural. Las proteínas o polipéptidos de T2R pueden aislarse, expresarse en una célula, expresarse en una membrana derivada de una célula, expresarse en un tejido o en un animal, tanto recombinantes como de origen natural. Por ejemplo, pueden emplearse cortes de lengua, células disociadas de una lengua, células transformadas, o membranas. La modulación puede ensayarse utilizando uno de los ensayos in vitro o in vivo descritos en la presente memoria.

#### Ensayos de unión in vitro

La transducción del gusto también puede estudiarse in vitro con reacciones en estado sólido o solubles, utilizando los polipéptidos de T2R de la invención. En una realización particular, los dominios de unión al ligando de T2R pueden utilizarse in vitro en reacciones en estado sólido o solubles para ensayar la unión al ligando.

Es posible que el dominio de unión al ligando pueda estar formado por el dominio N-terminal junto con porciones adicionales del dominio extracelular, tales como los bucles extracelulares del dominio transmembránico.

Se han empleado ensayos de unión in vitro con otros GPCRs, tales como los receptores del glutamato metabotrópicos (véase, por ejemplo, Han y Hampson, *J. Biol. Chem.*, 274:10008-10013 (1999)). Estos ensayos pueden implicar desplazar un ligando marcado de modo radiactivo o fluorescente, medir los cambios en la fluorescencia intrínseca o los cambios en la susceptibilidad proteolítica, etc.

La unión del ligando a un polipéptido de T2R según la invención puede ensayarse en disolución, en una membrana de bicapa, opcionalmente unida a una fase sólida, en una monocapa lipídica, o en vesículas. La unión de un modulador puede ensayarse utilizando, por ejemplo, cambios en las características espectroscópicas (por ejemplo, fluorescencia, absorbancia, índice refractario), hidrodinámicas (por ejemplo, forma), cromatográficas, o propiedades de solubilidad.

En una realización preferida de la invención, se utiliza un ensayo de unión a  $[^{35}\text{S}]\text{GTP}\gamma\text{S}$ . Tal como se describió anteriormente, tras la activación de un GPCR, la subunidad  $G\alpha$  del complejo de la proteína G se estimula para que intercambie el GDP unido por GTP. La estimulación mediada por ligandos de la actividad de intercambio de la proteína G puede medirse en un ensayo bioquímico midiendo la unión de  $[^{35}\text{S}]\text{GTP}\gamma\text{S}$  marcado de modo radiactivo añadido, a la proteína G en presencia de un ligando putativo. Típicamente, las membranas que contienen el receptor quimiosensorial de interés se mezclan con una proteína G. Se añaden al ensayo inhibidores y/o activadores potenciales y  $[^{35}\text{S}]\text{GTP}\gamma\text{S}$ , y se mide la unión de  $[^{35}\text{S}]\text{GTP}\gamma\text{S}$  a la proteína G. La unión puede medirse mediante un recuento por centelleo de líquido o mediante cualquier otro medio conocido en la técnica, incluyendo ensayos de proximidad por centelleo (SPA). En otros formatos de ensayos, puede utilizarse  $\text{GTP}\gamma\text{S}$  marcado de modo fluorescente.

#### Ensayos de polarización de fluorescencia

En otra realización, pueden emplearse ensayos basados en la polarización de fluorescencia ("FP") para detectar y monitorizar la unión al ligando. La polarización de fluorescencia es una técnica de laboratorio versátil para medir la unión en equilibrio, la hibridación de ácidos nucleicos, y la actividad enzimática. Los ensayos de polarización de fluorescencia son homogéneos por cuanto no requieren una etapa de separación tal como centrifugación, filtración, cromatografía, precipitación, o electroforesis. Estos ensayos se realizan a tiempo real, directamente en disolución, y no requieren una fase inmovilizada. Los valores de polarización pueden medirse repetidamente y después de la adición de reactivos, puesto que la medición de la polarización es rápida y no destruye la muestra. En general, esta técnica puede utilizarse para medir los valores de polarización de fluoróforos desde niveles picomolares bajos a micromolares. Esta sección describe cómo puede emplearse la polarización de fluorescencia de una manera simple y cuantitativa para medir la unión de ligandos a los polipéptidos de T2R de la invención.

Cuando una molécula marcada de modo fluorescente se excita con una luz polarizada en el plano, emite luz que tiene un grado de polarización que es inversamente proporcional a su rotación molecular. Las moléculas grandes marcadas de forma fluorescente permanecen relativamente estacionarias durante el estado excitado (4 nanosegundos en el caso de la fluoresceína), y la polarización de la luz permanece relativamente constante entre la excitación y la emisión. Las moléculas pequeñas marcadas de forma fluorescente rotan con rapidez durante el estado excitado, y la polarización cambia significativamente entre la excitación y la emisión. Por tanto, las moléculas pequeñas tienen bajos valores de polarización, y las moléculas grandes tienen altos valores de polarización. Por ejemplo, un oligonucleótido monocatenario marcado con fluoresceína tiene un valor de polarización relativamente bajo, pero cuando se hibrida a una hebra complementaria tiene un valor de polarización mayor. Cuando se emplea

la FP para detectar y monitorizar la unión a compuestos estimulantes del gusto que puede activar o inhibir los receptores quimiosensoriales de la invención, pueden emplearse compuestos estimulantes del gusto marcados con fluorescencia o compuestos estimulantes del gusto autofluorescentes.

La polarización de fluorescencia (P) se define como:

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

en la que  $Int_{par}$  es la intensidad de la emisión de luz paralela al plano de luz de excitación, e  $Int_{perp}$  es la intensidad de la emisión de luz perpendicular al plano de luz de excitación. P, que es una relación de intensidades de luz, es un número adimensional. Por ejemplo, en relación con estos ensayos puede utilizarse el sistema Beacon™ y Beacon 2000™. Tales sistemas expresan típicamente la polarización en unidades de milipolarización (1 unidad de polarización = 1000 unidades mP).

La relación entre la rotación molecular y el tamaño se describe mediante la ecuación de Perrin, y se hace referencia al lector a Jolley, M.E. (1991), en *Journal of Analytical Toxicology*, p. 236-240, que ofrece una explicación a fondo de esta ecuación. En resumen, la ecuación de Perrin señala que la polarización es directamente proporcional al tiempo de relajación rotacional, el tiempo que tarda una molécula en rotar a través de un ángulo de aproximadamente 68,5°.

El tiempo de relajación rotacional está relacionado con la viscosidad ( $\eta$ ), la temperatura absoluta (T), el volumen molecular (V), y la constante de los gases (R) mediante la siguiente ecuación:  $2(\text{Tiempo de relajación rotacional}) = 3 \frac{V}{RT}$

El tiempo de relajación rotacional es pequeño (~ nanosegundo) para moléculas pequeñas (por ejemplo, fluoresceína) y grande (~ 100 nanosegundos) para moléculas grandes (por ejemplo, inmunoglobulinas). Si la viscosidad y la temperatura se mantienen constantes, el tiempo de relajación rotacional, y por tanto la polarización, está directamente relacionado con el volumen molecular. Los cambios en el volumen molecular pueden ser debidos a interacciones con otras moléculas, disociación, polimerización, degradación, hibridación, o cambios conformacionales de la molécula marcada de forma fluorescente. Por ejemplo, la polarización de fluorescencia se ha empleado para medir la ruptura enzimática de grandes polímeros marcados con fluoresceína por proteasas, ADNasas, y ARNasas. También se ha empleado para medir la unión en el equilibrio para interacciones de proteína/proteína, la unión de anticuerpos/antígenos, y la unión de proteínas/ADN.

Ensayos de alto rendimiento en estado sólido y solubles

En todavía otra realización, la invención proporciona ensayos solubles utilizando un polipéptido de T2R; o una célula o un tejido que expresa un polipéptido de T2R. En otra realización, la invención proporciona ensayos in vitro basados en una fase sólida en un formato de alto rendimiento, en los que el polipéptido de T2R, o una célula o un tejido que expresa el polipéptido de T2R, se une a un sustrato en fase sólida o a un compuesto estimulante del gusto, y se pone en contacto con un receptor T2R, y la unión se detecta utilizando una etiqueta apropiada o un anticuerpo generado contra el receptor T2R.

En los ensayos de alto rendimiento de la invención, es posible identificar hasta varios miles de moduladores o ligandos diferentes en un solo día. En particular, cada pocillo de una placa de microtitulación puede utilizarse para ejecutar un ensayo distinto frente a un modulador potencial seleccionado, o, si se van a observar los efectos de la concentración o del tiempo de incubación, cada 5-10 pocillos pueden ensayarse con un único modulador. Así, una única placa de microtitulación estándar puede ensayar aproximadamente 100 (por ejemplo, 96) moduladores. Si se emplean placas de 1536 pocillos, entonces una única placa puede ensayar con facilidad de aproximadamente 1000 a aproximadamente 1500 compuestos diferentes. También es posible ensayar múltiples compuestos en cada pocillo de la placa. Es posible ensayar varias placas diferentes por día; son posibles identificaciones de ensayo de selección de hasta aproximadamente 6.000-20.000 compuestos diferentes utilizando los sistemas integrados de la invención. En fechas más recientes, se han desarrollado enfoques microfluídicos para la manipulación de reactivos.

La molécula de interés puede unirse al componente en estado sólido, de modo directo o indirecto, a través de enlaces covalentes o no covalentes, por ejemplo a través de una etiqueta. La etiqueta puede ser cualquiera de una diversidad de componentes. En general, una molécula que se une a la etiqueta (un ligante de la etiqueta) se fija a un soporte sólido, y la molécula etiquetada de interés (por ejemplo, la molécula de transducción del gusto de interés) se une al soporte sólido mediante la interacción de la etiqueta y el ligante de la etiqueta.

Basándose en interacciones moleculares conocidas, bien descritas en la bibliografía, puede emplearse una serie de etiquetas y ligantes de etiquetas. Por ejemplo, cuando una etiqueta tiene un ligante natural, por ejemplo biotina, proteína A, o proteína G, puede utilizarse junto con los ligantes de etiquetas apropiados (avidina, estreptavidina, neutravidina, la región Fc de una inmunoglobulina, etc.). También están ampliamente disponibles anticuerpos contra moléculas con ligantes naturales, tales como biotina, y los ligantes de etiquetas apropiados (véase, catálogo SIGMA Immunochemicals 1998, SIGMA, St. Louis, Mo).

De forma similar, cualquier compuesto hapténico o antigénico puede utilizarse en combinación con un anticuerpo apropiado para formar una pareja de etiqueta/ligante de la etiqueta. Miles de anticuerpos específicos están disponibles en el mercado, y en la bibliografía se describen muchos otros anticuerpos. Por ejemplo, en una configuración habitual, la etiqueta es un primer anticuerpo, y el ligante de la etiqueta es un segundo anticuerpo que reconoce al primer anticuerpo. Además de las interacciones anticuerpo-antígeno, las interacciones de receptor-ligando también son apropiadas como parejas de etiquetas y ligante de la etiqueta. Por ejemplo, agonistas y antagonistas de receptores de la membrana celular (por ejemplo, interacciones receptor celular-ligando, tales como transferrina, c-kit, ligandos de receptores víricos, receptores de citocinas, receptores de quimiocinas, receptores de interleucinas, receptores de inmunoglobulinas, y anticuerpos, la familia de cadherinas, la familia de integrinas, la familia de selectinas, y similares; véase, por ejemplo, Pigott y Power, *The Adhesion Molecule Facts Book I* (1993)). De manera similar, toxinas y venenos, epítomos víricos, hormonas (por ejemplo, opiáceos, esteroides, etc.), receptores intracelulares (por ejemplo, que median los efectos de diversos ligandos pequeños, incluyendo esteroides, hormona tiroidea, retinoides y vitamina D; péptidos), fármacos, lectinas, azúcares, ácidos nucleicos (en configuración de polímero lineal y cíclico), oligosacáridos, proteínas, fosfolípidos y anticuerpos pueden todos interaccionar con diversos receptores celulares.

Los polímeros sintéticos, tales como poliuretanos, poliésteres, policarbonatos, poliureas, poliamidas, polietileniminas, poliarilensulfuros, polisiloxanos, poliimidias, y poliacetatos, también pueden formar una etiqueta o un ligante de etiqueta apropiado. Muchas otras parejas de etiqueta/ligante de etiqueta también son útiles en los sistemas de ensayo descritos en la presente memoria, tal como será evidente para un experto en la técnica tras el análisis de esta descripción.

Los conectores habituales, tales como péptidos, poliéteres y similares, también pueden actuar como etiquetas, e incluyen secuencias polipeptídicas, tales como secuencias de poli-gly de entre aproximadamente 5 y 200 aminoácidos. Estos conectores flexibles son conocidos por los expertos en la técnica. Por ejemplo, están disponibles conectores de poli(etilenglicol) en Shearwater Polymers, Inc., Huntsville, Ala. Estos conectores opcionalmente tienen enlaces amida, enlaces sulfhidrilo, o enlaces heterofuncionales.

Los ligantes de etiquetas se fijan a sustratos sólidos utilizando cualquiera de una diversidad de métodos disponibles en la actualidad. Los sustratos sólidos habitualmente se derivatizan o se funcionalizan exponiendo todo o una parte del sustrato a un reactivo químico que fija un grupo químico a la superficie, que es reactivo con una parte del ligante de la etiqueta. Por ejemplo, grupos que son adecuados para su unión a una parte de cadena más larga incluirán grupos amina, hidroxilo, tiol, y carboxilo. Pueden utilizarse aminoalquilsilanos e hidroxialquilsilanos para funcionalizar una diversidad de superficies, tales como superficies de vidrio. La construcción de dichas matrices de biopolímeros en fase sólida está bien descrita en la bibliografía; véase, por ejemplo, Merrifield, *J. Am. Chem. Soc.*, 85:2149-2154 (1963) (que describe la síntesis en fase sólida, por ejemplo, de péptidos); Geysen et al., *J. Immun. Meth.*, 102:259-274 (1987) (que describe la síntesis de componentes en fase sólida sobre varillas); Frank y Doring, *Tetrahedron*, 44:60316040 (1988) (que describe la síntesis de diversas secuencias peptídicas sobre discos de celulosa); Fodor et al., *Science*, 251:767-777 (1991); Sheldon et al., *Clinical Chemistry*, 39(4):718-719 (1993); y Kozal et al., *Nature Medicine*, 2(7):753759 (1996) (todos describen matrices de biopolímeros fijados a sustratos sólidos). Las estrategias no químicas para fijar ligantes de etiquetas a sustratos incluyen otros métodos habituales, tales como calor, reticulación mediante radiación UV, y similares.

#### Ensayos basados en células

En una realización preferida, una proteína de T2R se expresa en una célula eucariota en formas no modificadas o como receptores quiméricos, variantes o truncados con o preferiblemente sin una secuencia de chaperona heteróloga que facilita su maduración y su direccionamiento a través de la ruta secretora. Estos polipéptidos de T2R pueden expresarse en cualquier célula eucariota, tal como células HEK-293. Preferiblemente, las células comprenden una proteína G funcional, por ejemplo, G $\alpha$ 15, o una G $\alpha$ 16 quimérica, gustducina o transducina o una proteína G quimérica tal como G16gust44 que es capaz de acoplar el receptor quimérico a una ruta de señalización intracelular o a una proteína de señalización tal como fosfolipasa C. La activación de los receptores T2R en dichas células puede detectarse utilizando cualquier método convencional, tal como detectando cambios en el calcio intracelular mediante la detección de la fluorescencia dependiente de FURA-2 en la célula. Este ensayo es la base de los descubrimientos experimentales presentados en esta solicitud.

Los receptores GPCR activados a menudo son sustratos para cinasas que fosforilan la cola C-terminal del receptor (y probablemente también otros sitios). Así, los activadores promoverán la transferencia de 32P desde ATP radiomarcado al receptor, que puede ensayarse con un contador de centelleo. La fosforilación de la cola C-terminal promoverá la unión de proteínas de tipo arrestina e interferirá con la unión de las proteínas G. Para un análisis general de la transducción de señales en GPCR y de los métodos para ensayar la transducción de señales, véase, por ejemplo, *Methods in Enzymology*, vols. 237 y 238 (1994) y volumen 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).

La modulación de T2R puede ensayarse comparando la respuesta de polipéptidos de T2R tratados con un modulador de T2R putativo con la respuesta de una muestra de control no tratada o una muestra que contiene un control "positivo" conocido. Estos moduladores de T2R putativos pueden incluir moléculas que inhiban o activen la

actividad del polipéptido de T2R. En una realización, a las muestras de control tratadas con un compuesto que activa el T2R se les asigna un valor de actividad T2R relativo de 100. La inhibición de un polipéptido de T2R se logra cuando el valor de actividad de T2R con relación a la muestra control es aproximadamente 90%, opcionalmente 50%, opcionalmente 25-0%. La activación de un polipéptido de T2R se logra cuando el valor de actividad de T2R con relación al control es 110%, opcionalmente 150%, 200-500%, o 1000-2000%.

Los cambios en el flujo de iones pueden evaluarse determinando los cambios en la polarización iónica (es decir, el potencial eléctrico) de la célula o la membrana que expresa un polipéptido de T2R. Un medio para determinar los cambios en la polarización celular es midiendo los cambios en la corriente (midiendo con ello los cambios en la polarización) con técnicas de fijación de voltaje y de fijación de parche (véase, por ejemplo, el modo "fijado a células", el modo "de fuera adentro", y el modo de "célula completa", por ejemplo, Ackerman et al., *New Engl. J. Med.*, 336:1575-1595 (1997)). Las corrientes de células completas se determinan de modo conveniente utilizando el patrón. Otros ensayos conocidos incluyen: ensayos de flujo de iones radiomarcados y ensayos de fluorescencia que emplean tintes sensibles al voltaje (véase, por ejemplo, Vestergarrd-Bogind et al., *J. Membrane Biol.*, 88:67-75 (1988); Gonzales y 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)).

Los efectos de los compuestos de ensayo sobre la función de los polipéptidos pueden medirse estudiando cualquiera de los parámetros descritos anteriormente. Cualquier cambio fisiológico adecuado que afecte a la actividad de GPCR puede emplearse para evaluar la influencia de un compuesto de ensayo sobre los polipéptidos de esta invención. Cuando se determinan las consecuencias funcionales utilizando células intactas o animales, también se puede medir una diversidad de efectos, tales como la liberación de transmisores, la liberación de hormonas, los cambios transcripcionales frente a marcadores genéticos conocidos y no caracterizados (por ejemplo, transferencias Northern), cambios en el metabolismo celular, tales como cambios del crecimiento celular o del pH, y cambios en los segundos mensajeros intracelulares, tales como Ca<sup>2+</sup>, IP<sub>3</sub>, GMPc, o AMPc.

Los ensayos preferidos para GPCRs incluyen células que se cargan con tintes sensibles a iones o a voltaje para indicar la actividad del receptor. Los ensayos para determinar la actividad de dichos receptores también pueden utilizar agonistas y antagonistas conocidos para otros receptores acoplados a proteína G como controles para evaluar la actividad de los compuestos ensayados. En ensayos para identificar compuestos moduladores (por ejemplo, agonistas, antagonistas), los cambios en el nivel de iones en el citoplasma o el voltaje de membrana se monitorizarán utilizando un indicador fluorescente sensible a iones o de voltaje de membrana, respectivamente. Entre los indicadores sensibles a iones y las sondas de voltaje que pueden emplearse se encuentran los descritos en el catálogo de 1997 de Molecular Probes. Para receptores acoplados a proteína G, pueden utilizarse G proteínas promiscuas, tales como G $\alpha$ 15 y G $\alpha$ 16 en el ensayo elegido (Wilkie et al., *Proc. Natl. Acad. Sci.* 88:10049-10053 (1991)). Como alternativa, se pueden utilizar otras proteínas G tales como gustducina, transducina y proteínas G quiméricas tales como G $\alpha$ 16gust44 o G $\alpha$ 16t25.

La activación del receptor inicia posteriores acontecimientos intracelulares, por ejemplo, un aumento en los segundos mensajeros. La activación de algunos receptores acoplados a proteína G estimula la formación de trifosfato de inositol (IP<sub>3</sub>) a través de la hidrólisis mediada por fosfolipasa C de fosfatidilinositol (Berridge e Irvine, *Nature*, 312:315-21 (1984)). IP<sub>3</sub>, a su vez, estimula la liberación de las reservas de ion calcio intracelulares. Así, un cambio en los niveles de ion calcio citoplásmicos, o un cambio en los niveles de los segundos mensajeros, tales como IP<sub>3</sub>, puede utilizarse para evaluar la función de receptores acoplados a proteínas G. Las células que expresan dichos receptores acoplados a proteínas G pueden mostrar unos mayores niveles de calcio citoplásmico como resultado de la contribución tanto de la liberación de calcio desde las reservas intracelulares como de la entrada de calcio extracelular a través de canales iónicos en la membrana plasmática.

En una realización preferida, la actividad del polipéptido de T2R se mide expresando el gen T2R en una célula heteróloga con una proteína G promiscua que une el receptor a una ruta de transducción de señales de fosfolipasa C (véase Offermanns y Simon, *J. Biol. Chem.*, 270:15175-15180 (1995)). Preferiblemente, la estirpe celular es HEK-293 (que normalmente no expresa genes T2R) y la proteína G promiscua es G $\alpha$ 15 (Offermanns y Simon, más arriba) o una proteína G quimérica tal como G $\alpha$ 16gust44. La modulación de la transducción del gusto se ensaya midiendo los cambios en los niveles de Ca<sup>2+</sup> intracelulares, que cambian en respuesta a la modulación de la ruta de transducción de señales de T2R a través de la administración de una molécula que se asocia con el polipéptido de T2R. Los cambios en los niveles de Ca<sup>2+</sup> se miden opcionalmente utilizando colorantes indicadores de Ca<sup>2+</sup> fluorescentes y formación de imágenes fluorométricas.

En otra realización, la hidrólisis del fosfatidilinositol (PI) puede analizarse según la patente de EE.UU. 5.436.128. Brevemente, el ensayo implica el marcaje de células con 3H-mioinositol durante 48 h o más. Las células marcadas se tratan con un compuesto de ensayo durante una hora. Las células tratadas se lisan y se extraen en cloroformo-metanol-agua, después de lo cual los fosfatos de inositol se separan mediante una cromatografía de intercambio iónico y se cuantifican mediante recuento de centelleo. La estimulación en número de veces se determina calculando la relación de cpm en presencia de agonista, a cpm en presencia de control de tampón. De manera similar, la inhibición en número de veces se determina calculando la relación de cpm en presencia de antagonista, a cpm en presencia de control de tampón (que puede o no contener un agonista).

Otros ensayos de receptores pueden implicar determinar el nivel de nucleótidos cíclicos intracelulares, por ejemplo AMPc o GMPc. En los casos en que la activación del receptor da como resultado una disminución en los niveles de nucleótidos cíclicos, puede ser preferible exponer las células a agentes que incrementan los niveles de nucleótidos cíclicos intracelulares, por ejemplo forskolina, antes de añadir a las células un compuesto activador del receptor en el ensayo. En una realización, los cambios en AMPc o GMPc intracelular pueden medirse utilizando inmunoensayos. El método descrito en Offermanns y Simon, *J. Bio. Chem.*, 270:15175-15180 (1995) puede utilizarse para determinar el nivel de AMPc. También, el método descrito en Felley-Bosco et al., *Am. J. Resp. Cell and Mol. Biol.*, 11:159-164 (1994) puede utilizarse para determinar el nivel de GMPc. Además, un kit de ensayo para medir AMPc y/o GMPc se describe en la patente de EE.UU. nº 4.115.538.

En otra realización, los niveles de transcripción pueden medirse para evaluar los efectos de un compuesto de ensayo sobre la transducción de señales. Una célula hospedante que contiene polipéptido de T2R de interés se pone en contacto con un compuesto de ensayo durante un tiempo suficiente para que afecte a cualquiera de las interacciones, y entonces se mide el nivel de expresión génica. La cantidad de tiempo para afectar a tales interacciones puede determinarse empíricamente, tal como dejando pasar el tiempo y midiendo el nivel de transcripción como una función del tiempo. La cantidad de transcripción puede medirse utilizando cualquier método que sea adecuado conocido por los expertos en la técnica. Por ejemplo, la expresión de ARNm de la proteína de interés puede detectarse utilizando transferencias Northern, o sus productos polipeptídicos pueden identificarse utilizando inmunoensayos. Como alternativa, pueden utilizarse ensayos basados en la transcripción que utilizan un gen informador, según se describe en la patente de EE.UU. nº 5.436.128. Los genes informadores pueden ser, por ejemplo, cloranfenicol acetiltransferasa, luciferasa, beta-galactosidasa, beta-lactamasa y fosfatasa alcalina. Además, la proteína de interés puede utilizarse como un informador indirecto vía la unión a un segundo informador, tal como proteína fluorescente verde (véase, por ejemplo, Mistili y Spector, *Nature Biotechnology*, 15:961-964 (1997)).

La cantidad de transcripción se compara entonces con la cantidad de transcripción en la misma célula en ausencia del compuesto de ensayo, o se puede comparar con la cantidad de transcripción en una célula sustancialmente idéntica que carece del polipéptido o polipéptidos de T2R de interés. Una célula sustancialmente idéntica puede derivar de las mismas células a partir de las que se preparó la célula recombinante pero que no ha sido modificada por introducción de ADN heterólogo. Cualquier diferencia en la cantidad de transcripción indica que el compuesto de ensayo tiene alterada de alguna manera la actividad del polipéptido de T2R de interés.

Animales no humanos transgénicos que expresan receptores quimiosensoriales

Para los ensayos de receptores, también pueden utilizarse animales no humanos que expresan una o más secuencias de receptores gustativos de la invención. Tal expresión puede utilizarse para determinar si un compuesto de ensayo se une específicamente a un complejo de receptor transmembránico gustativo de mamífero in vivo al poner en contacto un animal no humano transfectado de forma estable o transitoria con ácidos nucleicos que codifican receptores quimiosensoriales o sus regiones de unión al ligando con un compuesto de ensayo, y determinando si el animal reacciona al compuesto de ensayo al unirse específicamente al complejo del polipéptido del receptor.

Los animales transfectados o infectados con los vectores de la invención son particularmente útiles para ensayos para identificar y caracterizar estímulos gustativos que pueden unirse a receptores específicos o a conjuntos de receptores. Tales animales infectados con los vectores que expresan secuencias de receptores gustativos humanos pueden utilizarse para identificar in vivo estímulos gustativos y su efecto sobre, por ejemplo, la fisiología celular (por ejemplo, sobre neuronas gustativas), sobre el SNC, o sobre el comportamiento.

Los medios para infectar/expresar los ácidos nucleicos y vectores, ya sea individualmente o como bibliotecas, son bien conocidos en la técnica. Una variedad de parámetros de células individuales, órganos o de animales completos pueden medirse por una variedad de medios. Las secuencias de T2R de la invención pueden expresarse por ejemplo en tejidos gustativos de animales mediante la administración con un agente infeccioso, por ejemplo, un vector de expresión adenovírico.

Los genes de receptores gustativos endógenos pueden permanecer funcionales, y la actividad de tipo salvaje (nativa) todavía puede estar presente. En otras situaciones, en las que es deseable que toda la actividad de los receptores gustativos sea mediante el receptor híbrido exógeno introducido, se prefiere el uso de una línea genosuprimida. Los métodos para la construcción de animales transgénicos no humanos, particularmente ratones transgénicos, y la selección y preparación de constructos recombinantes para generar células transformadas son bien conocidos en la técnica.

La construcción de una célula y animal "genosuprimido" se basa en la premisa de que el nivel de expresión de un gen particular en una célula de mamífero se puede disminuir o anular completamente introduciendo en el genoma una nueva secuencia de ADN que sirve para interrumpir alguna porción de la secuencia de ADN del gen a suprimir. También, puede utilizarse la "inserción de trampas génicas" para interrumpir un gen hospedante, y pueden utilizarse células madre embrionarias (ES) de ratón para producir animales transgénicos genosuprimidos (véase, por ejemplo, Holzschu, *Transgenic Res.*, 6:97-106 (1997)). La inserción del exógeno se realiza típicamente mediante recombinación homóloga entre secuencias de ácidos nucleicos complementarias. La secuencia exógena es cierta

porción del gen diana a modificar, tal como secuencias exónicas, intrónicas o reguladoras transcripcionales, o cualquier secuencia genómica que sea capaz de afectar el nivel de la expresión del gen diana; o una combinación de las mismas. El direccionamiento génico vía recombinación homóloga en células madre embrionarias pluripotenciales permite modificar de forma precisa la secuencia genómica de interés. Puede utilizarse cualquier técnica para crear, identificar, propagar, un animal genosuprimido, por ejemplo, véanse 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); patentes de EE.UU. n° 5.616.491; 5.464.764; 5.631.153; 5.487.992; 5.627.059; 5.272.071; documentos WO 91/09955; WO 93/09222; WO 96/29411; WO 95/31560; WO 91/12650.

- 10 Los ácidos nucleicos de la invención también pueden utilizarse como reactivos para producir células humanas “genosuprimidas” y su progenie. Igualmente, los ácidos nucleicos de la invención también pueden utilizarse como reactivos para producir “genosustituciones” en ratones. Las secuencias del gen T2R humanas o de ratón pueden sustituir los ortólogos de T2R en el genoma del ratón. De esta manera, se produce un ratón que expresa un T2R humano o de rata. Este ratón puede utilizarse entonces para analizar la función de T2Rs humanos o de rata, y para identificar ligandos para tales T2Rs.

#### Moduladores

- Los compuestos ensayados como moduladores de un miembro de la familia de T2R pueden ser cualquier compuesto químico pequeño, o una entidad biológica, tal como una proteína, azúcar, ácido nucleico o lípido. Como alternativa, los moduladores pueden ser versiones genéticamente alteradas de un miembro de la familia de T2R. Típicamente, los compuestos de ensayo pueden ser moléculas químicas pequeñas y péptidos. Como modulador o ligando potencial en los ensayos de la invención, puede utilizarse esencialmente cualquier compuesto químico, aunque muy a menudo se utilizan compuestos que se pueden disolver en disoluciones acuosas u orgánicas (especialmente basadas en DMSO). Los ensayos pueden diseñarse para identificar grandes bibliotecas químicas automatizando las etapas del ensayo y proporcionando compuestos procedentes de cualquier fuente conveniente a los ensayos, que se realizan típicamente en paralelo (por ejemplo, en formatos de microtitulación en placas de microtitulación en ensayos robóticos). Se apreciará que hay muchos proveedores de compuestos químicos, incluyendo Sigma (St. Louis, Mo.), Aldrich (St. Louis, Mo.), Sigma-Aldrich (St. Louis, Mo.), Fluka Chemika-Biochemica Analytika (Buchs, Suiza) y similares.

- En una realización, los métodos de identificación de alto rendimiento implican proporcionar una biblioteca peptídica o química combinatoria que contiene un gran número de compuestos terapéuticos potenciales (compuestos moduladores o ligandos potenciales). Tales “bibliotecas químicas combinatorias” o “bibliotecas de ligandos” se identifican entonces en uno o más ensayos, como se describe en la presente memoria, para identificar aquellos miembros de la biblioteca (particularmente especies o subclases químicas) que presentan una actividad característica deseada. El compuesto así identificado puede servir como “compuestos líderes” convencionales, o ellos mismos se pueden utilizar como productos para el consumidor potenciales o reales.

- Una biblioteca química combinatoria es una colección de diversos compuestos químicos generados mediante síntesis química o síntesis biológica, combinando un número de “bloques de construcción” químicos tales como reactivos. Por ejemplo, una biblioteca química combinatoria lineal, tal como una biblioteca de polipéptidos, se forma combinando un conjunto de bloques de construcción químicos (aminoácidos) en cada forma posible para una longitud de compuesto dada (es decir, el número de aminoácidos en un compuesto polipeptídico). Mediante tal mezcla combinatoria de bloques de construcción químicos pueden sintetizarse millones de compuestos químicos.

- La preparación e identificación de bibliotecas químicas combinatorias es bien conocida por los expertos en la técnica. Tales bibliotecas químicas combinatorias incluyen, pero no se limitan a, bibliotecas de péptidos (véanse, por ejemplo, la patente de EE.UU. n° 5.010.175; Furka, Int. J. Pept. Prot. Res., 37:487-93 (1991); y Houghton et al., Nature, 354:84-88 (1991)). También pueden utilizarse otras químicas para generar bibliotecas de diversidad química. Tales químicas incluyen, pero no se limitan a: peptoides (por ejemplo, documento WO 91/19735), péptidos codificados (por ejemplo, documento WO 93/20242), biooligómeros aleatorios (por ejemplo, documento WO 92/00091), benzodiazepinas (por ejemplo, patente de EE.UU. n° 5.288.514), diversómeros tales como hidantoínas, benzodiazepinas y dipéptidos (Hobbs et al., PNAS., 90:6909-13 (1993)), polipéptidos vinílogos (Hagihara et al., J. Amer. Chem. Soc., 114:6568 (1992)), peptidomiméticos no peptídicos con armazón de glucosa (Hirschmann et al., J. Amer. Chem. Soc., 114:9217-18 (1992)), síntesis orgánicas análogas de bibliotecas de pequeños compuestos (Chen et al., J. Amer. Chem. Soc., 116:2661 (1994)), oligocarbamatos (Cho et al., Science, 261:1303 (1993)), fosfonatos de peptidilo (Campbell et al., J. Org. Chem., 59:658 (1994)), bibliotecas de ácidos nucleicos (Ausubel, Berger y Sambrook, todos más arriba), bibliotecas de ácidos nucleicos peptídicos (patente de EE.UU. n° 5.539.083), bibliotecas de anticuerpos (Vaughn et al., Nature Biotechnology, 14(3):309-14 (1996) y documento PCT/US96/10287), bibliotecas de hidratos de carbono (Liang et al., Science, 274:1520-22 (1996)); y patente de EE.UU. n° 5.593.853), bibliotecas de moléculas orgánicas pequeñas (benzodiazepinas, Baum, C&EN, 18 de enero, p. 33 (1993); tiazolidinonas y metatiazanonas patente de EE.UU. n° 5.549.974; pirrolidinas patentes de EE.UU. n° 5.525.735 y 5.519.134; compuestos morfólinicos patente de EE.UU. n° 5.506.337; benzodiazepinas 5.288.514 y similares).

Los dispositivos para la preparación de bibliotecas combinatorias están comercialmente disponibles (véanse, por ejemplo, 357 MPS, 390 MPS (Advanced Chem Tech, Louisville, Ky.), Symphony (Rainin, Woburn, Mass.), 433A (Applied Biosystems, Foster City, Calif.), 9050 Plus (Millipore, Bedford, Mass.)). Además, las propias bibliotecas combinatorias numerosas están comercialmente disponibles (véase, por ejemplo, ComGenex, Princeton, N.J.; Tripos, Inc., St. Louis, Mo.; 3D Pharmaceuticals, Exton, Pa.; Martek Biosciences, Columbia, Md.; etc.).

En un aspecto de la invención, los moduladores de T2R se pueden utilizar en cualquier producto alimentario, dulces, composición farmacéutica, o sus ingredientes, para modular de ese modo el sabor del producto, composición o ingrediente de una manera deseada. Por ejemplo, se pueden añadir moduladores de T2R que potencian la sensación de sabor amargo para proporcionar un sabor amargo a un producto o composición, mientras que se pueden añadir moduladores de T2R que bloquean sensaciones de sabor amargo para bloquear el sabor amargo de un producto o composición. También, la invención proporciona medios para identificar compuestos amargos encontrados en alimentos, bebidas, cosméticos y medicamentos, y para producir alimentos, bebidas y medicamentos de sabor mejorado que carezcan o que tengan una cantidad reducida de los mismos.

Uso de compuestos identificados por la invención

Los compuestos identificados se pueden añadir a alimentos, bebidas, cosméticos o composiciones medicinales para modular, preferiblemente bloquear el sabor amargo producido por la activación de al menos uno de uno de hT2R8 y/o hT2R14 por compuestos amargos presentes en el café y alimentos, bebidas y medicamentos estructuralmente relacionados, o compuestos estructuralmente relacionados u otros compuestos amargos, por ejemplo compuestos encontrados en alimentos y bebidas o medicamentos o cosméticos que estimulan una percepción de sabor amargo.

Como se señala previamente, preferiblemente, las propiedades moduladoras del sabor, preferiblemente las propiedades de bloqueo del sabor amargo de los compuestos identificados en los ensayos basados en células de T2R objeto se confirmarán en pruebas de sabor en seres humanos o en animales, preferiblemente pruebas de sabor en seres humanos.

Kits

Los genes T2R y sus homólogos son herramientas útiles para identificar células receptoras gustativas, para determinaciones forenses y de paternidad, y para examinar la transducción del gusto. Los reactivos específicos de los miembros de la familia de T2R que se hibridan específicamente a ácidos nucleicos de T2R, tales como sondas y cebadores de T2R, y los reactivos específicos de T2R que se unen específicamente a una proteína de T2R, por ejemplo anticuerpos anti-T2R, se utilizan para examinar la expresión de las células gustativas y la regulación de la transducción del gusto.

Los ensayos de ácidos nucleicos para determinar la presencia de ADN y ARN para un miembro de la familia de T2R en una muestra incluyen numerosas técnicas conocidas por los expertos en la técnica, tales como análisis Southern, análisis Northern, transferencias de punto, protección de ARNasa, análisis de S1, técnicas de amplificación tales como PCR, e hibridación in situ. En la hibridación in situ, por ejemplo, el ácido nucleico diana se libera de sus entornos celulares para que esté disponible para la hibridación en la célula, mientras conserva la morfología celular para la interpretación y análisis subsiguientes. Los siguientes artículos proporcionan un repaso de la técnica de hibridación in situ: Singer et al., *Biotechniques*, 4:230250 (1986); Haase et al., *Methods in Virology*, vol. VII, 189-226 (1984); y Names et al., eds., *Nucleic Acid Hybridization: A Practical Approach* (1987). Además, una proteína de T2R puede detectarse con las diversas técnicas de inmunoensayo descritas anteriormente. La muestra de ensayo se compara típicamente tanto con un control positivo (por ejemplo, una muestra que expresa una proteína de T2R recombinante) como con un control negativo.

También se describen kits para identificar moduladores de miembros de la familia de T2R. Tales kits pueden prepararse a partir de materiales y reactivos fácilmente disponibles. Por ejemplo, tales kits pueden comprender uno cualquiera o más de los siguientes materiales: ácidos nucleicos o proteínas de T2R, tubos de reacción, e instrucciones para ensayar la actividad de T2R. Opcionalmente, el kit contiene un polipéptido de T2R funcional. Según la invención, se puede preparar una amplia variedad de kits y componentes, dependiendo del usuario pretendido del kit y de las necesidades particulares del usuario.

Habiendo descrito ahora generalmente la invención, la misma se entenderá más fácilmente mediante referencia a los siguientes ejemplos, que se proporcionan a título de ilustración y no están destinados a ser limitantes.

## EJEMPLOS

### Ejemplo 1

hT2R8 y hT2R14 son activados por la fracción amarga del café

Se usó una fracción amarga parcialmente purificada procedente de café para identificar los 25 T2Rs humanos en células HEK transfectadas transitoriamente como se describe en solicitudes de patentes previas. De forma breve (como se explica con más detalle en la publicación de patente de EE.UU. nº 2003/0170608), células de riñón

embrionicas humanas que expresan de forma estable el antígeno de linfocitos T grande y la proteína G15 (HEK-G15) se transfectaron transitoriamente con un plásmido de expresión de hT2R (por ejemplo, mediante el uso de fosfato de  $\text{Ca}^{2+}$  o mediante el uso de sistemas basados en lípidos). Adicionalmente, otras estirpes celulares de HEK-G15 se transfectaron transitoriamente con otros T2Rs humanos. Después, se utilizó un ensayo basado en fluorescencia para detectar cambios en la concentración de calcio en las células transfectadas de forma transitoria. La interacción del compuesto o compuestos de ensayo con las células transfectadas provocó una cascada de señalización que conduce a la activación de PLC y a un incremento subsiguiente en la concentración de calcio intracelular, dando como resultado un incremento de la fluorescencia que se detectó utilizando colorante fluorescente sensible a calcio. Estos cambios se monitorizaron, por ejemplo, utilizando microscopía de fluorescencia y software apropiadamente diseñado (tal como Imaging Workstation, Axon).

La fracción del café tiene un nivel elevado de fluorescencia, que interfirió con el ensayo. Para superar la interferencia, se ensayó un número de colorantes azules para determinar la capacidad de bloquear la fluorescencia procedente de la fracción del café. Como se muestra en la Fig. 1, la fracción del café activó hT2R8 y hT2R14 en ensayo de formación de imágenes de calcio utilizando células transfectadas transitoriamente. El colorante azul utilizado en el experimento de la Fig. 1 es FD&C 1 a 1,9 mM. También parece que otros diversos hT2Rs son activados por esta fracción del café. Con diferentes colorantes azules, se activan diferentes combinaciones de hT2Rs (Tabla 1). Sin embargo, hT2R8 y hT2R14 son reconocidos consistentemente como sensibles a la fracción del café, y las actividades de estos dos receptores dependen de la dosis de la fracción del café (Fig. 2). El colorante azul utilizado en el experimento de la Fig. 2 fue azul de tripano.

Tabla 1. hT2Rs activados por la fracción del café con diferentes colorantes azules

Colorante azul	Receptores hT2R identificados	
	Se activa	Se activa débilmente
FD&C 1	8, 14	---
Tripano	1, 8, 14	10, 75
Coomassie	14	---

Utilizando este ensayo, se encontró que la adición de la fracción amarga del café a células que expresan hT2R8 y hT2R14 activó proteínas G intracelulares. Por el contrario, utilizando el mismo ensayo, la fracción amarga del café no activó específicamente células HEK-G15 que se transfectaron transitoriamente con otros hT2Rs. Este experimento apoya la conclusión de que los receptores gustativos hT2R8 y hT2R14 responden específicamente a compuesto o compuestos amargos presentes en el café.

## Ejemplo 2

### Identificación de antagonistas de hT2R8 y hT2R14

Para identificar antagonistas, estirpes celulares que expresan de forma estable hT2R8 y hT2R14, respectivamente, junto con la proteína G16g44 quimérica promiscua, se generaron como se describió en las solicitudes de patentes previas. Se estableció un ensayo de alto rendimiento utilizando las estirpes celulares estables y FLIPR (lector de placas de formación de imágenes fluorescentes). Se utilizó un agonista de hT2R8 o hT2R14 para activar los receptores hasta 70-80% de su actividad máxima respectiva. Para hT2R8, el agonista utilizado fue andrografolida (200  $\mu\text{M}$ ); para hT2R14, fue ácido aristolóquico (3  $\mu\text{M}$ ). Para identificar antagonistas, se añadieron compuestos con diversas estructuras químicas junto con el agonista. Los compuestos que provocan una reducción estadísticamente significativa de la actividad del receptor se reúnen, y se reafirman con curvas de inhibición dependiente de la dosis. El Compuesto A y el Compuesto B se identificaron como antagonistas de hT2R8 (Fig. 3). El Compuesto C se identificó como un antagonista de hT2R14 (Fig. 4).

### Ejemplo 2a de Referencia

#### Combinaciones de antagonistas de hT2R8 y hT2R14 reducen el sabor amargo del café

Se llevaron a cabo pruebas de sabor con combinaciones de antagonistas de hT2R8 y hT2R14 en la fracción del café y dos tipos de café instantáneo (tueste medio y tueste medio-oscuro), utilizando un método de elección forzada de 2 alternativas con un panel de catadores de 4-5 panelistas. Las muestras de café con los antagonistas se proporcionaron a los panelistas catadores junto con la misma muestra sin antagonistas, se pidió a los panelistas que identificasen la muestra que tenía un sabor más amargo dentro del par. Como se muestra en la Tabla 2, los panelistas identificaron de forma consistente las muestras de fracción del café sin antagonistas como más amargas que aquellas con antagonistas, indicando que los antagonistas redujeron el sabor amargo de la fracción del café. De

forma similar, como se muestra en la Tabla 3, los antagonistas redujeron el sabor amargo de ambos tipos de café instantáneo.

5 Como se demostró por las pruebas de sabor de este ejemplo, la percepción de amargor en composiciones (por ejemplo, alimentos, bebidas y/o medicamentos) que muestran sabor amargo se puede reducir o eliminar mediante la incorporación de antagonistas de hT2R8 y/o hT2R14 en tales composiciones.

Para determinar la contribución de un antagonista individual, se llevaron a cabo pruebas de sabor con café instantáneo de tueste medio con el Compuesto C de referencia. Como se muestra en la Tabla 4, el antagonista de hT2R14 (Compuesto C) es por sí mismo suficiente para reducir el sabor amargo en el café de este ejemplo.

Tabla 2. Resultados de las pruebas de sabor con fracción del café y 2 combinaciones diferentes de antagonistas

Prueba	Antagonista		Concentración ( $\mu\text{M}$ )	Seleccionado como más amargo		Valor de P
	hT2R8	hT2R14		Sin antagonistas	Con antagonistas	
1	Cmp A	CmpC	30	32	0	<0,001
2	Cmp B	CmpC	30	15	1	0,001
3	Cmp A	CmpC	10	16	0	<0001

10

Tabla 3. Resultados de pruebas de sabor con 2 tipos de café instantáneo

Café instantáneo	Antagonistas		Concentración ( $\mu\text{M}$ )	Seleccionado como más amargo		Valor de P
	hT2R8	hT2R14		Sin antagonistas	Más antagonistas	
Medio	Cmp A	Cmp C	30	16	0	<0,001
Medio-oscuro	Cmp A	Cmp C	30	13	3	0,021

Tabla 4. Resultados de pruebas de sabor con café de tueste medio y antagonista individual

Prueba de sabor	Antagonista	Concentración ( $\mu\text{M}$ )	Seleccionado como más amargo		Valor de P
			Sin antagonista	Con antagonista	
1	Compuesto C	50	18	2	<0,001
2	Compuesto C	25	19	1	<0,001

### 15 Ejemplo 3 de Referencia

El Compuesto C de referencia es un antagonista del receptor del amargor que actúa de forma amplia

El Ejemplo 2 anterior enseña que el compuesto C es un antagonista de T2R humano identificado mediante ensayos de identificación de alto rendimiento utilizando hT2R14. Experimentos adicionales revelan que el Compuesto C es un antagonista ampliamente mejorado para 13 T2Rs humanos, y antagonista en menor medida otros seis T2Rs humanos. Además, este compuesto en las pruebas de sabor bloquea la intensidad del sabor amargo provocada por un número de diversas sustancias amargas.

25 Específicamente, a fin de evaluar la selectividad inhibitoria del Compuesto C, este compuesto se ensayó frente a 22 T2Rs humanos que fueron identificados y emparejados por Senomyx. Estos receptores y los ligandos amargos que activan estos T2Rs humanos se dan a conocer en solicitudes de patentes previas citadas en la presente memoria. Estos 22 T2Rs humanos son hT2R1, 3, 4, 5, 7, 8, 9, 10, 13, 14, 16, 44, 51, 54, 55, 61, 63, 64, 65, 67, 71 y 75. Las secuencias de aminoácidos y de ácidos nucleicos de todos estos T2Rs se pueden encontrar en estas solicitudes de patentes previas. Estos T2Rs humanos se transfectaron transitoriamente cada uno de forma individual en células

HEK293 que expresan de forma estable la proteína G promiscua G16g44, y se efectuaron ensayos funcionales utilizando estos receptores como se describe en estas mismas solicitudes de patentes. En estos experimentos, cada receptor se activó mediante uno de sus ligandos seleccionados de moléculas amargas que se demostró previamente que activan en T2R particular. Los ligandos se utilizaron a niveles de concentración de EC80. La lista de ligandos amargos utilizados y las concentraciones de ligandos ensayados están contenidas en la Tabla 5 de este ejemplo.

Además, a fin de confirmar la actividad in vitro de este compuesto en el ensayo del receptor, los inventores llevaron a cabo pruebas de sabor de comparación pareada para determinar el efecto del compuesto in vivo. Se pidió a los panelistas catadores que saboreasen sustancias amargas con y sin el Compuesto C, y que identificasen cuál muestra tiene un sabor más amargo. Se saborearon múltiples pares por cada panelista para incrementar el tamaño de la muestra, y los resultados se analizaron utilizando métodos estadísticos apropiados. El orden de las muestras con y sin Compuesto C se distribuyó al azar y se contrabalanceó.

A fin de establecer las amplias propiedades antagónicas de este compuesto, se ensayó para determinar su capacidad para bloquear el sabor amargo provocado por una variedad de ligandos amargos, así como el sabor amargo provocado por ligandos amargos que se sabe que activan múltiples receptores del sabor amargo, y ligandos amargos que no se ha demostrado todavía que activan un hT2R específico. Se ensayaron varias moléculas amargas que se sabe que activan receptores del amargor, para las cuales la activación está inhibida por el Compuesto C. Específicamente, la salicina es una molécula amarga que activa hT2R16, y los resultados de las pruebas de sabor mostraron que el Compuesto C a 40  $\mu$ M puede reducir su sabor amargo. La feniltiourea es una molécula amarga que activa hT2R51, y el Compuesto C redujo su sabor amargo a 25  $\mu$ M.

De forma similar, varias moléculas amargas que pueden activar múltiples T2Rs se ensayaron con el Compuesto C. La activación de receptores del amargor para algunas de estas moléculas fue inhibida parcialmente por el Compuesto C. El omeprazol es una molécula amarga que activa hT2R10, 14 y 75. A pesar de que su sabor amargo puede implicar múltiples receptores del amargor, su sabor amargo también se redujo apreciablemente por el Compuesto C. Rebaudiosida A es un edulcorante natural con un fuerte sabor amargo, que activa al menos 7 T2Rs humanos. Su sabor amargo también es reducido por el Compuesto C.

Además, el Compuesto C inhibió el sabor amargo para algunos compuestos en los que el receptor o receptores con los que interacciona son desconocidos, tales como dextrometorfano y difenhidramina. Se ensayó el efecto del Compuesto C sobre estos compuestos, y se descubrió que su sabor amargo también se redujo.

Con respecto a lo anterior, la Figura 5 contiene resultados experimentales en los que el Compuesto C se ensayó con diferentes compuestos agonistas. La actividad inhibitoria se representa mediante la reducción de la actividad del receptor en presencia del Compuesto C. La Figura 5 revela que 13 hT2Rs diferentes fueron inhibidos significativamente (más del 30%) por el Compuesto C. Estos 13 hT2Rs son hT2R3, 7, 10, 14, 16, 44, 51, 55, 61, 63, 64, 65, y 71. También se inhibieron otros seis receptores, incluyendo hT2R5, 9, 13, 54, 67 y 75, aunque en menor grado.

Tabla 5. Listado de ligandos y concentraciones utilizadas para cada T2R ensayado

hT2Rs	Agonista	Concentración
1	Ácido pícrico	0,05 mM
3	Cloroquina pH 6,5	50 $\mu$ M
4	Cloroquina pH 6,5	5 mM
5	Picolina	10 mM
7	Cloroquina pH 6,5	10 mM
8	Andrografolida	0,5 mM
9	Ofloxacina	1 mM
10	Estricnina	50 $\mu$ M
13	Oxifenonio	1 mM
14	Ácido aristolóquico	2 $\mu$ M
16	Salicina	1 mM
44	Denatonio	0,5 $\mu$ M

hT2Rs	Agonista	Concentración
51	Prop	2,5 $\mu$ M
54	Ranitidina	5 mM
55	Cinconina	150 $\mu$ M
61	Ácido aristolóquico	25 nM
63	Cafeína	1 mM
63	Andrografolida	100 $\mu$ M
64	Ácido aristolóquico	1 $\mu$ M
65	Oleuropeína	1 mM
67	Andrografolida	5 $\mu$ M
71	Ácido pícrico	10 $\mu$ M
75	Estricnina	1 $\mu$ M

#### Ejemplo 7. Datos sensoriales para el Ejemplo 10-10

Para determinar la eficacia de un antagonista individual, se llevaron a cabo pruebas de sabor con un antagonista específico de T2R8, el compuesto de interés y un bloqueador del amargor de referencia. Hemos descrito previamente un buen antagonista de hT2R8 que se demostró que tiene efecto gustativo, Ejemplo 4-8 de la Sol. Provisional de EE.UU. Ser. nº 60/957.129, presentada el 21 de agosto de 2007: N-(1-((3,5-dimetilisoxazol-4-il)metil)-1H-pirazol-4-il)benzo[d][1,3]dioxol-5-carboxamida. Se mostró que reduce el amargor del café por sí mismo y en combinación con un bloqueador del amargor de amplio espectro). Como se muestra en la Tabla 6, cuando se comparó con nuestro antagonista de control (Ejemplo 10-8) el antagonista de hT2R8 del ejemplo 10-10 muestra una mayor capacidad para bloquear el amargor percibido.

Número de ejemplo	IC <sub>50</sub> de ensayo de HTS $\mu$ M	Seleccionado como más amargo		Valor de p	Conc. de antagonista $\mu$ M
		10-8	+ otro		
10-10	0,02-0,04	14	2	0,004	1

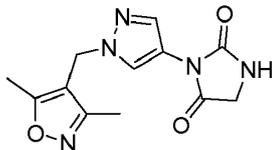
Tabla 6. Resultados de las pruebas de sabor que comparan un bloqueador del amargor de control y un bloqueador del amargor más potente 10-10.

Como se demostró por las pruebas de sabor de este ejemplo, la percepción del amargor se puede reducir o eliminar incorporando antagonistas de hT2R8, y el antagonista del Ejemplo 10-10 parece ser un análogo más potente cuando se compara con antagonistas del amargor conocidos como N-(1-((3,5-dimetilisoxazol-4-il)metil)-1H-pirazol-4-il)benzo[d][1,3]dioxol-5-carboxamida (7767). Se concluye que la percepción del amargor se puede reducir o eliminar mediante la incorporación de antagonistas de hT2R8 en composiciones tales como alimentos, bebidas y/o medicamentos, en los que el sabor amargo es provocado por agonistas de T2R8.

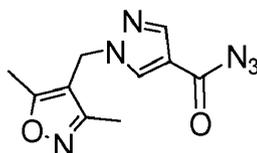
#### Ejemplo 8. Identificación de antagonistas de hT2R8

Para identificar antagonistas, se generaron como se describe en solicitudes de patentes previas estirpes celulares que expresan de forma estable hT2R8 junto con la proteína G16g44 quimérica promiscua. Se estableció un ensayo de alto rendimiento utilizando las estirpes celulares estables y FLIPR (lector de placas de formación de imágenes fluorescentes). Se utilizó un agonista de hT2R8 para activar los receptores hasta 70-80% de su actividad máxima respectiva. Para hT2R8, el agonista utilizado fue andrografolida (200  $\mu$ M). Para identificar antagonistas, se añadieron compuestos con diversas estructuras químicas junto con el agonista. Los compuestos que provocan una reducción estadísticamente significativa de la actividad del receptor se reúnen, y se reafirman con curvas de inhibición dependiente de la dosis. El armazón A y el armazón B se identificaron como antagonistas de hT2R8 (Fig. 1). En la Tabla 1 se presentan ejemplos específicos.

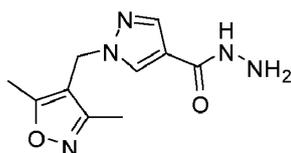
#### Ejemplo 10: Antagonistas de hT2R8: Obtención de los compuestos de la invención

**Ejemplo 10-1: 3-(1-((3,5-dimetilisoxazol-4-il)metil)-1H-pirazol-4-il)imidazolidin-2,4-diona**

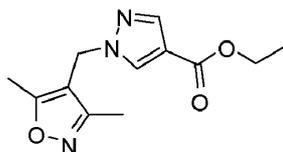
Se puso a reflujo 1-((3,5-dimetilisoxazol-4-il)metil)-1H-pirazol-4-carbonil azida (ejemplo 10-1a) (6 g, 25,5 mmoles) en tolueno (100 ml) durante 1 hora y se enfrió hasta la temperatura ambiente en una atmósfera de nitrógeno. Se añadió hidrocloreuro del éster metílico de glicina (3,1 g, 26 mmoles) y trietilamina (3,2 g, 32 mmoles), y la mezcla se puso a reflujo durante 16 horas. La reacción se enfrió, y el disolvente se eliminó en el evaporador giratorio. El sólido se volvió a disolver en acetato de etilo (100 ml), y la fase orgánica se lavó con disolución 1N de HCl (2 x, 150 ml). La fase acuosa se volvió a extraer con acetato de etilo (2 x, 75 ml), y los extractos orgánicos combinados se secaron sobre sulfato de sodio y se concentraron. El sólido resultante se trituró con acetato de etilo/hexanos (1/9) y se secó a alto vacío para producir 3-(1-((3,5-dimetilisoxazol-4-il)metil)-1H-pirazol-4-il)imidazolidin-2,4-diona (5,2 g, 74%) como un sólido blanco. RMN <sup>1</sup>H (DMSO-d<sub>6</sub>, 400 MHz): δ 2,19 (s, 3H), 2,42 (s, 3H), 4,09 (s, 2H), 5,06 (s, 2H), 5,68 (bs, 1H), 7,90 (s, 1H), 8,05 (1H). Se mostró que el compuesto del título inhibe el receptor del amargor hT2R08 y tuvo una IC<sub>50</sub> de 1,7 μM.

**Ejemplo 10-1a: 1-((3,5-dimetilisoxazol-4-il)metil)-1H-pirazol-4-carbonil azida**

Se añadió nitrito de sodio (450 mg, 6,5 mmoles, en H<sub>2</sub>O) (10 ml) gota a gota, durante 10 minutos, a una suspensión de 1-((3,5-dimetilisoxazol-4-il)metil)-1H-pirazol-4-carbohidrazida (ejemplo 10-1b) (1 g, 4,3 mmoles) en ácido acético acuoso al 10% (50 ml), y se enfrió hasta 0°C vía un baño de agua con hielo. La reacción se agitó durante otros 15 minutos, y después se extrajo con acetato de etilo (3 x, 75 ml). Los extractos orgánicos combinados se lavaron con carbonato de sodio acuoso saturado (100 ml) seguido de H<sub>2</sub>O (100 ml). Los extractos orgánicos combinados se secaron sobre sulfato de sodio, se filtraron y se concentraron. El producto sólido se trituró con acetato de etilo/hexanos (1/9) y se secó a vacío para producir 1-((3,5-dimetilisoxazol-4-il)metil)-1H-pirazol-4-carbonil azida (1 g, 93%) como un sólido blanco. RMN <sup>1</sup>H (CDCl<sub>3</sub>, 400 MHz): δ 2,20 (s, 3H), 2,44 (s, 3H), 5,07 (s, 2H), 7,81 (s, 1H), 7,93 (s, 1H).

**Ejemplo 10-1b: 1-((3,5-dimetilisoxazol-4-il)metil)-1H-pirazol-4-carbohidrazida**

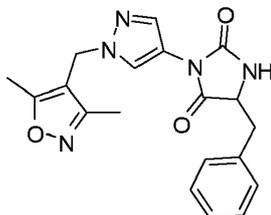
Se agitaron 1-((3,5-dimetilisoxazol-4-il)metil)-1H-pirazol-4-carboxilato de etilo (ejemplo 10-1c) (6 g, 24 mmoles) e hidrazina (7,5 g, 240 mmoles) en EtOH (100 ml) a reflujo durante 12 horas. La disolución se concentró en el evaporador giratorio, y el producto sólido se trituró con acetato de etilo/hexanos (1/9) y se secó a alto vacío para producir 1-((3,5-dimetilisoxazol-4-il)metil)-1H-pirazol-4-carbohidrazida (5,5 g, 97%) como un sólido blanco puro. RMN <sup>1</sup>H (DMSO-d<sub>6</sub>, 400 MHz): δ 2,11 (s, 3H), 2,39 (s, 3H), 5,15 (s, 2H), 7,81 (s, 1H), 8,17 (s, 1H), 9,31 (bs, 1H).

**Ejemplo 10-1c: 1-((3,5-dimetilisoxazol-4-il)metil)-1H-pirazol-4-carboxilato**

Se agitaron 1H-pirazol-4-carboxilato de etilo (4,2 g, 30 mmoles), 4-(clorometil)-3,5-dimetilisoxazol (5,1 g, 35 mmoles), y carbonato de cesio (9,8 g, 30 mmoles), en DMF (50 ml), a 80°C durante 12 horas. La reacción se enfrió hasta la temperatura ambiente, se diluyó con HCl 0,1 N (150 ml) y se extrajo con acetato de etilo (3 x, 75 ml). Los extractos orgánicos combinados se secaron sobre sulfato de sodio y se concentraron en el evaporador giratorio. El producto sólido se trituró con acetato de etilo/hexanos (1/9) y se recogió mediante filtración para producir 1-((3,5-dimetilisoxazol-4-il)metil)-1H-pirazol-4-carboxilato de etilo (6 g, 80%) como un sólido blanco. RMN <sup>1</sup>H (CDCl<sub>3</sub>, 400

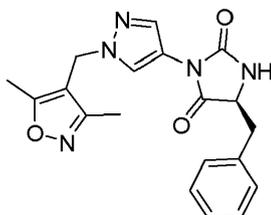
MHz):  $\delta$  1,34 (t,  $J = 7,2$  Hz, 3H), 2,19 (s, 3H), 2,43 (s, 3H), 4,29 (q,  $J = 7,2$  Hz, 2H), 5,06 (s, 2H), 7,77 (s, 1H), 7,91 (s, 1H).

**Ejemplo 10-2: 3-(1-((3,5-dimetilisoxazol-4-il)metil)-1H-pirazol-4-il)imidazolidin-2,4-diona**



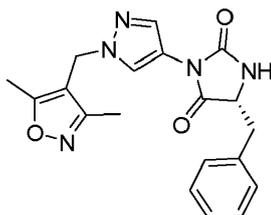
5 Preparada como en el ejemplo 10-1 a partir de hidrocloreto del éster metílico de (+/-)-fenilalanina y 1-((3,5-dimetilisoxazol-4-il)metil)-1H-pirazol-4-carbonil azida. Rendimiento: 58%. RMN  $^1\text{H}$  (acetona- $d_6$ , 400 MHz):  $\delta$  2,17 (s, 3H), 2,43 (s, 3H), 3,07 (dd,  $J = 14,4, 6,4$  Hz, 1H), 3,20 (dd,  $J = 14, 4,4$  Hz, 1H), 4,53 (t,  $J = 4,8$  Hz, 1H), 5,18 (s, 2H), 7,27-7,19 (m, 5H), 7,46 (bs, 1H), 7,79 (s, 1H), 7,99 (s, 1H). MS M+H calculado 366,15; encontrado 366,1. Punto de fusión: 169-171°C. Se mostró que el compuesto del título inhibe el receptor del amargor hT2R08 y tuvo una  $\text{IC}_{50}$  de 0,18  $\mu\text{M}$ .

**Ejemplo 10-3: (S)-5-bencil-3-(1-((3,5-dimetilisoxazol-4-il)metil)-1H-pirazol-4-il)imidazolidin-2,4-diona**



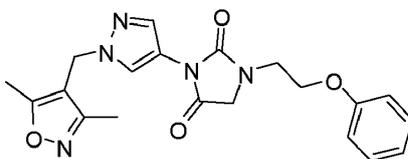
15 Preparada como en el ejemplo 10-1 a partir de hidrocloreto del éster metílico de (S)-fenilalanina y 1-((3,5-dimetilisoxazol-4-il)metil)-1H-pirazol-4-carbonil azida (ejemplo 6a). Rendimiento: 13% aislado a partir de cromatografía quiral. RMN  $^1\text{H}$  ( $\text{CDCl}_3$ , 400 MHz):  $\delta$  2,19 (s, 3H), 2,42 (s, 3H), 2,88 (dd,  $J = 13,6, 9,2$  Hz, 1H), 3,35 (dd,  $J = 13,6, 3,6$  Hz, 1H), 4,31-4,35 (m, 1H), 5,06 (s, 2H), 5,53 (bs, 1H), 7,21-7,36 (m, 5H), 7,85 (s, 1H), 8,01 (s, 1H). LC/MS;  $[\text{M}+\text{H}]$  calculado para  $\text{C}_{19}\text{H}_{19}\text{N}_5\text{O}_3$ ; esperado 366,15; encontrado 366,1.  $[\alpha]_D = (-) -136$ ,  $c = 0,1$ , etanol. Se mostró que el compuesto del título inhibe el receptor del amargor hT2R08 y tuvo una  $\text{IC}_{50}$  de 0,12  $\mu\text{M}$ .

**Ejemplo 10-4: (R)-5-bencil-3-(1-((3,5-dimetilisoxazol-4-il)metil)-1H-pirazol-4-il)imidazolidin-2,4-diona**



20 Preparada como en el ejemplo 10-1 a partir de hidrocloreto del éster metílico de (R)-fenilalanina y 1-((3,5-dimetilisoxazol-4-il)metil)-1H-pirazol-4-carbonil azida. Rendimiento: 9% aislado a partir de cromatografía quiral. RMN  $^1\text{H}$  ( $\text{CDCl}_3$ , 400 MHz):  $\delta$  2,19 (s, 3H), 2,42 (s, 3H), 2,88 (dd,  $J = 13,6, 9,2$  Hz, 1H), 3,35 (dd,  $J = 13,6, 3,6$  Hz, 1H), 4,31-4,35 (m, 1H), 5,06 (s, 2H), 5,53 (bs, 1H), 7,21-7,36 (m, 5H), 7,85 (s, 1H), 8,01 (s, 1H). MS M+H calculado 366,15; encontrado 366,1.  $[\alpha]_D = (+) -124$ ,  $c = 0,2$ , etanol. Se mostró que el compuesto del título inhibe el receptor del amargor hT2R08 y tuvo una  $\text{IC}_{50}$  de 0,11  $\mu\text{M}$ .

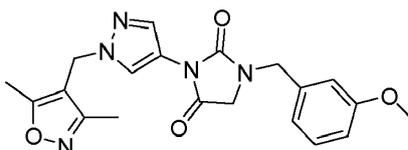
**Ejemplo 10-5: 3-(1-((3,5-dimetilisoxazol-4-il)metil)-1H-pirazol-4-il)-1-(2-fenoxietil)imidazolidin-2,4-diona**



30 Se irradiaron 3-(1-((3,5-dimetilisoxazol-4-il)metil)-1H-pirazol-4-il)imidazolidin-2,4-diona (ejemplo 10-1) (200 mg, 0,7 mmoles), (2-bromoetoxi)benceno (200 mg, 1 mmol), y carbonato de cesio (325 mg, 1 mmol) en el reactor de

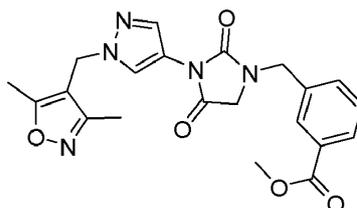
microondas a 85°C durante 20 minutos. La reacción se enfrió hasta la temperatura ambiente, se diluyó con HCl 1N acuoso (100 ml), y se extrajo con acetato de etilo (3 x, 75 ml). Los extractos orgánicos combinados se secaron sobre sulfato de sodio, se filtraron, y se concentraron. El residuo se recogió en metanol (10 ml) y se purificó mediante HPLC de fase inversa (gradiente 5 hasta 95% de acetonitrilo en H<sub>2</sub>O: 25 minutos). Las fracciones puras se reunieron, se concentraron, después se volvieron a disolver en etanol absoluto, y se concentraron en el evaporador giratorio (4x) para producir 3-(1-((3,5-dimetilisoaxazol-4-il)metil)-1H-pirazol-4-il)-1-(2-fenoxietil)imidazolidin-2,4-diona (150 mg, 54%) como un sólido blanco. RMN <sup>1</sup>H (CDCl<sub>3</sub>, 2,18, 400 MHz): δ (s, 3H), 2,41 (s, 3H), 3,86 (t, J = 5,2 Hz, 2H), 4,19 (t, J = 4,4 Hz, 2H), 4,25 (s, 2H), 5,05 (s, 2H), 6,88 (dd, J = 9,2, 1,2 Hz, 2H), 7,00 (dt, J = 7,6, 1,2 Hz, 1H), 7,27-7,32 (m, 2H), 7,89 (s, 1H), 8,05 (s, 1H). MS M+H calculado 396,17; encontrado 396,1. Punto de fusión: 117-118°C. Se mostró que el compuesto del título inhibe el receptor del amargor hT2R08 y tuvo una IC<sub>50</sub> de 0,06 μM.

**Ejemplo 10-6: 3-(1-((3,5-dimetilisoaxazol-4-il)metil)-1H-pirazol-4-il)-1-(3-metoxibencil)imidazolidin-2,4-diona**



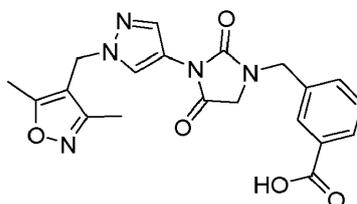
Preparada como en el ejemplo 10-5 a partir de 3-(1-((3,5-dimetilisoaxazol-4-il)metil)-1H-pirazol-4-il)imidazolidin-2,4-diona (ejemplo 6) y bromuro de 3-metoxi-bencilo. Rendimiento: 55%. RMN <sup>1</sup>H (CDCl<sub>3</sub>, 400 MHz): δ 2,19 (s, 3H), 2,42 (s, 3H), 3,81 (s, 3H), 3,85 (s, 2H), 4,58 (s, 2H), 5,06 (s, 2H), 6,81-6,88 (m, 3H), 7,26-7,31 (m, 1H), 7,92 (s, 1H), 8,08 (s, 1H). Se mostró que el compuesto del título inhibe el receptor del amargor hT2R08 y tuvo una IC<sub>50</sub> de 0,07 μM.

**Ejemplo 10-7: 3-((3-(1-((3,5-Dimetilisoaxazol-4-il)metil)-1H-pirazol-4-il)-2,4-dioxoimidazolidin-1-il)metil)benzoato de metilo**

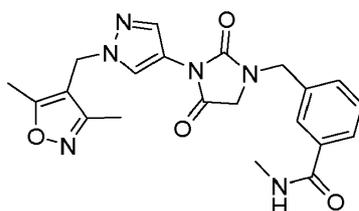


Preparado como en el ejemplo 10-5 a partir de 3-(1-((3,5-dimetilisoaxazol-4-il)metil)-1H-pirazol-4-il)imidazolidin-2,4-diona y bromuro de 3-metoxi-bencilo. Rendimiento: 83%. RMN <sup>1</sup>H (CDCl<sub>3</sub>, 400 MHz): δ 2,20 (s, 3H), 2,43 (s, 3H), 3,86 (s, 2H), 3,93 (s, 3H), 4,67 (s, 2H), 5,07 (s, 2H), 7,45-7,52 (m, 2H), 7,93 (s, 1H), 7,95 (s, 1H), 8,03 (dd, J = 7,2, 1,6 Hz, 1H), 8,08 (s, 1H). Se mostró que el compuesto del título inhibe el receptor del amargor hT2R08 y tuvo una IC<sub>50</sub> de 0,09 μM.

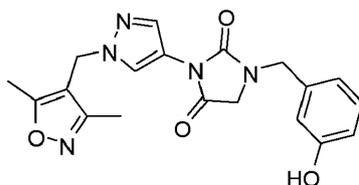
**Ejemplo 10-8: Ácido 3-((3-(1-((3,5-dimetilisoaxazol-4-il)metil)-1H-pirazol-4-il)-2,4-dioxoimidazolidin-1-il)metil)benzoico**



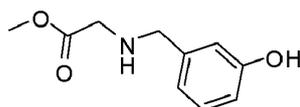
Se agitaron 3-(1-((3,5-dimetilisoaxazol-4-il)metil)-1H-pirazol-4-il)imidazolidin-2,4-diona (500 mg, 1,8 mmoles) (ejemplo 10-5), 3-(bromometil)benzoato de metilo (456 mg, 2 mmoles), y carbonato de cesio (650 mg, 2 mmoles) en DMF (4 ml) en el reactor de microondas a 85°C durante 20 minutos. La reacción se enfrió, se diluyó con HCl acuoso 1N (100 ml), y se extrajo con acetato de etilo (3 x, 75 ml). Los extractos orgánicos combinados se secaron sobre sulfato de sodio, se filtraron y se concentraron. El éster bruto se disolvió en metanol (5 ml), y se añadió NaOH acuoso (50 ml, 10% en peso), y la mezcla se agitó a temperatura ambiente durante 2 horas. La reacción se acidificó con HCl 1N (150 ml), y se extrajo con acetato de etilo (3 x, 75 ml). Los extractos orgánicos combinados se secaron sobre sulfato de sodio, se filtraron, y se concentraron en el evaporador giratorio. El ácido libre se trituró con acetato de etilo/hexanos (1/9) y se secó a vacío para producir ácido 3-((3-(1-((3,5-dimetilisoaxazol-4-il)metil)-1H-pirazol-4-il)-2,4-dioxoimidazolidin-1-il)metil)benzoico (610. mg, 83%) como un sólido blanco. RMN <sup>1</sup>H (DMSO-d<sub>6</sub>, 400 2,13 (s, 3H), 2,29 (s, 3H), 4,00 (s, 2H), 4,59 (s, 2H), 5,18 (s, 2H), MHz): δ 7,46-7,59 (m, 2H), 7,78 (s, 1H), 7,85-7,88 (m, 2H), 8,18 (s, 1H). Se mostró que el compuesto del título inhibe el receptor del amargor hT2R08 y tuvo una IC<sub>50</sub> de 1,8 μM.

**Ejemplo 10-9: 3-((3-(1-((3,5-Dimetilisoxazol-4-il)metil)-1H-pirazol-4-il)-2,4-dioximidazolidin-1-il)metil)-N-metilbenzamida**

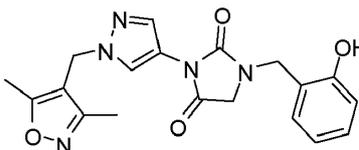
5 Se irradiaron ácido 3-((3-(1-((3,5-dimetilisoxazol-4-il)metil)-1H-pirazol-4-il)-2,4-dioximidazolidin-1-il)metil)benzoico (100 mg, 0,24 mmoles) (ejemplo 10-8), hidrocloreto de metilamina (67 mg, 1 mmol), trietilamina (155 mg, 1,5 mmoles), y EDC (57 mg, 0,3 mmoles) en acetonitrilo (3 ml) en el reactor de microondas a 80°C durante 10 minutos. La reacción se enfrió, se diluyó con HCl 1N acuoso (100 ml) y se extrajo con acetato de etilo (3 x, 75 ml). Los extractos orgánicos combinados se secaron sobre sulfato de sodio, se filtraron y se concentraron. El producto bruto se disolvió en MeOH (3 ml), y se purificó mediante HPLC de fase inversa (gradiente de 5 hasta 95% de acetonitrilo en H<sub>2</sub>O: 25 minutos) para producir 3-((3-(1-((3,5-dimetilisoxazol-4-il)metil)-1H-pirazol-4-il)-2,4-dioximidazolidin-1-il)metil)-N-metilbenzamida (25 mg, 25%) como un sólido blanco. MS M+H calculado 423,17; encontrado 423,2. Se mostró que el compuesto del título inhibe el receptor del amargor hT2R08 y tuvo una IC<sub>50</sub> de 0,14 μM.

**Ejemplo 10-10: 3-(1-((3,5-Dimetilisoxazol-4-il)metil)-1H-pirazol-4-il)-1-(3-hidroxibencil)imidazolidin-2,4-diona:**

15 Preparada como en el ejemplo 10-1 a partir de 1-((3,5-dimetilisoxazol-4-il)metil)-1H-pirazol-4-carbonil azida (ejemplo 10-1a) y 2-(3-hidroxibencilamino)acetato de metilo (ejemplo 10-10a). Rendimiento: 24%. RMN <sup>1</sup>H (DMSO, 400 MHz): δ 2,15 (s, 3H), 2,41 (s, 3H), 3,99 (s, 2H), 4,45 (s, 2H), 5,21 (s, 2H), 6,70 (m, 3H), 7,15 (m, H), 7,80 (s, 1H), 8,19 (s, H), 9,44 (s, H). LC/MS; [M+H] esperado 382,1; encontrado 382,1. Punto de fusión: 35-136°C. Se mostró que el compuesto del título inhibe el receptor del amargor hT2R08 y tuvo una IC<sub>50</sub> de 0,035 μM.

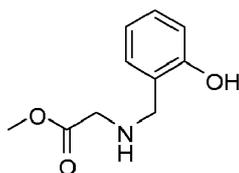
**Ejemplo 10-10a: 2-(3-Hidroxibencilamino)acetato de metilo:**

25 Se disolvieron éster metílico de glicina (500 mg, 4 mmoles) y 3-hidroxibenzaldehído (480 mg, 4 mmoles) en 5 ml de THF/metanol (1:1). Se añadieron lentamente a la reacción ácido acético (240 mg, 4 mmoles), y cianoborohidruro sodio de 1M en THF (4,8 ml, 4,8 mmoles). La reacción se irradió en el reactor de microondas a 85°C durante 15 minutos, se enfrió hasta la temperatura ambiente, y las sales se eliminaron mediante filtración. La disolución transparente se concentró, y el residuo se purificó mediante HPLC de fase inversa (gradiente de 10 hasta 95% de acetonitrilo en H<sub>2</sub>O: 25 minutos) para dar el compuesto del título como un gel transparente. Rendimiento 45%. MS M+H calculado 196,1; encontrado 196,1.

**Ejemplo 10-11: 3-(1-((3,5-Dimetilisoxazol-4-il)metil)-1H-pirazol-4-il)-1-(2-hidroxibencil)imidazolidin-2,4-diona:**

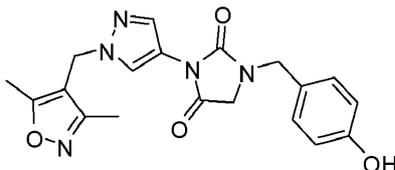
30 Preparada como en el ejemplo 10-1 a partir de 1-((3,5-dimetilisoxazol-4-il)metil)-1H-pirazol-4-carbonil azida (ejemplo 10-1a) y 2-(2-hidroxibencilamino)acetato de metilo (ejemplo 10-11a). Rendimiento: 28%. RMN <sup>1</sup>H (DMSO, 400 MHz): δ 2,12 (s, 3H), 2,38 (s, 3H), 4,00 (s, 2H), 4,45 (s, 2H), 5,17 (s, 2H), 6,83 (m, 2H), 7,10 (m, 2H), 7,78 (s, 1H), 8,16 (s, H), 9,66 (s, H). LC/MS; [M+H] esperado 382,1; encontrado 382,2. Se mostró que el compuesto del título inhibe el receptor del amargor hT2R08 y tuvo una IC<sub>50</sub> de 0,07 μM.

**Ejemplo 10-11a: 2-(2-Hidroxibencilamino)acetato de metilo:**



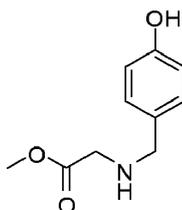
Preparado como en el ejemplo 10-10a a partir de éster metílico de glicina y 2-hidroxibenzaldehído. Rendimiento 40%. MS M+H calculado 196,1; encontrado 196,1

**Ejemplo 10-12: 3-(1-((3,5-Dimetilisoxazol-4-il)metil)-1H-pirazol-4-il)-1-(4-hidroxibencil)imidazolidin-2,4-diona:**



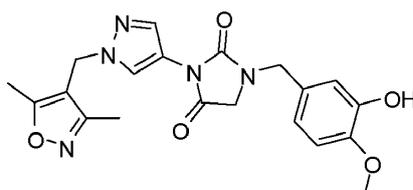
5 Preparada como en el ejemplo 10-1 a partir de 1-((3,5-dimetilisoxazol-4-il)metil)-1H-pirazol-4-carbonil azida y 2-(4-hidroxibencilamino)acetato de metilo (ejemplo 10-12a). Rendimiento 9%. RMN <sup>1</sup>H (DMSO, 400 MHz): δ 2,117 (s, 3H), 2,383 (s, 3H), 3,918 (s, 2H), 4,387 (s, 2H), 5,174 (s, 2H), 6,719 (J = 8,8, d, 2H), 7,108 (J = 8,8, m, 2H), 7,761 (s, 1H), 8,154 (s, H), 9,399 (s, H). LC/MS; [M+H] esperado 382,1; encontrado 382,2. Se mostró que el compuesto del título inhibe el receptor del amargor hT2R08 y tuvo una IC<sub>50</sub> de 0,06 uM.

**Ejemplo 10-12a: 2-(4-Hidroxibencilamino)acetato de metilo:**



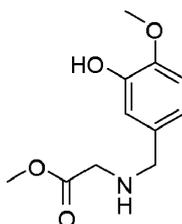
Preparado como en el ejemplo 10-10a a partir de éster metílico de glicina y 4-hidroxibenzaldehído. Rendimiento 40%. MS M+H calculado 196,1; encontrado 196,1.

15 **Ejemplo 10-13: 3-(1-((3,5-dimetilisoxazol-4-il)metil)-1H-pirazol-4-il)-1-(3-hidroxi-4-metoxibencil)imidazolidin-2,4-diona:**



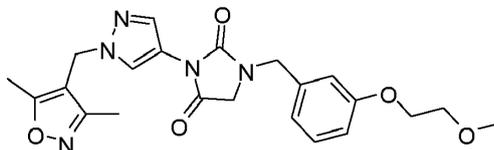
20 Preparada como en el ejemplo 10-1 a partir de 1-((3,5-dimetilisoxazol-4-il)metil)-1H-pirazol-4-carbonil azida (ejemplo 10-1a) y 2-(3-hidroxi-4-metoxibencilamino)acetato de metilo (ejemplo 10-13a). Rendimiento 22%. RMN <sup>1</sup>H (DMSO, 400 MHz): δ 2,119 (s, 3H), 2,383 (s, 3H), 3,716 (s, 3H), 3,923 (s, 2H), 4,361 (s, 2H), 5,117 (s, 2H), 6,667 (m, 2H), 6,863 (J = 8,4, d, 1H), 7,766 (s, H), 8,159 (s, H). MS M+H calculado 412,1; encontrado 412,1. Se mostró que el compuesto del título inhibe el receptor del amargor hT2R08 y tuvo una IC<sub>50</sub> de 0,1 uM.

**Ejemplo 10-13a: 2-(3-Hidroxi-4-metoxibencilamino)acetato de metilo:**



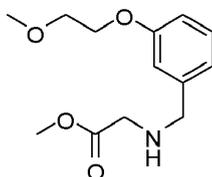
Preparado como en el ejemplo 10-10a a partir de éster metílico de glicina y 3-hidroxi-4-metoxibenzaldehído. Rendimiento 47%. MS M+H calculado 226,1; encontrado 226,1

**Ejemplo 10-14: 3-(1-((3,5-Dimetilisoxazol-4-il)metil)-1H-pirazol-4-il)-1-(3-(2-metoxietoxi)encil)imidazolidin-2,4-diona:**



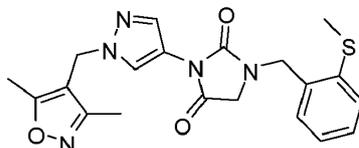
5 Preparada como en el ejemplo 10-1 a partir de 1-((3,5-dimetilisoxazol-4-il)metil)-1H-pirazol-4-carbonil azida (ejemplo 10-1a) y 2-(3-(2-metoxietoxi)encilamino)acetato de metilo (ejemplo 10-14a). Rendimiento 27%. RMN <sup>1</sup>H (DMSO, 400 MHz): δ 2,12 (s, 3H), 2,38 (s, 3H), 3,26 (s, 3H), 3,62 (t, J = 4,4, 2H), 3,98 (s, 2H), 4,06 (t, J = 4,4, 2H), 4,48 (s, 2H), 5,18 (s, 2H), 6,86 (m, 3H), 7,24 (t, J = 8, 1H), 7,78 (s, 1H), 8,17 (s, 1H). MS M+H calculado 440,2; encontrado 440,2. Se mostró que el compuesto del título inhibe el receptor del amargor hT2R08 y tuvo una IC<sub>50</sub> de 0,07 uM.

**Ejemplo 10-14a: 2-(3-(2-Metoxietoxi)encilamino)acetato de metilo:**



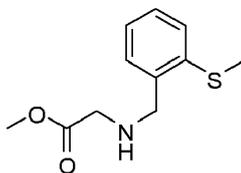
Preparado como en el ejemplo 10-10a a partir de éster metílico de glicina y 3-(2-metoxietoxi)benzaldehído. Rendimiento 55%. MS M+H calculado 254,1; encontrado 254,1

15 **Ejemplo 10-15: 3-(1-((3,5-Dimetilisoxazol-4-il)metil)-1H-pirazol-4-il)-1-(2-(metiltio)encil)imidazolidin-2,4-diona:**



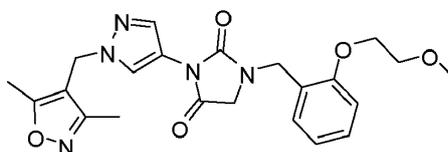
20 Preparada como en el ejemplo 10-1 a partir de 1-((3,5-dimetilisoxazol-4-il)metil)-1H-pirazol-4-carbonil azida (ejemplo 10-1a) y 2-(2-(metiltio)encilamino)acetato de metilo (ejemplo 10-15a). Rendimiento 67%. RMN <sup>1</sup>H (DMSO, 400 MHz): δ 2,12 (s, 3H), 2,39 (s, 3H), 2,48 (s, 3H), 3,98 (s, 2H), 4,54 (s, 2H), 5,19 (s, 2H), 7,18 (m, 1H), 7,30 (m, 3H), 7,79 (s, 1H), 8,18 (s, 1H). LC/MS; [M+H] esperado 412,1; encontrado 412,1. Se mostró que el compuesto del título inhibe el receptor del amargor hT2R08 y tuvo una IC<sub>50</sub> de 0,03 uM.

**Ejemplo 10-15a: 2-(2-(Metiltio)encilamino)acetato de metilo:**



25 Preparado como en el ejemplo 10-10a a partir de éster metílico de glicina y 2-(metiltio)benzaldehído. Rendimiento 50%. MS M+H calculado 226,1; encontrado 226,1.

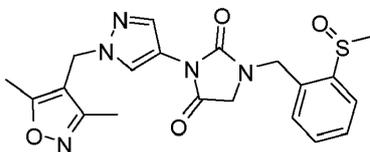
**Ejemplo 10-16: 3-(1-((3,5-Dimetilisoxazol-4-il)metil)-1H-pirazol-4-il)-1-(2-(2-metoxietoxi)encil)imidazolidin-2,4-diona:**



30 Preparada como en el ejemplo 10-5 a partir de 3-(1-((3,5-dimetilisoxazol-4-il)metil)-1H-pirazol-4-il)-1-(2-hidroxibencil)imidazolidin-2,4-diona (ejemplo 10-11) y éter metílico de 2-bromoetilo. Rendimiento 19%. RMN <sup>1</sup>H

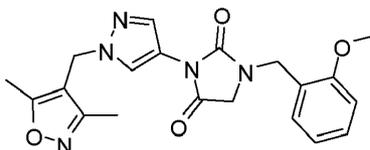
(DMSO, 400 MHz):  $\delta$  2,11 (s, 3H), 2,08 (s, 3H), 3,25 (s, 3H), 3,64 (t, J = 3,6, 2H), 4,00 (s, 2H), 4,11 (t, J = 3,2, 2H), 4,27 (s, 2H), 5,17 (s, 2H), 6,90 (m, 1H), 7,00 (m, 1H), 7,26 (m, 2H), 7,76 (s, 1H), 8,15 (s, 1H). Se mostró que el compuesto del título inhibe el receptor del amargor hT2R08 y tuvo una IC<sub>50</sub> de 0,1  $\mu$ M.

5 **Ejemplo 10-17: 33-(1-((3,5-Dimetilisoazol-4-il)metil)-1H-pirazol-4-il)-1-(2-(metilsulfinil)encil)imidazolidin-2,4-diona:**



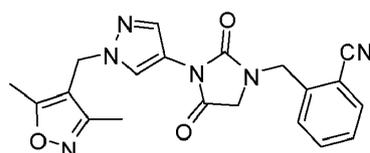
10 En un vial de microondas de 20 ml, se disolvieron 3-(1-((3,5-dimetilisoazol-4-il)metil)-1H-pirazol-4-il)-1-(2-(metil)encil)imidazolidin-2,4-diona (ejemplo 10-15) (70 mg, 0,17 mmoles) y m-CPBA (58 mg, 0,34 mmoles) en diclorometano a 0°C. La reacción se agitó a 0°C y se dejó calentar hasta la temperatura ambiente durante 4 horas. El disolvente de la reacción se eliminó a vacío, y el producto bruto se disolvió en 1 ml de etanol y se purificó mediante HPLC varian (10 hasta 95% de acetonitrilo/agua; 25 minutos). La fracción purificada se evaporó a vacío para dar el compuesto del título. MS M+H calculado 428,1; encontrado 428,1. Se mostró que el compuesto del título inhibe el receptor del amargor hT2R08 y tuvo una IC<sub>50</sub> de 0,4  $\mu$ M. Rendimiento: 12 mg, 17%.

**Ejemplo 10-18: 3-(1-((3,5-Dimetilisoazol-4-il)metil)-1H-pirazol-4-il)-1-(2-metoxibencil)imidazolidin-2,4-diona:**



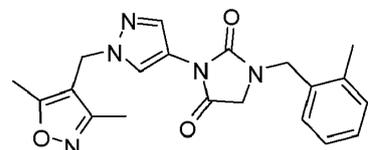
15 Preparada como en el ejemplo 10-5 a partir de 3-(1-((3,5-dimetilisoazol-4-il)metil)-1H-pirazol-4-il)imidazolidin-2,4-diona (ejemplo 10-1) y 1-(bromometil)-2-metoxibenceno (199 mg, 1 mmol). Rendimiento: 33%. MS M+H calculado 396,1; encontrado 396,1. Se mostró que el compuesto del título inhibe el receptor del amargor hT2R08 y tuvo una IC<sub>50</sub> de 0,06  $\mu$ M.

20 **Ejemplo 10-19: 2-((3-(1-((3,5-Dimetilisoazol-4-il)metil)-1H-pirazol-4-il)-2,4-dioxoimidazolidin-1-il)metil)benzonitrilo:**



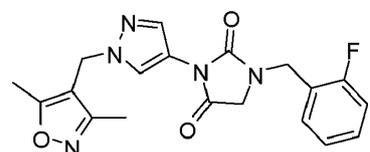
25 Preparado como en el ejemplo 10-5 a partir de 3-(1-((3,5-dimetilisoazol-4-il)metil)-1H-pirazol-4-il)imidazolidin-2,4-diona (ejemplo 10-1) y 2-(bromometil)benzonitrilo. Rendimiento: 27%. MS M+H calculado 391,1; encontrado 391,1. Se mostró que el compuesto del título inhibe el receptor del amargor hT2R08 y tuvo una IC<sub>50</sub> de 0,5  $\mu$ M.

**Ejemplo 10-20: 3-(1-((3,5-Dimetilisoazol-4-il)metil)-1H-pirazol-4-il)-1-(2-metilencil)imidazolidin-2,4-diona:**



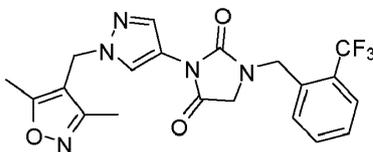
30 Preparada como en el ejemplo 10-5 a partir de 3-(1-((3,5-dimetilisoazol-4-il)metil)-1H-pirazol-4-il)imidazolidin-2,4-diona (ejemplo 10-1) y 1-(bromometil)-2-metilbenceno. Rendimiento: 21%. MS M+H calculado 380,1; encontrado 380,1. Se mostró que el compuesto del título inhibe el receptor del amargor hT2R08 y tuvo una IC<sub>50</sub> de 0,1  $\mu$ M.

**Ejemplo 10-21: 3-(1-((3,5-Dimetilisoazol-4-il)metil)-1H-pirazol-4-il)-1-(2-fluorobencil)imidazolidin-2,4-diona:**



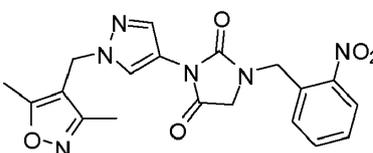
Preparada como en el ejemplo 10-5 a partir de 3-(1-((3,5-dimetilisoxazol-4-il)metil)-1H-pirazol-4-il)imidazolidin-2,4-diona (ejemplo 10-1) y 1-(bromometil)-2-fluorobenceno. Rendimiento 42%. MS M+H calculado 384,1; encontrado 384,1. Se mostró que el compuesto del título inhibe el receptor del amargor hT2R08 y tuvo una IC<sub>50</sub> de 0,08 uM.

5 **Ejemplo 10-22: 3-(1-((3,5-Dimetilisoxazol-4-il)metil)-1H-pirazol-4-il)-1-(2-(trifluorometil)encil)imidazolidin-2,4-diona:**



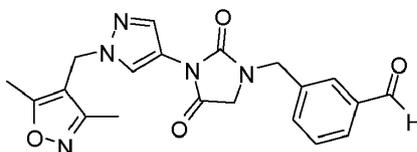
10 Preparada como en el ejemplo 10-5 a partir de 3-(1-((3,5-dimetilisoxazol-4-il)metil)-1H-pirazol-4-il)imidazolidin-2,4-diona (ejemplo 10-1) y 1-(bromometil)-2-(trifluorometil)benceno. Rendimiento: 37%. MS M+H calculado 434,1; encontrado 434,1. Se mostró que el compuesto del título inhibe el receptor del amargor hT2R08 y tuvo una IC<sub>50</sub> de 0,2 uM.

**Ejemplo 10-23: 3-(1-((3,5-Dimetilisoxazol-4-il)metil)-1H-pirazol-4-il)-1-(2-nitroencil)imidazolidin-2,4-diona:**



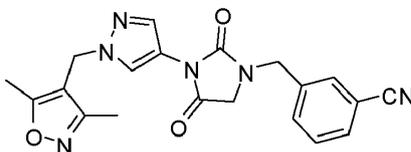
15 Preparada como en el ejemplo 10-5 a partir de 3-(1-((3,5-dimetilisoxazol-4-il)metil)-1H-pirazol-4-il)imidazolidin-2,4-diona (ejemplo 10-1) y 1-(bromometil)-2-nitrobenceno. Rendimiento 22%. MS M+H calculado 411,1; encontrado 411,1. Se mostró que el compuesto del título inhibe el receptor del amargor hT2R08 y tuvo una IC<sub>50</sub> de 0,07 uM.

**Ejemplo 10-24: 3-((3-(1-((3,5-Dimetilisoxazol-4-il)metil)-1H-pirazol-4-il)-2,4-dioxoimidazolidin-1-il)metil)benzaldehído:**



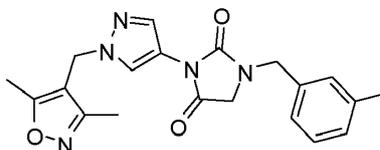
20 Preparado como en el ejemplo 10-5 a partir de 3-(1-((3,5-dimetilisoxazol-4-il)metil)-1H-pirazol-4-il)imidazolidin-2,4-diona (ejemplo 10-1) y 3-(bromometil)benzaldehído. Rendimiento: 35%. RMN <sup>1</sup>H (DMSO, 400 MHz): δ 2,123 (s, 3H), 2,388 (s, 3H), 4,035 (s, 2H), 4,631 (s, 2H), 5,186 (s, 2H), 7,581 (m, 1H), 7,643 (m, 1H), 7,787 (m, 3H), 8,178 (s, H), 9,997 (s, H). Se mostró que el compuesto del título inhibe el receptor del amargor hT2R08 y tuvo una IC<sub>50</sub> de 0,2 uM.

**Ejemplo 10-25: 3-((3-(1-((3,5-Dimetilisoxazol-4-il)metil)-1H-pirazol-4-il)-2,4-dioxoimidazolidin-1-il)metil)benzonitrilo:**



25 Preparado como en el ejemplo 10-5 a partir de 3-(1-((3,5-dimetilisoxazol-4-il)metil)-1H-pirazol-4-il)imidazolidin-2,4-diona (ejemplo 10-1) y 3-(bromometil)benzonitrilo. Rendimiento 21%. MS M+H calculado 411,1; encontrado 411,1. Se mostró que el compuesto del título inhibe el receptor del amargor hT2R08 y tuvo una IC<sub>50</sub> de 1 uM.

**Ejemplo 10-26: 3-(1-((3,5-Dimetilisoxazol-4-il)metil)-1H-pirazol-4-il)-1-(3-metilencil)imidazolidin-2,4-diona:**

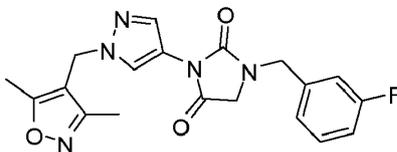


30

Preparada como en el ejemplo 10-5 a partir de 3-(1-((3,5-dimetilisoxazol-4-il)metil)-1H-pirazol-4-il)imidazolidin-2,4-diona (ejemplo 10-1) y 1-(bromometil)-3-metilbenceno. Rendimiento 25%. MS M+H calculado 380,1; encontrado 380,1. Se mostró que el compuesto del título inhibe el receptor del amargor hT2R08 y tuvo una IC<sub>50</sub> de 0,02 uM.

**Ejemplo 10-27: 3-(1-((3,5-Dimetilisoxazol-4-il)metil)-1H-pirazol-4-il)-1-(3-fluorobencil)imidazolidin-2,4-diona:**

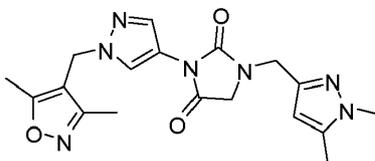
5



Preparada como en el ejemplo 10-5 a partir de 3-(1-((3,5-dimetilisoxazol-4-il)metil)-1H-pirazol-4-il)imidazolidin-2,4-diona (ejemplo 10-1) y 1-(bromometil)-3-fluorobenceno. Rendimiento 27%. MS M+H calculado 384,1; encontrado 384,1. Se mostró que el compuesto del título inhibe el receptor del amargor hT2R08 y tuvo una IC<sub>50</sub> de 0,06 uM.

**Ejemplo 10-28: 1-((1,5-Dimetil-1H-pirazol-3-il)metil)-3-(1-((3,5-dimetilisoxazol-4-il)metil)-1H-pirazol-4-il)imidazolidin-2,4-diona:**

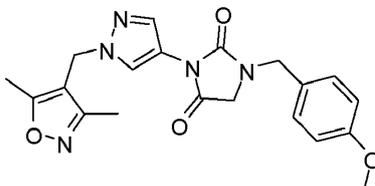
10



Preparada como en el ejemplo 10-5 a partir de 3-(1-((3,5-dimetilisoxazol-4-il)metil)-1H-pirazol-4-il)imidazolidin-2,4-diona (ejemplo 10-1) y 3-(bromometil)-1,5-dimetil-1H-pirazol. Rendimiento: 22%. MS M+H calculado 384,1; encontrado 384,1. Se mostró que el compuesto del título inhibe el receptor del amargor hT2R08 y tuvo una IC<sub>50</sub> de 0,3 uM.

15

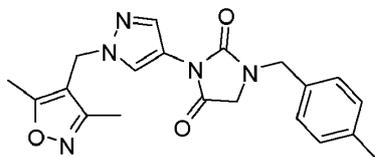
**Ejemplo 10-29: 3-(1-((3,5-Dimetilisoxazol-4-il)metil)-1H-pirazol-4-il)-1-(4-metoxibencil)imidazolidin-2,4-diona:**



Preparada como en el ejemplo 10-5 a partir de 3-(1-((3,5-dimetilisoxazol-4-il)metil)-1H-pirazol-4-il)imidazolidin-2,4-diona (ejemplo 10-1) y 1-(bromometil)-4-metoxibenceno. Rendimiento 19%. MS M+H calculado 396,1; encontrado 396,1. Se mostró que el compuesto del título inhibe el receptor del amargor hT2R08 y tuvo una IC<sub>50</sub> de 0,07 uM.

20

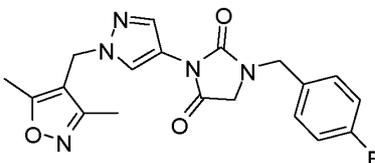
**Ejemplo 10-30: 3-(1-((3,5-Dimetilisoxazol-4-il)metil)-1H-pirazol-4-il)-1-(4-metilbencil)imidazolidin-2,4-diona:**



Preparada como en el ejemplo 10-5 a partir de 3-(1-((3,5-dimetilisoxazol-4-il)metil)-1H-pirazol-4-il)imidazolidin-2,4-diona (ejemplo 10-1) y 1-(bromometil)-4-metilbenceno. Rendimiento 25%. MS M+H calculado 380,1; encontrado 380,1. Se mostró que el compuesto del título inhibe el receptor del amargor hT2R08 y tuvo una IC<sub>50</sub> de 0,06 uM.

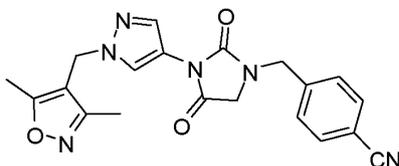
25

**Ejemplo 10-31: 3-(1-((3,5-Dimetilisoxazol-4-il)metil)-1H-pirazol-4-il)-1-(4-fluorobencil)imidazolidin-2,4-diona:**



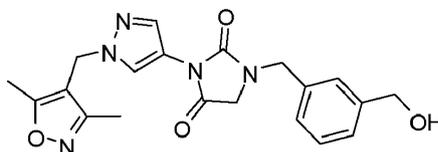
Preparada como en el ejemplo 10-5 a partir de 3-(1-((3,5-dimetilisoazol-4-il)metil)-1H-pirazol-4-il)imidazolidin-2,4-diona (ejemplo 10-1) y 1-(bromometil)-4-fluorobenceno. Rendimiento 33%. MS M+H calculado 384,1; encontrado 384,1. Se mostró que el compuesto del título inhibe el receptor del amargor hT2R08 y tuvo una IC<sub>50</sub> de 0,05 uM.

5 **Ejemplo 10-32: 4-((3-(1-((3,5-Dimetilisoazol-4-il)metil)-1H-pirazol-4-il)-2,4-dioxoimidazolidin-1-il)metil)benzonitrilo:**



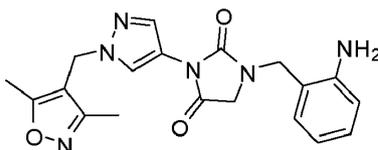
Preparado como en el ejemplo 10-5 a partir de 3-(1-((3,5-dimetilisoazol-4-il)metil)-1H-pirazol-4-il)imidazolidin-2,4-diona (ejemplo 10-1) y 4-(bromometil)benzonitrilo. Rendimiento 21%. MS M+H calculado 391,1; encontrado 391,2. Se mostró que el compuesto del título inhibe el receptor del amargor hT2R08 y tuvo una IC<sub>50</sub> de 0,05 uM.

10 **Ejemplo 10-33: 3-(1-((3,5-Dimetilisoazol-4-il)metil)-1H-pirazol-4-il)-1-(3-(hidroximetil)encil)imidazolidin-2,4-diona:**



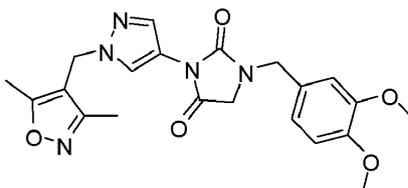
15 Se disolvió 3-((3-(1-((3,5-dimetilisoazol-4-il)metil)-1H-pirazol-4-il)-2,4-dioxoimidazolidin-1-il)metil)benzaldehído (ejemplo 10-24) (131 mg, 0,3 mmoles) en 2 ml de etanol. La disolución se hizo pasar a través del instrumento H-Cube a temperatura ambiente utilizando catalizador de Pd al 10%/C a un caudal de 1 ml/ minuto. La fracción recogida se concentró, se volvió a disolver en 2 ml de etanol, y se purificó mediante HPLC (10-95% de acetonitrilo/agua, 25 minutos). Las fracciones purificadas se combinaron y se concentraron para dar el compuesto del título. RMN <sup>1</sup>H (DMSO, 400 MHz): δ 2,123 (s, 3H), 2,388 (s, 3H), 3,978 (s, 2H), 4,516 (s, 2H), 5,182 (s, 2H), 7,242 (m, 4H), 7,779 (s, 1H), 8,172 (s, 1H), 8,505 (s, 1H). MS M+H calculado 396,1; encontrado 396,1. Se mostró que el compuesto del título inhibe el receptor del amargor hT2R08 y tuvo una IC<sub>50</sub> de 0,3 uM. Rendimiento: 24 mg, 18%.

**Ejemplo 10-34: 1-(2-Aminobencil)-3-(1-((3,5-dimetilisoazol-4-il)metil)-1H-pirazol-4-il)imidazolidin-2,4-diona:**



25 Se disolvió 3-(1-((3,5-dimetilisoazol-4-il)metil)-1H-pirazol-4-il)-1-(2-nitrobencil)imidazolidin-2,4-diona (ejemplo 10-23) (126 mg, 0,3 mmoles) en 2 ml de etanol. La disolución se hizo pasar a través del instrumento H-Cube a temperatura ambiente utilizando catalizador de Pd al 10%/C a un caudal de 1 ml/minuto. La fracción recogida se concentró, se volvió a disolver en 2 ml de etanol, y se purificó mediante HPLC (10-95% de acetonitrilo/agua, 25 minutos). Las fracciones purificadas se combinaron, y se concentraron para producir el compuesto del título. Rendimiento 26%. MS M+H calculado 381,1; encontrado 381,1. Se mostró que el compuesto del título inhibe el receptor del amargor hT2R08 y tuvo una IC<sub>50</sub> de 0,02 uM.

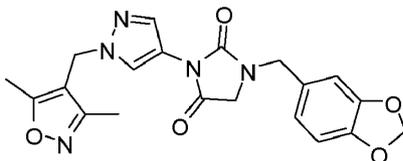
30 **Ejemplo 10-35: 1-(3,4-Dimetoxibencil)-3-(1-((3,5-dimetilisoazol-4-il)metil)-1H-pirazol-4-il)imidazolidin-2,4-diona:**



35 Se disolvieron 3-(1-((3,5-dimetilisoazol-4-il)metil)-1H-pirazol-4-il)imidazolidin-2,4-diona (ejemplo 10-1) (275 mg, 1 mmol), (3,4-dimetoxifenil)metanol (201 mg, 1,2 mmoles), N,N,N,N-tetrametilazodicarboxamida (344 mg, 2 mmoles) en 2 ml de THF anhidro. Se añadió tributilfosfina (404 mg, 2 mmoles), y la mezcla de reacción se colocó en un

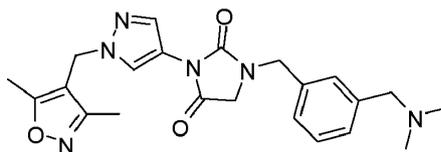
reactor de microondas durante 5 minutos a 90°C. La reacción se filtró, se concentró, y se purificó mediante HPLC (10-95% de acetonitrilo/agua, 25 minutos) para producir el compuesto del título. Rendimiento: 25 mg, 6%. RMN <sup>1</sup>H (DMSO, 400 MHz): δ 2,119 (s, 3H), 2,385 (s, 3H), 3,724 (J = 6,4 d, 6H), 3,946 (s, 2H), 4,435 (s, 2H), 5,178 (s, 2H), 6,885 (m, 3H), 7,776 (s, 1H), 8,166 (s, 1H). MS M+H calculado 426,1; encontrado 426,1. Se mostró que el compuesto del título inhibe el receptor del amargor hT2R08 y tuvo una IC<sub>50</sub> de 0,06 uM.

**Ejemplo 10-36: 1-(Benzo[d][1,3]dioxol-5-ilmetil)-3-((3,5-dimetilisoxazol-4-il)metil)-1H-pirazol-4-il)imidazolidin-2,4-diona:**



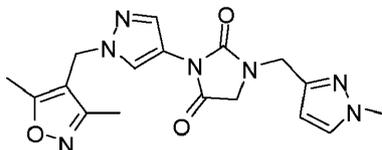
Preparada como en el ejemplo 10-35 a partir de 3-((3,5-dimetilisoxazol-4-il)metil)-1H-pirazol-4-il)imidazolidin-2,4-diona (ejemplo 10-1) y benzo[d][1,3]dioxol-5-ilmetanol. Rendimiento: 19%. RMN <sup>1</sup>H (DMSO, 400 MHz): δ 2,143 (s, 3H), 2,408 (s, 3H), 3,977 (s, 2H), 4,440 (s, 2H), 5,202 (s, 2H), 6,003 (s, 2H), 6,897 (m, 3H), 7,788 (s, 1H), 8,181 (s, 1H). MS M+H calculado 410,1; encontrado 410,1. Se mostró que el compuesto del título inhibe el receptor del amargor hT2R08 y tuvo una IC<sub>50</sub> de 0,07 uM.

**Ejemplo 10-37: 1-(3-((Dimetilamino)metil)encil)-3-((3,5-dimetilisoxazol-4-il)metil)-1H-pirazol-4-il)imidazolidin-2,4-diona:**



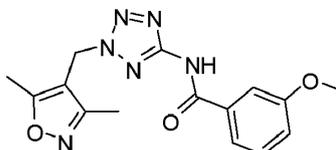
Se disolvieron 3-((3,5-dimetilisoxazol-4-il)metil)-1H-pirazol-4-il)imidazolidin-2,4-diona (ejemplo 10-1) (275 mg, 1 mmol) 1,3-bis(bromometil)benzeno (263 mg, 1 mmol), y carbonato de cesio (325 mg, 1 mmol) en 2 ml DMF, y se irradiaron en el reactor de microondas a 165°C durante 5 minutos. La reacción se enfrió hasta la temperatura ambiente, y la sal precipitada se eliminó mediante filtración. La disolución transparente que contiene producto bruto se concentró, y se volvió a disolver en acetato de etilo. La disolución orgánica se lavó con agua dos veces, seguido de salmuera. La capa orgánica se secó sobre sulfato de sodio y se evaporó para dar el producto bruto que se llevó directamente a la siguiente etapa sin purificación adicional o caracterización. Se disolvieron 1-(3-(bromometil)encil)-3-((3,5-dimetilisoxazol-4-il)metil)-1H-pirazol-4-il)imidazolidin-2,4-diona (ejemplo 42a) (152 mg, 0,3 mmoles), dimetilamina (disolución 2 M en THF) (1,5 ml, 3 mmoles), e hidruro de sodio (9 mg, 0,36 mmoles) en 1 ml de THF anhidro. La reacción se colocó en un reactor de microondas durante 5 minutos a 120°C. El producto bruto se volvió a disolver en 2 ml de etanol, y se purificó mediante HPLC (10-95% de acetonitrilo/agua, 25 minutos) para producir 1-(3-((dimetilamino)metil)encil)-3-((3,5-dimetilisoxazol-4-il)metil)-1H-pirazol-4-il)imidazolidin-2,4-diona (16 mg, 13%). MS M+H calculado 423,1; encontrado 423,1. Se mostró que el compuesto del título inhibe el receptor del amargor hT2R08 y tuvo una IC<sub>50</sub> de 1,2 uM.

**Ejemplo 10-38: 3-((3,5-Dimetilisoxazol-4-il)metil)-1H-pirazol-4-il)-1-((1-metil-1H-pirazol-3-il)metil)imidazolidin-2,4-diona:**



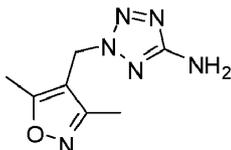
Preparada como en el ejemplo 10-5 a partir de 3-((3,5-dimetilisoxazol-4-il)metil)-1H-pirazol-4-il)imidazolidin-2,4-diona (ejemplo 10-1) y 3-(bromometil)-1-metil-1H-pirazol. Rendimiento 19%. MS M+H calculado 370,1; encontrado 370. Se mostró que el compuesto del título inhibe el receptor del amargor hT2R08 y tuvo una IC<sub>50</sub> de 0,4 uM.

**Ejemplo 10-39: N-(2-((3,5-Dimetilisoxazol-4-il)metil)-2H-tetrazol-5-il)-3-metoxibenzamida**



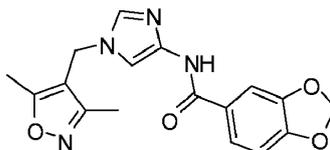
Se agitaron 2-((3,5-dimetilisoxazol-4-il)metil)-2H-tetrazol-5-amina (Ejemplo 10-39a) (102 mg, 0,528 mmoles), cloruro de 3-metoxibenzoílo (0,065 ml, 0,528 mmoles) y piridina (0,043 ml, 0,528 mmoles) en acetonitrilo (3 ml) a 100°C durante una hora. La reacción se diluyó con diclorometano (30 ml), y se lavó con salmuera (30 ml). Los orgánicos se secaron sobre sulfato de sodio, se concentraron y se purificaron mediante HPLC de fase inversa (sistema de disolvente: gradiente de 10% hasta 100% de acetonitrilo/agua, pasada de 25 minutos) produciendo N-(2-((3,5-dimetilisoxazol-4-il)metil)-2H-tetrazol-5-il)-3-metoxibenzamida como un sólido cristalino blanco (60 mg, 35 % de rendimiento) MS M+H calculado 329,1, encontrado 329. RMN <sup>1</sup>H (400MHz, DMSO-d<sub>6</sub>): δ 2,02 (s, 3H), 2,46 (s, 3H), 3,81 (s, 3H), 5,78 (s, 2H), 7,16 (m, 1H), 7,42 (t, J = 8 Hz, 2H), 7,54 (m, 1H), 11,3 (s, 1H). El compuesto tuvo una IC<sub>50</sub> sobre el receptor del amargor hT2R8 de 1,87 μM.

#### 10 Ejemplo 10-39a: 2-((3,5-Dimetilisoxazol-4-il)metil)-2H-tetrazol-5-amina



Se calentaron hasta 80°C con agitación durante 16 horas 2H-tetrazol-5-amina (1,29 g, 12,5 mmoles), 4-(clorometil)-3,5-dimetilisoxazol (1,56 ml, 12,5 mmoles) y carbonato de potasio (1,73 g, 15,5 mmoles) en DMF (20 ml). La reacción se enfrió hasta la temperatura ambiente, se diluyó con diclorometano (100 ml), y se lavó consecutivamente con salmuera y agua. Los orgánicos se secaron sobre sulfato de sodio y se concentraron con evaporación giratoria. El producto bruto se purificó mediante cromatografía en gel de sílice (gradiente de 0-10% de acetato de etilo/diclorometano) produciendo 2-((3,5-dimetilisoxazol-4-il)metil)-2H-tetrazol-5-amina como un sólido cristalino blanco (970 mg, 40 % de rendimiento) MS M+H calculado 195,1, encontrado 195.

#### Ejemplo 10-40: N-(1-((3,5-Dimetilisoxazol-4-il)metil)-1H-imidazol-4-il)benzo[d][1,3]dioxol-5-carboxamida



Se agitó durante 16 horas 1-((3,5-dimetilisoxazol-4-il)metil)-1H-imidazol-4-amina (ejemplo 10-40a) (110 mg, 0,57 mmoles), cloruro de benzo[d][1,3]dioxol-5-carbonilo (105 mg, 0,57 mmoles), y trietilamina (90 μl, 0,69 mmoles) en diclorometano. La reacción se diluyó con diclorometano (30 ml), y se lavó consecutivamente con salmuera y con agua. Los orgánicos se secaron sobre sulfato de sodio, y se concentraron mediante evaporación giratoria. El producto bruto se purificó mediante HPLC de fase inversa (sistema de disolvente: gradiente de 10% hasta 100% de acetonitrilo/agua, pasada de 25 minutos) para producir N-(1-((3,5-dimetilisoxazol-4-il)metil)-1H-imidazol-4-il)benzo[d][1,3]dioxol-5-carboxamida como un sólido cristalino blanco (32 mg, 15% de rendimiento). MS M+H calculado 341,3, encontrado 341,3. RMN <sup>1</sup>H (400MHz, DMSO-d<sub>6</sub>): δ 2,08 (s, 3H), 2,41 (s, 3H), 5,02 (s, 2H), 6,07 (s, 2H), 6,95 (d, J = 8,4 Hz, 1H), 7,27 (d, J = 1,6 Hz, 1H), 7,54 (m, 3H), 10,6 (s, 1H). El compuesto tuvo una IC<sub>50</sub> sobre el receptor del amargor hT2R8 de 12,1 μM.

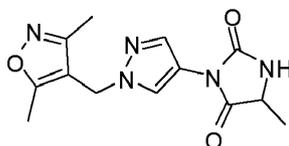
#### Ejemplo 10-40a: 1-((3,5-Dimetilisoxazol-4-il)metil)-1H-imidazol-4-amina

Se agitó en un agitador Parr a una presión de 2,5 bares de hidrógeno durante 2 horas 3,5-dimetil-4-((4-nitro-1H-imidazol-1-il)metil)isoxazol (ejemplo 10-40b) (1,0 g, 4,5 mmoles) y paladio al 10% sobre carbón (200 mg) en metanol (40 ml). La filtración a través de un tapón de celita, seguido de evaporación giratoria, produjo 1-((3,5-dimetilisoxazol-4-il)metil)-1H-imidazol-4-amina como un sólido amarillento-rojo (800 mg, 93% de rendimiento). MS M+H calculado 193, encontrado 193.

#### Ejemplo 10-40b: 3,5-Dimetil-4-((4-nitro-1H-imidazol-1-il)metil)isoxazol

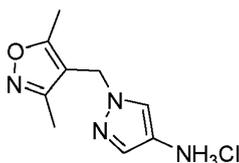
Se preparó 3,5-dimetil-4-((4-nitro-1H-imidazol-1-il)metil)isoxazol de una manera similar al ejemplo 10-41c mediante alquilación de 4-nitro-1H-imidazol produciendo 3,5-dimetil-4-((4-nitro-1H-imidazol-1-il)metil)isoxazol como un sólido cristalino blanco (5,0 g, 80% de rendimiento). MS M+H calculado 223, encontrado 223. RMN <sup>1</sup>H (400MHz, DMSO-d<sub>6</sub>): δ ppm: 2,09 (s, 3H), 2,43 (s, 3H), 5,15 (s, 2H), 7,90 (d, J = 1,6 Hz, 1H), 8,35 (d, J = 1,9 Hz, 1H).

#### Ejemplo 10-41: 3-(1-((3,5-Dimetilisoxazol-4-il)metil)-1H-pirazol-4-il)-5-metilimidazolidin-2,4-diona



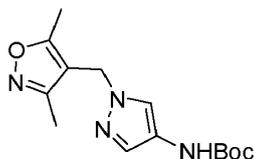
Se mezclaron hidrocloreto de 1-((3,5-dimetilisoxazol-4-il)metil)-1H-pirazol-4-amina (ejemplo 10-41a) (1,0 g, 5,20 mmoles), 2-isocianatopropionato de etilo (0,745 g, 5,20 mmoles) y trietilamina (1,5 ml, 10,4 mmoles) en EtOH (20 ml). La reacción se puso a reflujo durante 12 horas, y después se dejó enfriar hasta la temperatura ambiente. El disolvente se eliminó a vacío y los cristales formados se dejaron reposar. Los cristales se recogieron y se lavaron con hexanos para producir la 3-(1-((3,5-dimetilisoxazol-4-il)metil)-1H-pirazol-4-il)-5-metilimidazolidin-2,4-diona con 80% de rendimiento como un sólido blanco. RMN <sup>1</sup>H (DMSO-d<sub>6</sub>, 400 MHz): δ 1,53-1,51 (d, 3H), 2,19 (s, 3H), 2,42 (s, 3H), 4,21-4,19 (m, 1H), 5,06 (s, 2H), 6,00 (bs, 1H), 7,90 (s, 1H), 8,05 (s, 1H). Se mostró que el compuesto del título inhibe el receptor del amargor hT2R08 y tuvo una IC<sub>50</sub> de 1,3 μM.

#### Ejemplo 10-41a: Hidrocloreto de 1-((3,5-dimetilisoxazol-4-il)metil)-1H-pirazol-4-amina



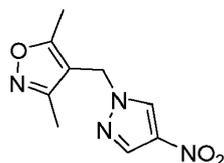
Se agitó 1-((3,5-dimetilisoxazol-4-il)metil)-1H-pirazol-4-ilcarbamato de terc-butilo (ejemplo 10-41b) (592 mg, 2 mmoles) en una disolución de HCl 4N en dioxano (20 ml) a temperatura ambiente durante 2 horas. El disolvente se eliminó, y el residuo se disolvió en una mezcla 1/1 de acetato de etilo/hexanos (30 ml) y se concentró dos veces. El sólido se trituró con hexanos y se recogió mediante filtración proporcionando hidrocloreto de 1-((3,5-dimetilisoxazol-4-il)metil)-1H-pirazol-4-amina (500 mg, 99%) como un sólido blanco. RMN <sup>1</sup>H (DMSO-d<sub>6</sub>, 400 MHz): δ 2,11 (s, 3H), 2,38 (s, 3H), 5,16 (s, 2H), 7,51 (s, 1H), 8,03 (s, 1H), 10,27 (bs, 3H).

#### Ejemplo 10-41b: 1-((3,5-Dimetilisoxazol-4-il)metil)-1H-pirazol-4-ilcarbamato de terc-butilo



Se disolvieron 3,5-dimetil-4-((4-nitro-1H-pirazol-1-il)metil)isoxazol (ejemplo 10-41c) (12 g, 53,8 mmoles) y anhídrido de BOC (12,8 g, 64 mmoles) en una mezcla 3/1/1 de MeOH/EtOH/THF (300 ml) en una botella de reacción Parr, seguido de la adición de Pd al 10%/C (1,5 g). La mezcla se agitó en el hidrogenador Parr en 2 atmósferas de hidrógeno durante 3 horas. La mezcla se filtró a través de un tapón de 3 pulgadas de celita y se concentró en el evaporador giratorio. El aceite rosa se purificó mediante cromatografía en gel de sílice (25% de acetato de etilo en hexanos) para producir 1-((3,5-dimetilisoxazol-4-il)metil)-1H-pirazol-4-ilcarbamato de terc-butilo (12,6 g, 80%) como un aceite rosa/rojo que solidificó al reposar hasta un aceite rosa claro. RMN <sup>1</sup>H (CDCl<sub>3</sub>, 400 MHz): δ 1,41 (s, 9H), 2,10 (s, 3H), 2,32 (s, 3H), 4,90 (s, 2H), 6,19 (bs, 1H), 7,19 (s, 1H), 7,50 (s, 1H).

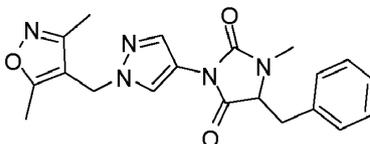
#### Ejemplo 10-41c: 3,5-Dimetil-4-((4-nitro-1H-pirazol-1-il)metil)isoxazol



Se añadió 1H-pirazol (10 g, 147 mmoles) en pequeñas porciones a H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> concentrado (100 ml), se enfrió hasta 0°C vía un baño de hielo/agua, manteniendo la temperatura interna de la reacción por debajo de 40°C. Se añadió HNO<sub>3</sub> concentrado (10 ml) cuidadosamente, gota a gota, a la mezcla de reacción, manteniendo la temperatura interna de la reacción por debajo de 55°C. La reacción se calentó entonces hasta 55°C, y se agitó durante 5 horas. La mezcla se enfrió hasta 0°C, y se hizo básica cuidadosamente (pH=8) con disolución acuosa de NaOH (110 g de NaOH en 150 ml de H<sub>2</sub>O) hasta que se formó un precipitado blanco, asegurándose cuidadosamente que la temperatura interna de la disolución permaneciera por debajo de 40°C. El sólido blanco se recogió mediante filtración y se lavó con acetato de etilo/hexanos (1/3), después se secó a vacío para producir 4-nitro-1H-pirazol (7 g, 42%, rendimiento aislado). RMN <sup>13</sup>C (DMSO-d<sub>6</sub>, 137,0, 126,4. A 4-nitro-1H-pirazol (9 g, 80 mmoles) en DMF (100 ml) 100 MHz) δ se añadió carbonato de cesio (26 g, 80 mmoles) seguido de la adición de 4-(clorometil)-3,5-dimetilisoxazol (12,3 g, 85 mmoles). La mezcla de reacción se agitó en DMF (100 ml) a 80°C durante 30 minutos, después se enfrió, se diluyó con H<sub>2</sub>O (150 ml), y se extrajo con acetato de etilo (3 x, 75 ml). Las capas orgánicas combinadas se secaron sobre sulfato de sodio, se filtraron y se concentraron. El residuo se recogió en acetato de etilo (200 ml) y se lavó con H<sub>2</sub>O (2 x, 100 ml). La capa orgánica se secó sobre sulfato de sodio, se filtró y se concentró. El producto sólido se trituró con acetato de etilo/hexanos (1/9) y se recogió mediante filtración. El producto se secó a alto vacío para producir

3,5-dimetil-4-((4-nitro-1H-pirazol-1-il)metil)isoxazol (12 g, 67%) como un sólido amarillo claro. RMN <sup>1</sup>H (CDCl<sub>3</sub>, 400 MHz); δ 2,23 (s, 3H), 2,46 (s, 3H), 5,08 (s, 2H), 8,02 (s, 1H), 8,08 (s, 1H).

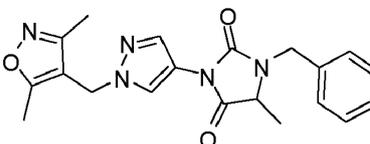
**Ejemplo 10-42: 5-Bencil-3-(1-((3,5-dimetilisoxazol-4-il)metil)-1H-pirazol-4-il)-1-metilimidazolidin-2,4-diona**



- 5 Preparada como en el ejemplo 10-5 a partir de 5-bencil-3-(1-((3,5-dimetilisoxazol-4-il)metil)-1H-pirazol-4-il)imidazolidin-2,4-diona (ejemplo 10-2) y yodometano. Rendimiento: 95%. RMN <sup>1</sup>H (CDCl<sub>3</sub>, 400 MHz): δ 2,04 (s, 3H), 2,15 (s, 3H), 2,96 (s, 3H), 3,24-3,23 (m, 2 H, J = 4,0 Hz), 4,23-4,21 (m, 1H), 5,00 (s, 2H), 7,24-7,23 (m, 5H, J = 4,0 Hz), 7,70 (s, 1H), 7,87 (s, 1H).

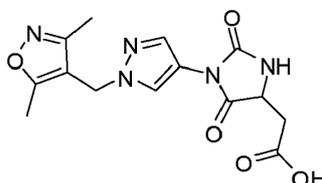
Se mostró que el compuesto del título inhibe el receptor del amargor hT2R08 y tuvo una IC<sub>50</sub> de 0,15 μM.

10 **Ejemplo 10-43: 1-Bencil-3-(1-((3,5-dimetilisoxazol-4-il)metil)-1H-pirazol-4-il)-5-metilimidazolidin-2,4-diona**



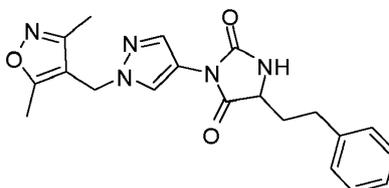
- 15 Preparada como en el ejemplo 10-5 a partir de 3-(1-((3,5-dimetilisoxazol-4-il)metil)-1H-pirazol-4-il)-5-metilimidazolidin-2,4-diona (ejemplo 10-41) y bromuro de bencilo. Rendimiento: 50%. RMN <sup>1</sup>H (CDCl<sub>3</sub>, 400 MHz): δ 1,44 (s, 3H), 2,19 (s, 3H), 3,88 (s, 3H), 4,18 (d, J = 8 Hz, 2H), 4,22 (t, 1H, J = 4 Hz), 5,06 (s, 2H), 7,39 - 7,29 (m, 5H), 7,94 (s, 1H), 8,10 (s, 1H). Se mostró que el compuesto del título inhibe el receptor del amargor hT2R08 y tuvo una IC<sub>50</sub> de 0,02 μM.

**Ejemplo 10-44: Ácido 2-(1-(1-((3,5-dimetilisoxazol-4-il)metil)-1H-pirazol-4-il)-2,5-dioxoimidazolidin-4-il)acético**



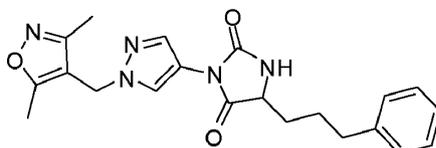
- 20 Preparado como en el ejemplo 10-1 a partir de 1-((3,5-dimetilisoxazol-4-il)metil)-1H-pirazol-4-carbonil azida (ejemplo 10-1a) y H-Asp-OMe. Rendimiento: 85%. MS M+H calculado 334,1; encontrado 334,1

**Ejemplo 10-45: 3-(1-((3,5-Dimetilisoxazol-4-il)metil)-1H-pirazol-4-il)-5-fenilimidazolidin-2,4-diona**



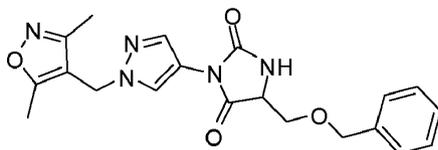
- 25 Preparada como en el Ejemplo 10-1 a partir de 1-((3,5-dimetilisoxazol-4-il)metil)-1H-pirazol-4-carbonil azida (ejemplo 10-1a) y 2-amino-4-fenilbutanoato de metilo. Rendimiento: 15%. RMN <sup>1</sup>H (CDCl<sub>3</sub>, 400 MHz): δ 2,09-2,02 (m, 2H), 2,19 (s, 3H), 2,41 (s, 3H), 2,83-2,78 (m, 2H), 4,13-4,09 (t, 1H, J = 8 Hz), 5,05 (s, 2H), 5,95 (bs, 1H), 7,30-7,19 (m, 5H), 7,95 (s, 1H), 8,03 (s, 1H). Se mostró que el compuesto del título inhibe el receptor del amargor hT2R08 y tuvo una IC<sub>50</sub> de 0,22 μM.

**Ejemplo 10-46: 3-(1-((3,5-Dimetilisoxazol-4-il)metil)-1H-pirazol-4-il)-5-(3-fenilpropil)imidazolidin-2,4-diona**



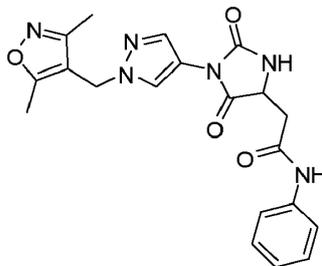
Preparada como en el Ejemplo 10-1 a partir de 1-((3,5-dimetilisoxazol-4-il)metil)-1H-pirazol-4-carbonil azida (ejemplo 10-1a) y 2-amino-5-fenilpentanoato de metilo. Rendimiento: 20%. RMN <sup>1</sup>H (CDCl<sub>3</sub>, 400 MHz): δ 1,72-1,68 (m, 1H), 1,85-1,78 (m, 2H), 1,99-1,91 (m, 1H), 2,19 (s, 3H), 2,41 (s, 3H), 2,69-2,63 (t, J = 8 Hz, 2H), 4,13 (bs, 1H), 5,05 (s, 2H), 5,95 (bs, 1H), 7,30-7,19 (m, 5H), 7,95 (s, 1H), 8,03 (s, 1H). Se mostró que el compuesto del título inhibe el receptor del amargor hT2R08 y tuvo una IC<sub>50</sub> de 0,17 μM.

**Ejemplo 10-47: 5-(Benciloximetil)-3-(1-((3,5-dimetilisoxazol-4-il)metil)-1H-pirazol-4-il)imidazolidin-2,4-diona**



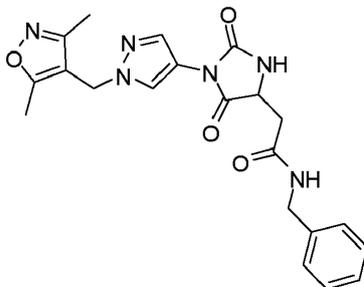
Preparada como en el Ejemplo 10-1 a partir de 1-((3,5-dimetilisoxazol-4-il)metil)-1H-pirazol-4-carbonil azida (ejemplo 10-1a) y 2-amino-3-(benciloxi)propanoato de metilo. Rendimiento: 32%. RMN <sup>1</sup>H (CDCl<sub>3</sub>, 400 MHz): δ 2,19 (s, 3H), 2,43 (s, 3H), 3,70-3,67 (m, 1H), 3,89-3,86 (m, 1H), 4,31-4,30 (m, 1H), 4,56-4,32 (d, J = 1,6 Hz, 2H), 5,05 (s, 2H), 5,62 (bs, 1H), 7,35-7,29 (m, 5H), 7,88 (s, 1H), 8,04 (s, 1H). Se mostró que el compuesto del título inhibe el receptor del amargor hT2R08 y tuvo una IC<sub>50</sub> de 0,76 μM.

**Ejemplo 10-48: 2-(1-(1-((3,5-Dimetilisoxazol-4-il)metil)-1H-pirazol-4-il)-2,5-dioxoimidazolidin-4-il)-N-fenilacetamida**

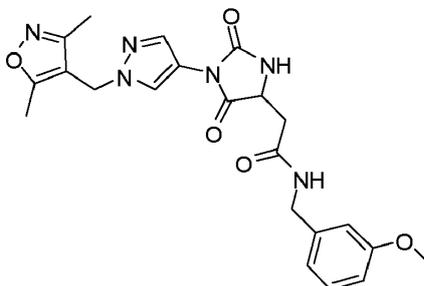


Se mezclaron ácido 3-(1-(1-((3,5-dimetilisoxazol-4-il)metil)-1H-pirazol-4-il)-2,5-dioxoimidazolidin-4-il)acético (ejemplo 10-44) (100 mg, 0,3 mmoles), anilina (33 mg, 0,36 mmoles), Pybop (187 mg, 0,36 mmoles) y trietilamina (0,05 ml, 0,36 mmoles) en DMF (1 ml). La reacción se agitó a 65°C durante 4 horas. La reacción se dejó enfriar hasta la temperatura ambiente, y después se diluyó con acetato de etilo (2 ml). La fase orgánica se lavó con disolución saturada de bicarbonato de sodio (2 x, 2 ml) y después con disolución saturada de NaCl (1 ml). La fase orgánica se extrajo, se secó sobre Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> anhidro, y se filtró. El producto bruto se volvió a suspender en MeOH (1 ml), y se purificó mediante HPLC de fase inversa (gradiente de 5-95% de acetonitrilo en H<sub>2</sub>O; 16 minutos). Las fracciones puras se combinaron, y el disolvente se eliminó en el evaporador giratorio para producir 2-(1-(1-((3,5-dimetilisoxazol-4-il)metil)-1H-pirazol-4-il)-2,5-dioxoimidazolidin-4-il)-N-fenilacetamida como un sólido blanco (50%). RMN <sup>1</sup>H (CDCl<sub>3</sub>, 400 MHz): δ 2,18 (s, 3H), 2,40 (s, 3H), 2,72 (m, 1H), 3,14-3,13 (d, 1H, J = 4 Hz), 4,54-4,51 (d, J = 8 Hz 1H), 5,04 (s, 2H), 6,53 (bs, 1H), 7,15-7,13 (m, 1H), 7,33-7,22 (m, 2H), 7,47-7,45 (d, J = 8 Hz, 2H), 7,78 (bs, 1H), 7,09 (s, 1H), 8,05 (s, 1H). Se mostró que el compuesto del título inhibe el receptor del amargor hT2R08 y tuvo una IC<sub>50</sub> de 0,75 μM.

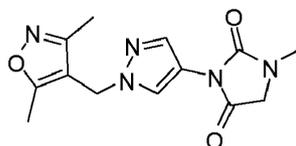
**Ejemplo 10-49: N-bencil-2-(1-(1-((3,5-dimetilisoxazol-4-il)metil)-1H-pirazol-4-il)-2,5-dioxoimidazolidin-4-il)acetamida**



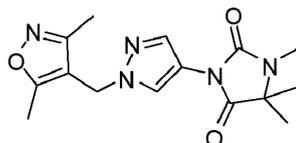
Preparada como en el Ejemplo 10-48 a partir de ácido 3-(1-(1-((3,5-dimetilisoxazol-4-il)metil)-1H-pirazol-4-il)-2,5-dioxoimidazolidin-4-il)acético (ejemplo 10-44) y bencilamina. Rendimiento: 30%. RMN <sup>1</sup>H (CDCl<sub>3</sub>, 400 MHz): δ 2,18 (s, 3H), 2,41 (s, 3H), 2,56-2,52 (m, 1H, J = 16 Hz), 2,56-2,52 (m, 1H), 3,00-2,96 (m, 1H), 4,45-4,44 (d, J = 5,6 Hz, 2H), 5,04 (s, 2H), 5,96 (bs, 1H), 6,36 (bs, 1H), 7,36-7,25 (m, 5H), 7,90 (s, 1H), 8,05 (s, 1H). Se mostró que el compuesto del título inhibe el receptor del amargor hT2R08 y tuvo una IC<sub>50</sub> de 1,3 μM.

**Ejemplo 10-50: 2-(1-(1-((3,5-Dimetilisoxazol-4-il)metil)-1H-pirazol-4-il)-2,5-dioximidazolidin-4-il)-N-(3-metoxibencil)acetamida**

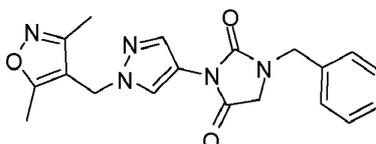
5 Preparada como en el Ejemplo 10-48 a partir de ácido 3-(1-(1-((3,5-dimetilisoxazol-4-il)metil)-1H-pirazol-4-il)-2,5-dioximidazolidin-4-il)acético (ejemplo 10-44) y (3-metoxifenil)metanamina. Rendimiento: 50%. LC/MS; esperado 453; encontrado 453,1. Se mostró que el compuesto del título inhibe el receptor del amargor hT2R08 y tuvo una  $IC_{50}$  de 1,7  $\mu$ M.

**Ejemplo 10-51: 3-(1-(1-((3,5-Dimetilisoxazol-4-il)metil)-1H-pirazol-4-il)-1-metilimidazolidin-2,4-diona**

10 Se mezclaron 3-(1-(1-((3,5-dimetilisoxazol-4-il)metil)-1H-pirazol-4-il)imidazolidin-2,4-diona (ejemplo 10-1) (50 mg, 0,182 mmoles) y carbonato de cesio (60 mg, 0,185 mmoles) en DMF (1 ml) durante 15 minutos en una atmósfera de nitrógeno a temperatura ambiente. Después se añadió yodometano (14 mg, 0,185 mmoles), y la reacción se continuó agitando durante otras 2 horas. Se añadió  $H_2O$  (2 ml), y el producto se extrajo con acetato de etilo (1 ml, 2 x). La fase orgánica se recogió y se lavó con disolución saturada de bicarbonato de sodio (2 ml, 2 x), se secó, y se filtró. El disolvente se eliminó bajo una corriente de nitrógeno, y después se secó adicionalmente a alto vacío para producir 3-(1-(1-((3,5-dimetilisoxazol-4-il)metil)-1H-pirazol-4-il)-1-metilimidazolidin-2,4-diona como un sólido blanco (42 mg, 80%). Rendimiento: 80%. RMN  $^1H$  ( $CDCl_3$ , 400 MHz):  $\delta$  2,18 (s, 3H), 2,41 (s, 3H), 3,06 (s, 3H), 3,95 (s, 2H), 5,05 (s, 2H), 7,89 (s, 1H), 8,05 (s, 1H). Se mostró que el compuesto del título inhibe el receptor del amargor hT2R08 y tuvo una  $IC_{50}$  de 0,58  $\mu$ M.

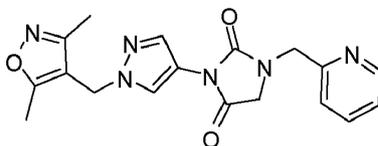
**Ejemplo 10-52: 3-(1-(1-((3,5-Dimetilisoxazol-4-il)metil)-1H-pirazol-4-il)-1,5,5-trimetilimidazolidin-2,4-diona**

25 Se mezclaron 3-(1-(1-((3,5-dimetilisoxazol-4-il)metil)-1H-pirazol-4-il)-5-metilimidazolidin-2,4-diona (ejemplo 10-41) (50 mg, 0,173 mmoles) y NaH al 60% (8 mg, 0,190 mmoles) en DMF (1 ml) durante 30 minutos. Se añadió MeI (0,04 ml, 0,190 mmoles), y la reacción se agitó otras 4 horas. La reacción se acidificó con HCl 1N, y se diluyó con acetato de etilo (2 ml). La fase orgánica se secó, se filtró, y el disolvente se eliminó bajo una corriente de nitrógeno. El producto bruto se volvió a suspender en MeOH (1 ml) y se purificó mediante HPLC de fase inversa (gradiente de 5 hasta 95% de acetonitrilo en  $H_2O$ : 16 minutos). Las fracciones puras se combinaron, y el disolvente se eliminó a vacío para producir 3-(1-(1-((3,5-dimetilisoxazol-4-il)metil)-1H-pirazol-4-il)-1,5,5-trimetilimidazolidin-2,4-diona como un sólido blanco (25 mg, 50%). RMN  $^1H$  ( $CDCl_3$ , ( $CDCl_3$ , 400 MHz):  $\delta$  1,45 (s, 6H), 2,19 (s, 3H), 2,42 (s, 3H), 2,94 (s, 3 H), 5,05 (s, 2 H), 7,92 (s, 1 H), 8,08 (s, 1H). Se mostró que el compuesto del título inhibe el receptor del amargor hT2R08 y tuvo una  $IC_{50}$  de 0,80  $\mu$ M.

**Ejemplo 10-53: 1-Bencil-3-(1-(1-((3,5-dimetilisoxazol-4-il)metil)-1H-pirazol-4-il)imidazolidin-2,4-diona**

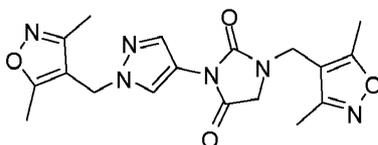
Preparada como en el ejemplo 10-5 a partir de 3-(1-((3,5-dimetilisoxazol-4-il)metil)-1H-pirazol-4-il)imidazolidin-2,4-diona (ejemplo 10-1) y bromuro de bencilo. Rendimiento: 40%. RMN <sup>1</sup>H (CDCl<sub>3</sub>, 400 MHz): δ 2,18 (s, 3H), 2,42 (s, 3H), 3,84 (s, 2H), 4,61 (s, 2 H), 5,06 (s, 2H), 7,40 - 7,27 (m, 5H), 7,92 (s, 1 H), 8,08 (s, 1H). Se mostró que el compuesto del título inhibe el receptor del amargor hT2R08 y tuvo una IC<sub>50</sub> de 0,09 μM.

5 **Ejemplo 10-54: 3-(1-((3,5-Dimetilisoxazol-4-il)metil)-1H-pirazol-4-il)-1-(piridin-2-ilmetil)imidazolidin-2,4-diona**



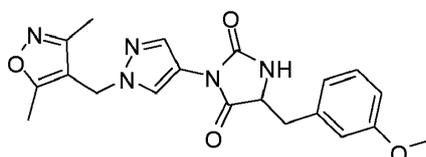
10 Preparada como en el Ejemplo 10-5 a partir de 3-(1-((3,5-dimetilisoxazol-4-il)metil)-1H-pirazol-4-il)imidazolidin-2,4-diona y 2-(bromometil)piridina. Rendimiento: 50%. RMN <sup>1</sup>H (CDCl<sub>3</sub>, 400 MHz): δ 2,19 (s, 3H), 2,41 (s, 3H), 4,12 (s, 2H), 4,71 (s, 2H), 5,05 (s, 2H), 7,72-7,23 (m, 4H), 7,92 (s, 1H) 8,08 (s, 1H). Se mostró que el compuesto del título inhibe el receptor del amargor hT2R08 y tuvo una IC<sub>50</sub> de 0,68 μM.

**Ejemplo 10-55: 1-((3,5-Dimetilisoxazol-4-il)metil)-3-(1-((3,5-dimetilisoxazol-4-il)metil)-1H-pirazol-4-il)imidazolidin-2,4-diona**



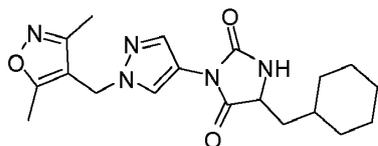
15 Preparada como en el Ejemplo 10-5 a partir de 3-(1-((3,5-dimetilisoxazol-4-il)metil)-1H-pirazol-4-il)imidazolidin-2,4-diona y 4-(clorometil)-3,5-dimetilisoxazol. Rendimiento: 50%. RMN <sup>1</sup>H (CDCl<sub>3</sub>, 400 MHz): 2,19 (s, 3H), 2,27 (s, 3H), 2,43-2,42 (d, J = 5,2 Hz, 6H), 3,82 (s, 2H), 4,40 (s, 2H), 5,05 (s, 2H), 7,92 (s, 1H), 8,05 (s, 1H). Se mostró que el compuesto del título inhibe el receptor del amargor hT2R08 y tuvo una IC<sub>50</sub> de 0,04 μM.

**Ejemplo 10-56: 3-(1-((3,5-Dimetilisoxazol-4-il)metil)-1H-pirazol-4-il)-5-(3-metoxibencil)imidazolidin-2,4-diona**



20 Se agitaron hidrocloreto de 1-((3,5-dimetilisoxazol-4-il)metil)-1H-pirazol-4-amina (400 mg, 2,08 mmoles), carbonato de dipiridin-2-ilo (450 mg, 2,08 mmoles) y trietilamina (0,290 ml, 2,08 mmoles) en diclorometano (7 ml) durante 12 horas a temperatura ambiente. La reacción se concentró a vacío para producir 4-((4-isocianato-1H-pirazol-1-il)metil)-3,5-dimetilisoxazol como un sólido blanquecino con rendimiento cuantitativo. Se añadió etanol (1 ml) junto con 2-amino-3-(3-metoxifenil)propanoato de metilo (68 mg, 0,327 mmoles) y trietilamina (0,064 ml, 0,461 mmoles). La reacción se agitó a reflujo durante 12 horas, y después se dejó enfriar hasta la temperatura ambiente. El disolvente se eliminó bajo una corriente de nitrógeno. El producto bruto se volvió a suspender en MeOH (1 ml) y se purificó mediante HPLC de fase inversa (gradiente de 5 hasta 95% de acetonitrilo en H<sub>2</sub>O: 16 minutos). Las fracciones puras se combinaron, y el disolvente se eliminó a vacío para producir 3-(1-((3,5-dimetilisoxazol-4-il)metil)-1H-pirazol-4-il)-5-(3-metoxibencil)imidazolidin-2,4-diona como un sólido blanco, rendimiento: 50%. RMN <sup>1</sup>H (CDCl<sub>3</sub>, 400 MHz): δ 2,19 (s, 3 H), 2,41 (s, 3H), 3,34-3,33 (d, J = 3,2 Hz, 1H), 3,31-3,29 (d, J = 8 Hz, 1H), 3,76 (s, 3H), 4,33-4,30 (m, 1H), 5,05 (s, 2H), 5,95 (bs, 1H), 7,25-7,21 (t, 1H), 6,82-6,78 (m, 3H), 7,85 (s, 1H), 7,99 (s, 1H). Se mostró que el compuesto del título inhibe el receptor del amargor hT2R08 y tuvo una IC<sub>50</sub> de 0,13 μM.

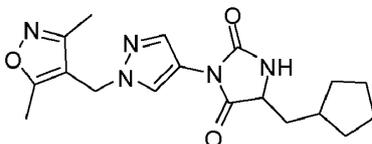
**Ejemplo 10-57: 5-(Ciclohexilmetil)-3-(1-((3,5-dimetilisoxazol-4-il)metil)-1H-pirazol-4-il)imidazolidin-2,4-diona**



35 Preparada como en el Ejemplo 10-56 a partir de hidrocloreto de 1-((3,5-dimetilisoxazol-4-il)metil)-1H-pirazol-4-amina (ejemplo 10-41a) y 2-amino-3-ciclohexilpropanoato de metilo. Rendimiento: 30%. RMN <sup>1</sup>H (CDCl<sub>3</sub>, 400 MHz): δ 1,06-0,95 (m, 2H), 1,29-1,15 (m, 3H), 1,60-1,50 (1H) 1,77-1,67 (7 H), 1,91-1,85 (m, 1H), 2,19 (s, 3H), 2,41 (s, 3H), 4,19-

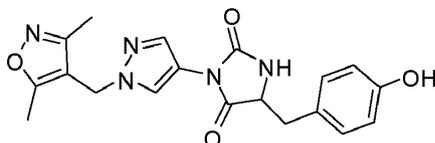
4,15 (m, 1H), 5,05 (s, 2H), 6,01 (bs, 1H), 7,91 (s, 1H), 8,05 (s, 1H). Se mostró que el compuesto del título inhibe el receptor del amargor hT2R08 y tuvo una IC<sub>50</sub> de 0,96 μM.

**Ejemplo 10-58: 5-(Ciclopentilmetil)-3-(1-((3,5-dimetilisoxazol-4-il)metil)-1H-pirazol-4-il)imidazolidin-2,4-diona**



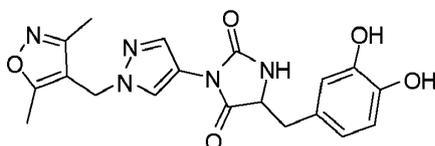
- 5 Preparada como en el Ejemplo 10-56 a partir de hidrocloreto de 1-((3,5-dimetilisoxazol-4-il)metil)-1H-pirazol-4-amina (ejemplo 10-41a) y 2-amino-3-ciclopentilpropanoato de metilo. Rendimiento: 50%. RMN <sup>1</sup>H (CDCl<sub>3</sub>, 400 MHz): δ 1,20-1,14 (m, 3H), 1,68-1,55 (m, 6H), 2,04-1,92 (m, 2H), 2,19 (s, 3H), 2,42 (s, 3H), 4,14-4,11 (m, 1H), 5,05 (s, 2H), 5,52 (bs, 1H), 7,90 (s, 1H), 8,06 (s, 1H). Se mostró que el compuesto del título inhibe el receptor del amargor hT2R08 y tuvo una IC<sub>50</sub> de 0,31 μM.

10 **Ejemplo 10-59: 3-(1-((3,5-Dimetilisoxazol-4-il)metil)-1H-pirazol-4-il)-5-(4-hidroxibencil)imidazolidin-2,4-diona**



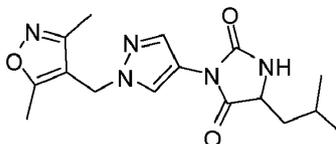
- 15 Preparada como en el Ejemplo 10-56 a partir de hidrocloreto de 1-((3,5-dimetilisoxazol-4-il)metil)-1H-pirazol-4-amina (ejemplo 10-41a) y 2-amino-3-(4-hidroxifenil)propanoato de metilo. Rendimiento: 50%. RMN <sup>1</sup>H (CDCl<sub>3</sub>, 400 MHz): δ 2,41 (s, 3H), 2,85 (s, 3H), 3,26-3,25 (d, 1H, J = 4 Hz), 3,23-3,22 (d, J = 4 Hz, 1H), 4,31-4,28 (m, 1H), 5,04 (s, 2H), 5,77-5,74 (bs, 1H), 7,07-7,04 (d, J = 12 Hz, 2H), 6,75-6,73 (d, J = 8 Hz, 2H), 7,06 (s, 1H), 7,97 (s, 1H), 9,43 (bs, 1H). Se mostró que el compuesto del título inhibe el receptor del amargor hT2R08 y tuvo una IC<sub>50</sub> de 0,33 μM.

**Ejemplo 10-60: 5-(3,4-Dihidroxibencil)-3-(1-((3,5-dimetilisoxazol-4-il)metil)-1H-pirazol-4-il)imidazolidin-2,4-diona**



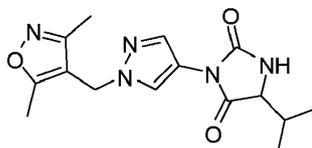
- 20 Preparada como en el Ejemplo 10-56 a partir de hidrocloreto de 1-((3,5-dimetilisoxazol-4-il)metil)-1H-pirazol-4-amina (ejemplo 10-41a) y 2-amino-3-(3,4-dihidroxifenil)propanoato de metilo. Rendimiento: 50%. MS M+H calculado 398,1; encontrado 398,1. Se mostró que el compuesto del título inhibe el receptor del amargor hT2R08 y tuvo una IC<sub>50</sub> de 0,51 μM.

**Ejemplo 10-61: 3-(1-((3,5-Dimetilisoxazol-4-il)metil)-1H-pirazol-4-il)-5-isobutilimidazolidin-2,4-diona**



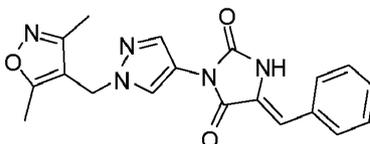
- 25 Preparada como en el Ejemplo 10-41 a partir de hidrocloreto de 1-((3,5-dimetilisoxazol-4-il)metil)-1H-pirazol-4-amina (ejemplo 10-41a) y 2-isocianato-4-metilpentanoato de etilo. Rendimiento: 50%. RMN <sup>1</sup>H (CDCl<sub>3</sub>, 400 MHz): δ 1,01-0,98 (m, 8H), 1,87-1,82 (m, 1H), 2,19 (s, 3H), 2,41 (s, 3H), 4,13-4,12 (t, 1H), 5,05 (s, 2H), 5,70 (bs, 1H), 7,90 (s, 1H), 8,05 (s, 1H). Se mostró que el compuesto del título inhibe el receptor del amargor hT2R08 y tuvo una IC<sub>50</sub> de 1,0 μM.

30 **Ejemplo 10-62: 3-(1-((3,5-Dimetilisoxazol-4-il)metil)-1H-pirazol-4-il)-5-isopropilimidazolidin-2,4-diona**



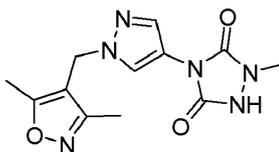
Preparada como en el Ejemplo 10-41 a partir de hidrocloreto de 1-((3,5-dimetilisoxazol-4-il)metil)-1H-pirazol-4-amina (ejemplo 10-41a) y 2-isocianato-3-metilbutanoato de etilo. Rendimiento: 30%. RMN <sup>1</sup>H (CDCl<sub>3</sub>, 400 MHz): δ 0,96-0,94 (d, 3H, J = 7,2 Hz), 1,09-1,07 (d, 3H, J = 8 Hz), 2,19 (s, 3H), 2,26-2,22 (m, 1H), 2,40 (s, 3H), 4,02 (s, 1H), 5,05 (s, 2H), 5,53 (bs, 1H), 7,90 (s, 1H), 8,05 (s, 1H). Se mostró que el compuesto del título inhibe el receptor del amargor hT2R08 y tuvo una IC<sub>50</sub> de 1,1 μM.

**Ejemplo 10-63: (Z)-5-benciliden-3-(1-((3,5-dimetilisoxazol-4-il)metil)-1H-pirazol-4-il)imidazolidin-2,4-diona**



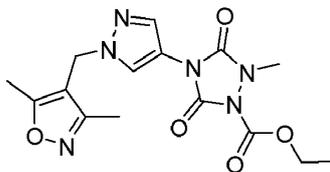
Se irradiaron en el reactor de microondas durante 7 horas a 185°C 3-(1-((3,5-dimetilisoxazol-4-il)metil)-1H-pirazol-4-il)imidazolidin-2,4-diona (ejemplo 10-1) (275 mg, 1 mmol), benzaldehído (140 mg, 1,3 mmoles), y acetato de sodio (205 mg, 2,5 mmoles), en ácido acético glacial (3 ml). Después de enfriar, la mezcla se diluyó con H<sub>2</sub>O (100 ml) y se extrajo con acetato de etilo (3 x, 50 ml). Los extractos orgánicos combinados se lavaron con disolución saturada acuosa de carbonato de sodio, se secaron sobre sulfato de sodio, se filtraron y se concentraron. El producto sólido se trituró con acetato de etilo/hexanos (1/1), y se secó a alto vacío para producir (Z)-5-benciliden-3-(1-((3,5-dimetilisoxazol-4-il)metil)-1H-pirazol-4-il)imidazolidin-2,4-diona (173 mg, 48%) como un sólido amarillo claro. RMN <sup>1</sup>H (DMSO-d<sub>6</sub>, 400 MHz): δ 2,14 (s, 3H), 2,40 (s, 3H), 6,59 (s, 1H), 5,20 (s, 2H), 7,33-7,40 (m, 3H), 7,66 (s, 2H), 7,81 (s, 1H), 8,21 (s, 1H), 11,01 (bs, 1H). Se mostró que el compuesto del título inhibe el receptor del amargor hT2R08 y tuvo una IC<sub>50</sub> de 0,34 μM.

**Ejemplo 10-64: 4-(1-((3,5-Dimetilisoxazol-4-il)metil)-1H-pirazol-4-il)-1-metil-1,2,4-triazolidin-3,5-diona**



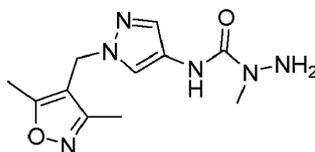
Se agitó 4-(1-((3,5-dimetilisoxazol-4-il)metil)-1H-pirazol-4-il)-2-metil-3,5-dioxo-1,2,4-triazolidin-1-carboxilato de etilo (3,2 g, 8,8 mmoles) en una mezcla (1/1) de MeOH/NaOH acuoso 1N (100 ml) a temperatura ambiente durante 30 minutos. La mezcla se acidificó con HCl 1N acuoso (150 ml), se extrajo con acetato de etilo (3 x, 100 ml), se secó sobre sulfato de sodio, se filtró, y se concentró para producir 4-(1-((3,5-dimetilisoxazol-4-il)metil)-1H-pirazol-4-il)-1-metil-1,2,4-triazolidin-3,5-diona (2,3 g, 89%) como un sólido amarillo. RMN <sup>1</sup>H (DMSO-d<sub>6</sub>, 400 MHz): δ 2,18 (s, 3H), 2,44 (s, 3H), 3,05 (s, 3H), 5,17 (s, 2H), 7,94 (s, 1H), 8,13(s, 1H).

**Ejemplo 10-64a: 4-(1-((3,5-Dimetilisoxazol-4-il)metil)-1H-pirazol-4-il)-2-metil-3,5-dioxo-1,2,4-triazolidin-1-carboxilato de etilo**



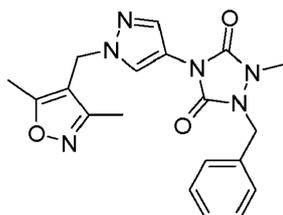
Se añadió cloroformiato de etilo (1,3 g, 12 mmoles) a una mezcla de N-(1-((3,5-dimetilisoxazol-4-il)metil)-1H-pirazol-4-il)-1-metilhidrazincarboxamida (ejemplo 10-64b) (2,5 g, 9 mmoles) y trietilamina (1,2 g, 12 mmoles) en acetonitrilo (100 ml). La mezcla se puso a reflujo durante 1 hora, se enfrió, después se diluyó con HCl acuoso 1N (150 ml), y se extrajo con acetato de etilo (3 x, 75 ml). Los extractos orgánicos combinados se secaron sobre sulfato de sodio, se filtraron y se concentraron en el evaporador giratorio. El sólido se trituró con acetato de etilo/hexanos (1/3) y se secó a alto vacío para producir 4-(1-((3,5-dimetilisoxazol-4-il)metil)-1H-pirazol-4-il)-2-metil-3,5-dioxo-1,2,4-triazolidin-1-carboxilato de etilo (3,2 g, 94%) como un sólido blanco. RMN <sup>1</sup>H (DMSO-d<sub>6</sub>, 400 MHz): δ 1,28 (t, J = 7,2 Hz, 3H), 2,13(s, 3H), 2,40 (s, 3H), 3,24 (s, 3H), 4,30 (t, J = 7,2 Hz, 2H), 5,21 (s, 2H), 7,73 (m, 1H), 8,16 (s, 1H).

**Ejemplo 10-64b: N-(1-((3,5-dimetilisoxazol-4-il)metil)-1H-pirazol-4-il)-1-metilhidrazincarboxamida**



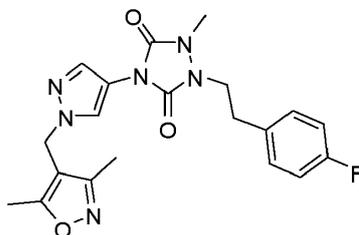
- 5 Se agitó 1-((3,5-dimetilisoxazol-4-il)metil)-1H-pirazol-4-carbonil azida (ejemplo 10-1a) (1,25 g, 5,3 mmoles) en tolueno (30 ml) a temperatura de reflujo durante 40 minutos. La mezcla se enfrió hasta la temperatura ambiente, y se añadió metilhidrazina (0,3 ml, 260 mg, 5,6 mmoles), y la mezcla se puso a reflujo durante 30 minutos. Después de enfriar la reacción hasta la temperatura ambiente el disolvente se eliminó en el evaporador giratorio, y el producto sólido se trituró con acetato de etilo/hexanos (2/5) y se secó a alto vacío para producir N-(1-((3,5-dimetilisoxazol-4-il)metil)-1H-pirazol-4-il)-1-metilhidrazincarboxamida (1,1 g, 79%) como un sólido blanco. RMN <sup>1</sup>H (DMSO-d<sub>6</sub>, 400 MHz): δ 2,09 (s, 3H), 2,36 (s, 3H), 2,98 (s, 3H), 4,61 (s, 2H), 5,02 (s, 2H), 7,42 (s, 1H), 7,72 (m, 1H), 8,78 (s, 1H).

**Ejemplo 10-65: 1-Bencil-4-(1-((3,5-dimetilisoxazol-4-il)metil)-1H-pirazol-4-il)-2-metil-1,2,4-triazolidin-3,5-diona**



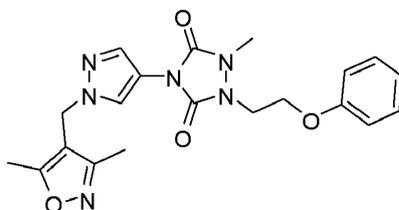
- 10 Se disolvió 4-(1-((3,5-dimetilisoxazol-4-il)metil)-1H-pirazol-4-il)-1-metil-1,2,4-triazolidin-3,5-diona (ejemplo 10-64) (785 mg, 2,7 mmoles) en acetonitrilo (50 ml). Se añadieron trietilamina (1 g, 10 mmoles) y bromuro de bencilo (510 mg, 3 mmoles), y la reacción se agitó a temperatura ambiente durante 12 horas. La mezcla se concentró entonces en el evaporador giratorio, se disolvió en metanol (5 ml), y se purificó mediante HPLC de fase inversa (gradiente de 5-95% de acetonitrilo en H<sub>2</sub>O: 25 minutos). Las fracciones puras se reunieron y se concentraron, y el producto se recristalizó en etanol para producir 1-bencil-4-(1-((3,5-dimetilisoxazol-4-il)metil)-1H-pirazol-4-il)-2-metil-1,2,4-triazolidin-3,5-diona (210 mg" 20%) como un sólido blanco. RMN <sup>1</sup>H (DMSO-d<sub>6</sub>, 400 MHz): δ 2,13 (s, 3H), 2,39 (s, 3H), 3,09 (s, 3H), 4,81 (s, 2H), 5,18 (s, 2H), 7,30-7,35 (m, 5H), 7,76 (s, 1H), 8,18 (s, 1H). MS M+H calculado 381,1; encontrado 381,1. Punto de fusión: 124-126°C. Se mostró que el compuesto del título inhibe el receptor del amargor hT2R08 y tuvo una IC<sub>50</sub> de 0,02 μM.

20 **Ejemplo 10-66: 1-Bencil-4-(1-((3,5-dimetilisoxazol-4-il)metil)-1H-pirazol-4-il)-2-metil-1,2,4-triazolidin-3,5-diona**



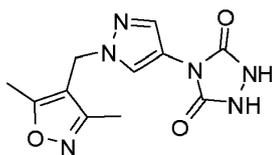
- 25 Preparada como en el Ejemplo 10-65 a partir de 4-(1-((3,5-dimetilisoxazol-4-il)metil)-1H-pirazol-4-il)-1-metil-1,2,4-triazolidin-3,5-diona (ejemplo 10-64) y 1-(2-bromoetil)-4-fluorobenceno. Rendimiento: 14%. RMN <sup>1</sup>H (CDCl<sub>3</sub>, 400 MHz): δ 2,18 (s, 3H), 2,40 (s, 3H), 2,87 (t, J = 6,8 Hz, 2H), 3,14 (s, 3H), 3,83 (t, J = 7,2 Hz, 2H), 5,03 (s, 2H), 6,95 (t, J = 8,4 Hz, 2H), 7,14 (t, J = 8 Hz, 2H), 7,77 (s, 1H), 7,95 (s, 1H). Se mostró que el compuesto del título inhibe el receptor del amargor hT2R08 y tuvo una IC<sub>50</sub> de 0,01 μM.

**Ejemplo 10-67: 4-(1-((3,5-Dimetilisoxazol-4-il)metil)-1H-pirazol-4-il)-1-metil-2-(2-fenoxietil)-1,2,4-triazolidin-3,5-diona**



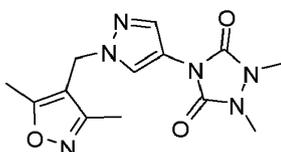
- 30 Preparada como en el Ejemplo 10-65 a partir de 4-(1-((3,5-dimetilisoxazol-4-il)metil)-1H-pirazol-4-il)-1-metil-1,2,4-triazolidin-3,5-diona (ejemplo 10-64) y (2-bromoetoxi)benceno. Rendimiento: 20%. RMN <sup>1</sup>H (DMSO-d<sub>6</sub>, 400 MHz): δ 2,13 (s, 3H), 2,40 (s, 3H), 3,15 (s, 3H), 3,99 (t, J = 4,4 Hz, 2H), 4,13 (t, J = 4,8 Hz, 2H), 5,20 (s, 2H), 6,80 (d, J = 8 Hz, 2H), 6,90 (t, J = 7,1 Hz, 1H), 7,22 (t, J = 8 Hz, 2H), 7,75 (s, 1H), 8,17 (s, 1H). Se mostró que el compuesto del título inhibe el receptor del amargor hT2R08 y tuvo una IC<sub>50</sub> de 0,031 μM.

35 **Ejemplo 10-68: 4-(1-((3,5-Dimetilisoxazol-4-il)metil)-1H-pirazol-4-il)-1,2,4-triazolidin-3,5-diona**



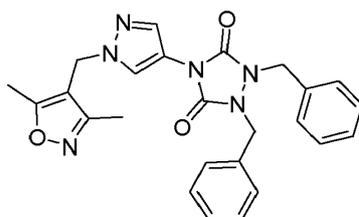
Se puso a reflujo 1-((3,5-dimetilisoxazol-4-il)metil)-1H-pirazol-4-carbonil azida (ejemplo 10-1a) (1 g, 4,1 mmoles) en tolueno (100 ml) durante una hora. La reacción se enfrió hasta la temperatura ambiente, y se añadió hidrazincarboxilato de etilo (0,45 g, 43 mmoles). La reacción se calentó hasta reflujo y se agitó durante 1 hora, después se enfrió y se concentró en el evaporador giratorio. El residuo se recogió en etanol (100 ml), y se añadió carbonato de potasio (100 mg). La mezcla se puso a reflujo durante 12 horas, después se filtró, se enfrió hasta la temperatura ambiente, y se neutralizó con ácido acético (aprox. 7 gotas). El disolvente se eliminó en el evaporador giratorio, y el sólido resultante se trituró con acetato de etilo/hexanos (1/9) para producir 4-(1-((3,5-dimetilisoxazol-4-il)metil)-1H-pirazol-4-il)-1,2,4-triazolidin-3,5-diona (0,98 g, 85%) como un sólido blancuzco. RMN <sup>1</sup>H (CDCl<sub>3</sub>, 400 MHz): δ 2,18 (s, 3H), 2,41 (s, 3H), 4,98 (s, 2H) 7,16 (s, 1H), 7,38 (s, 1H).

**Ejemplo 10-69: 4-(1-((3,5-Dimetilisoxazol-4-il)metil)-1H-pirazol-4-il)-1,2-dimetil-1,2,4-triazolidin-3,5-diona**



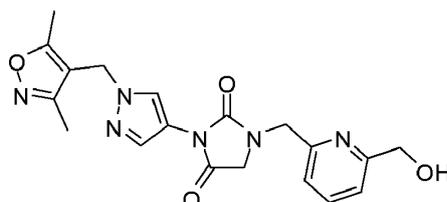
Se agitaron 4-(1-((3,5-dimetilisoxazol-4-il)metil)-1H-pirazol-4-il)-1,2,4-triazolidin-3,5-diona (ejemplo 10-68) (100 mg, 0,36 mmoles), yoduro de metilo (141 mg, 1 mmol), y carbonato de cesio (325 mg, 1 mmol) en una mezcla 2/1 de acetonitrilo/DMF (5 ml) a temperatura ambiente durante 2 horas. La mezcla se diluyó con HCl 1N acuoso (100 ml), y se extrajo con acetato de etilo (3 x, 50 ml). Los extractos orgánicos combinados se secaron sobre sulfato de sodio, se concentraron, y el residuo bruto se recogió en MeOH y se purificó mediante HPLC de fase inversa (gradiente de 5 hasta 95% de acetonitrilo en H<sub>2</sub>O: 25 minutos). Las fracciones puras se reunieron y se concentraron para producir 4-(1-((3,5-dimetilisoxazol-4-il)metil)-1H-pirazol-4-il)-1,2-dimetil-1,2,4-triazolidin-3,5-diona (89 mg, 80%) como un semisólido transparente. RMN <sup>1</sup>H (CDCl<sub>3</sub>, 400 MHz): δ 2,18 (s, 3H), 2,41 (s, 3H), 3,22 (s, 6H), 5,04 (s, 2H), 7,88 (s, 1H), 8,03 (s, 1H). Se mostró que el compuesto del título inhibe el receptor del amargor hT2R08 y tuvo una IC<sub>50</sub> de 0,6 μM.

**Ejemplo 10-70: 1,2-Dibencil-4-(1-((3,5-dimetilisoxazol-4-il)metil)-1H-pirazol-4-il)-1,2,4-triazolidin-3,5-diona**



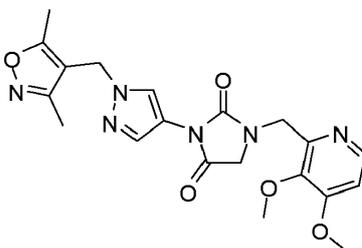
Preparada como en el Ejemplo 10-65 a partir de 4-(1-((3,5-dimetilisoxazol-4-il)metil)-1H-pirazol-4-il)-1,2-dimetil-1,2,4-triazolidin-3,5-diona (ejemplo 10-69) y bromuro de bencilo. Rendimiento: 69%. RMN <sup>1</sup>H (CDCl<sub>3</sub>, 400 MHz): δ 2,14 (s, 3H), 2,36 (s, 3H), 4,65 (s, 4H), 4,99 (s, 2H), 7,06-7,08 (m, 4H), 7,19-7,25 (m, 6H), 7,86 (s, 1H), 8,02 (s, 1H). Se mostró que el compuesto del título inhibe el receptor del amargor hT2R08 y tuvo una IC<sub>50</sub> de 0,8 μM.

**Ejemplo 10-71: 3-(1-((3,5-Dimetilisoxazol-4-il)metil)-1H-pirazol-4-il)-1-((6-(hidroximetil)piridin-2-il)metil)imidazolidin-2,4-diona**



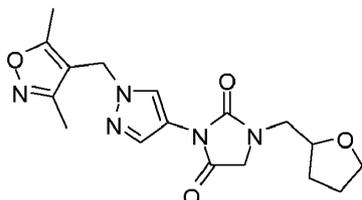
Preparada como en el ejemplo 10-5 a partir de 3-(1-((3,5-dimetilisoxazol-4-il)metil)-1H-pirazol-4-il)imidazolidin-2,4-diona y 6-bromometil-2-piridinmetanol. Rendimiento: 35%. MS M+H calculado 397,2; encontrado 397,2. Se mostró que el compuesto del título inhibe el receptor del amargor hT2R08 y tuvo una IC<sub>50</sub> de 0,72 μM.

**Ejemplo 10-72:** 1-((3,4-Dimetoxipiridin-2-il)metil)-3-(1-((3,5-dimetilisoxazol-4-il)metil)-1H-pirazol-4-il)imidazolidin-2,4-diona



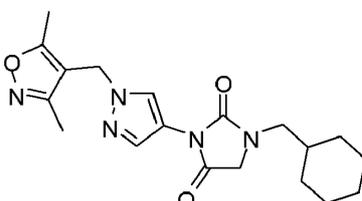
5 Preparada como en el ejemplo 10-5 a partir de 3-(1-((3,5-dimetilisoxazol-4-il)metil)-1H-pirazol-4-il)imidazolidin-2,4-diona e hidrocloreto de 3,4-dimetoxi-2-clorometilpiridina. Rendimiento: 26%. MS M+H calculado 360,2; encontrado 360,2. Se mostró que el compuesto del título inhibe el receptor del amargor hT2R08 y tuvo una IC<sub>50</sub> de 1,0 μM.

**Ejemplo 10-73:** 3-(1-((3,5-Dimetilisoxazol-4-il)metil)-1H-pirazol-4-il)-1-((6-(tetrahydrofuran-2-il)metil)imidazolidin-2,4-diona



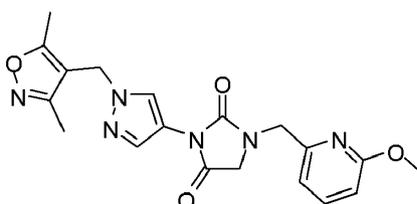
10 Preparada como en el ejemplo 10-52 a partir de 3-(1-((3,5-dimetilisoxazol-4-il)metil)-1H-pirazol-4-il)imidazolidin-2,4-diona y bromuro de tetrahydrofurfurilo. Rendimiento: 28%. MS M+H calculado 427,2; encontrado 427,2. Se mostró que el compuesto del título inhibe el receptor del amargor hT2R08 y tuvo una IC<sub>50</sub> de 1,4 μM.

**Ejemplo 10-74:** 1-(Ciclohexilmetil)-3-(1-((3,5-dimetilisoxazol-4-il)metil)-1H-pirazol-4-il)imidazolidin-2,4-diona



15 Preparada como en el ejemplo 10-52 a partir de 3-(1-((3,5-dimetilisoxazol-4-il)metil)-1H-pirazol-4-il)imidazolidin-2,4-diona (ejemplo 10-1) y bromometilciclohexano. Rendimiento: 20%. RMN <sup>1</sup>H (DMSO-d<sub>6</sub>, 400 MHz): δ 0,88 (q, J = 10,4 Hz, 2H), 1,09-1,19 (m, 3H), 1,58-1,65 (m, 6H), 2,12 (s, 3H), 2,38 (s, 3H), 3,13 (d, J = 7,2 Hz, 2H), 4,06 (s, 2H), 5,17 (s, 2H), 7,75 (s, 1H), 8,14 (s, 1H). MS M+H calculado 372,2; encontrado 372,1. Se mostró que el compuesto del título inhibe el receptor del amargor hT2R08 y tuvo una IC<sub>50</sub> de 0,28 μM.

20 **Ejemplo 10-75:** 3-(1-((3,5-Dimetilisoxazol-4-il)metil)-1H-pirazol-4-il)-1-((6-metoxipiridin-2-il)metil)imidazolidin-2,4-diona



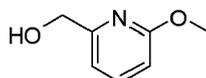
25 Se disolvieron 3-(1-((3,5-dimetilisoxazol-4-il)metil)-1H-pirazol-4-il)imidazolidin-2,4-diona (100 mg, 0,4 mmoles), (6-metoxi-piridin-2-il)-metanol (ejemplo 10-75a) (101 mg, 0,7 mmoles), tributilfosfina (147 mg, 0,7 mmoles), y 1,1'-azobis(N,N-dimetilformamida) (125 mg, 0,7 mmoles) en THF (5 ml), y se agitó a temperatura ambiente durante 15 horas. La reacción se diluyó con salmuera (100 ml), y se extrajo con acetato de etilo (2 x, 100 ml). Los extractos orgánicos combinados se secaron sobre sulfato de magnesio, se filtraron y se concentraron en el evaporador giratorio. El residuo se recogió en metanol (5 ml) y se purificó mediante HPLC de fase inversa (gradiente de 5 hasta 95% de acetonitrilo en H<sub>2</sub>O: 25 minutos). Las fracciones puras se combinaron, se concentraron, y después se volvieron a disolver en acetato de etilo/hexano (1:9). La disolución se enfrió a 5°C durante 15 h, cuando se formó un

30

sólido blanco. El precipitado se recogió para producir 3-(1-((3,5-dimetilisoxazol-4-il)metil)-1H-pirazol-4-il)-1-((6-metoxipiridin-2-il)metil)imidazolidin-2,4-diona (5 mg, 4%) como un sólido blanco. RMN <sup>1</sup>H (DMSO-*d*<sub>6</sub>, 400 MHz): δ 2,11 (s, 3H), 2,37 (s, 3H), 3,74 (s, 3H), 4,17 (s, 2H), 4,54 (s, 2H), 5,17 (s, 2H), 6,69 (d, *J* = 7,6 Hz, 1H), 6,96 (d, *J* = 6,8 Hz, 1H), 7,67 (d, *J* = 6,8 Hz, 1H), 7,76 (s, 1H), 8,17 (s, 1H). MS M+H calculado 397,2; encontrado 397,2. Se

5

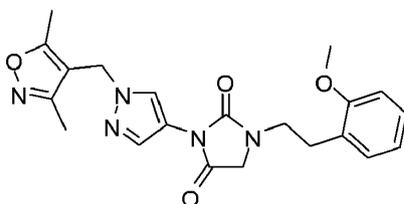
**Ejemplo 10-75a: (6-metoxipiridin-2-il)metanol**



Se enfrió 6-metoxipiridin-2-carboxilato de metilo (2 g, 11,96 mmoles) en metanol anhidro (20 ml) hasta 0°C en nitrógeno, y se añadió lentamente borohidruro de sodio (1,36 g, 35,89 mmoles) a la disolución. La reacción se dejó agitar a 0°C durante 30 minutos, y después se dejó calentar hasta la temperatura ambiente durante 1 hora. La reacción se paralizó con agua, y se concentró en el evaporador giratorio. La reacción se diluyó con salmuera (100 ml), y se extrajo con disolución de diclorometano/2-propanol (2:1) (3 x, 150 ml). Los extractos orgánicos combinados se secaron sobre sulfato de magnesio, se filtraron, y se concentraron en el evaporador giratorio para producir (6-metoxipiridin-2-il)metanol (500 mg, 30%) como un aceite. MS M+H calculado 140,1; encontrado 140,1.

10

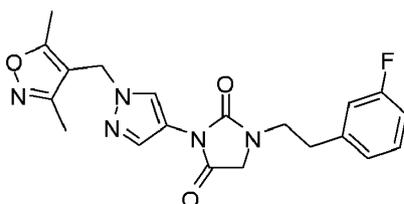
**Ejemplo 10-76: 3-(1-((3,5-Dimetilisoxazol-4-il)metil)-1H-pirazol-4-il)-1-(2-metoxifenetil)imidazolidin-2,4-diona**



Preparada como en el ejemplo 10-52 a partir de 3-(1-((3,5-dimetilisoxazol-4-il)metil)-1H-pirazol-4-il)imidazolidin-2,4-diona (ejemplo 6) y bromuro de 2-metoxifenetilo. Rendimiento: 52%. RMN <sup>1</sup>H (DMSO-*d*<sub>6</sub>, 400 MHz): δ 2,11 (s, 3H), 2,38 (s, 3H), 2,80 (t, *J* = 7,2 Hz, 2H), 3,51 (t, *J* = 7,2 Hz, 2H), 3,75 (s, 3H), 4,03 (s, 2H), 5,17 (s, 2H), 6,85 (t, *J* = 7,2 Hz, 1H), 6,95 (d, *J* = 8,4 Hz, 1H), 7,16-7,21 (m, 2H), 7,73 (s, 1H), 8,13 (s, 1H). MS M+H calculado 410,2; encontrado 410,1. Punto de fusión: 97-98°C. Se mostró que el compuesto del título inhibe el receptor del amargor hT2R08 y tuvo una IC<sub>50</sub> de 0,14 μM.

20

**Ejemplo 10-77: 3-(1-((3,5-Dimetilisoxazol-4-il)metil)-1H-pirazol-4-il)-1-(3-fluorofenetil)imidazolidin-2,4-diona**

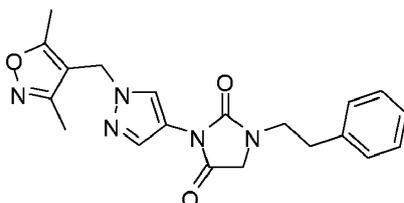


Preparada como en el ejemplo 10-52 a partir de 3-(1-((3,5-dimetilisoxazol-4-il)metil)-1H-pirazol-4-il)imidazolidin-2,4-diona (ejemplo 10-1) y bromuro de 3-fluorofenetilo. Rendimiento: 22%. RMN <sup>1</sup>H (DMSO-*d*<sub>6</sub>, 400 MHz): δ 2,11 (s, 3H), 2,38 (s, 3H), 2,80 (t, *J* = 7,2 Hz, 2H), 3,57 (t, *J* = 7,2 Hz, 2H), 4,06 (s, 2H), 5,17 (s, 2H), 6,85 (dt, *J* = 8,4, 2,0 Hz, 1H), 7,11 (t, *J* = 8,4 Hz, 2H), 7,32 (q, *J* = 7,8 Hz, 1H), 7,73 (s, 1H), 8,12 (s, 1H). MS M+H calculado 398,2; encontrado 398,1. Punto de fusión: 110-111°C. Se mostró que el compuesto del título inhibe el receptor del amargor hT2R08 y tuvo una IC<sub>50</sub> de 0,06 μM.

25

30

**Ejemplo 10-78: 3-(1-((3,5-Dimetilisoxazol-4-il)metil)-1H-pirazol-4-il)-1-fenetilimidazolidin-2,4-diona**

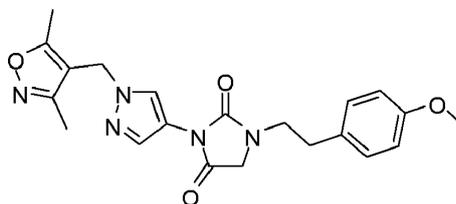


Preparada como en el ejemplo 10-52 a partir de 3-(1-((3,5-dimetilisoxazol-4-il)metil)-1H-pirazol-4-il)imidazolidin-2,4-diona (ejemplo 10-1) y bromuro de fenetilo. Rendimiento: 37%. RMN <sup>1</sup>H (DMSO-*d*<sub>6</sub>, 400 MHz): δ 2,11(s, 3H), 2,38 (s, 3H), 2,83 (t, *J* = 6,4 Hz, 2H), 3,55 (t, *J* = 7,4 Hz, 2H), 4,03 (s, 2H), 5,17 (s, 2H), 7,18-7,30 (m, 5H), 7,73 (s, 1H), 8,13

35

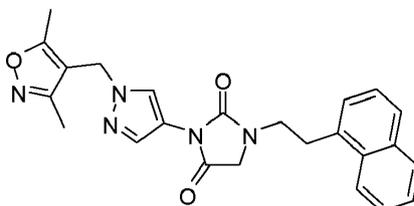
(s, 1H). MS M+H calculado 380,2; encontrado 380,1. Punto de fusión: 95-96°C. Se mostró que el compuesto del título inhibe el receptor del amargor hT2R08 y tuvo una IC<sub>50</sub> de 0,14 µM.

**Ejemplo 10-79: 3-(1-((3,5-Dimetilisoxazol-4-il)metil)-1H-pirazol-4-il)-1-(4-metoxifenetil)imidazolidin-2,4-diona**



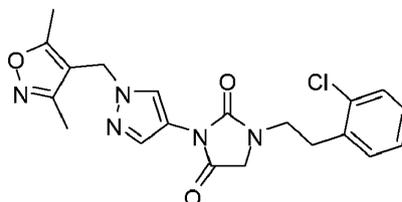
- 5 Preparada como en el ejemplo 10-52 a partir de 3-(1-((3,5-dimetilisoxazol-4-il)metil)-1H-pirazol-4-il)imidazolidin-2,4-diona (ejemplo 10-1) y bromuro de 4-metoxifenetilo. Rendimiento: 32%. RMN <sup>1</sup>H (DMSO-*d*<sub>6</sub>, 400 MHz): δ 2,11 (s, 3H), 2,38 (s, 3H), 2,78 (t, *J* = 7,4 Hz, 2H), 3,50 (t, *J* = 7,4 Hz, 2H), 3,69 (s, 3H), 4,02 (s, 2H), 5,16 (s, 2H), 6,84 (d, *J* = 8,4 Hz, 2H), 7,15 (d, *J* = 8,4 Hz, 2H), 7,73 (s, 1H), 8,12 (s, 1H). MS M+H calculado 410,18; encontrado 410,2. Se mostró que el compuesto del título inhibe el receptor del amargor hT2R08 y tuvo una IC<sub>50</sub> de 0,04 µM.

10 **Ejemplo 10-80: 3-(1-((3,5-Dimetilisoxazol-4-il)metil)-1H-pirazol-4-il)-1-(2-naftalen-1-il)etil)imidazolidin-2,4-diona**



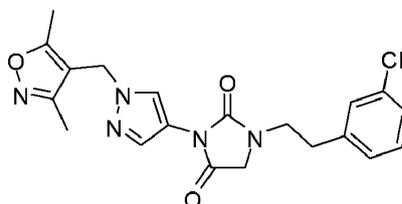
Preparada como en el ejemplo 10-52 a partir de 3-(1-((3,5-dimetilisoxazol-4-il)metil)-1H-pirazol-4-il)imidazolidin-2,4-diona (ejemplo 10-1) y 1-(2-bromoetil)naftaleno. Rendimiento: 20%. MS M+H calculado 430,18; encontrado 430,2. Se mostró que el compuesto del título inhibe el receptor del amargor hT2R08 y tuvo una IC<sub>50</sub> de 1,27 µM.

15 **Ejemplo 10-81: 1-(2-Clorofenetil)-3-(1-((3,5-dimetilisoxazol-4-il)metil)-1H-pirazol-4-il)imidazolidin-2,4-diona**



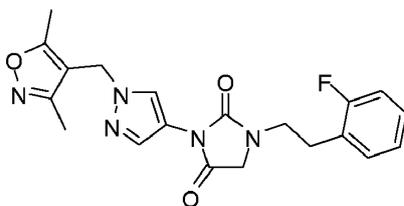
Preparada como en el ejemplo 10-52 a partir de 3-(1-((3,5-dimetilisoxazol-4-il)metil)-1H-pirazol-4-il)imidazolidin-2,4-diona (ejemplo 10-1) y bromuro de 2-clorofenetilo. Rendimiento: 25%. MS M+H calculado 414,13; encontrado 414,2. Se mostró que el compuesto del título inhibe el receptor del amargor hT2R08 y tuvo una IC<sub>50</sub> de 0,25 µM.

20 **Ejemplo 10-82: 1-(3-Clorofenetil)-3-(1-((3,5-dimetilisoxazol-4-il)metil)-1H-pirazol-4-il)imidazolidin-2,4-diona**



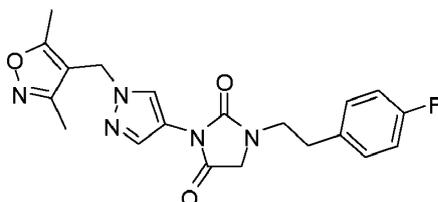
Preparada como en el ejemplo 10-52 a partir de 3-(1-((3,5-dimetilisoxazol-4-il)metil)-1H-pirazol-4-il)imidazolidin-2,4-diona (ejemplo 10-1) y bromuro de 3-clorofenetilo. Rendimiento: 27%. MS M+H calculado 414,13; encontrado 414,2. Se mostró que el compuesto del título inhibe el receptor del amargor hT2R08 y tuvo una IC<sub>50</sub> de 0,20 µM.

25 **Ejemplo 10-83: 3-(1-((3,5-Dimetilisoxazol-4-il)metil)-1H-pirazol-4-il)-1-(2-fluorofenetil)imidazolidin-2,4-diona**



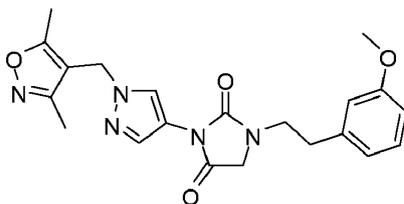
Preparada como en el ejemplo 10-52 a partir de 3-(1-((3,5-dimetilisoxazol-4-il)metil)-1*H*-pirazol-4-il)imidazolidin-2,4-diona (ejemplo 10-1) y bromuro de 2-fluorofenetilo. Rendimiento: 24%. MS M+H calculado 398,16; encontrado 398,1. Se mostró que el compuesto del título inhibe el receptor del amargor hT2R08 y tuvo una IC<sub>50</sub> de 0,13 μ.

5 **Ejemplo 10-84: 3-(1-((3,5-Dimetilisoxazol-4-il)metil)-1*H*-pirazol-4-il)-1-(4-fluorofenil)imidazolidin-2,4-diona**



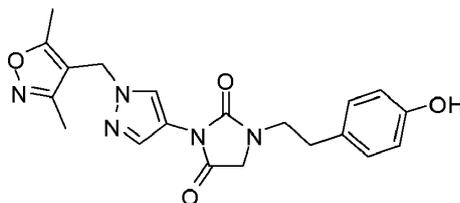
Preparada como en el ejemplo 10-52 a partir de 3-(1-((3,5-dimetilisoxazol-4-il)metil)-1*H*-pirazol-4-il)imidazolidin-2,4-diona (ejemplo 10-1) y bromuro de 4-fluorofenetilo. Rendimiento: 34%. MS M+H calculado 398,16; encontrado 398,1. Se mostró que el compuesto del título inhibe el receptor del amargor hT2R08 y tuvo una IC<sub>50</sub> de 0,01 μM.

10 **Ejemplo 10-85: 3-(1-((3,5-Dimetilisoxazol-4-il)metil)-1*H*-pirazol-4-il)-1-(3-metoxifenil)imidazolidin-2,4-diona**



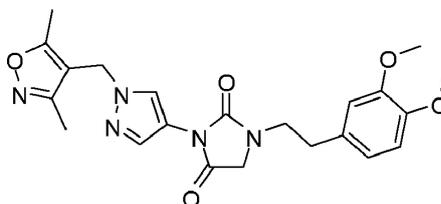
Preparada como en el ejemplo 10-52 a partir de 3-(1-((3,5-dimetilisoxazol-4-il)metil)-1*H*-pirazol-4-il)imidazolidin-2,4-diona (ejemplo 10-1) y bromuro de 3-metoxifenetilo. Rendimiento: 34%. MS M+H calculado 410,18; encontrado 410,1. Se mostró que el compuesto del título inhibe el receptor del amargor hT2R08 y tuvo una IC<sub>50</sub> de 0,16 μM.

15 **Ejemplo 10-86: 3-(1-((3,5-Dimetilisoxazol-4-il)metil)-1*H*-pirazol-4-il)-1-(4-hidroxifenil)imidazolidin-2,4-diona**



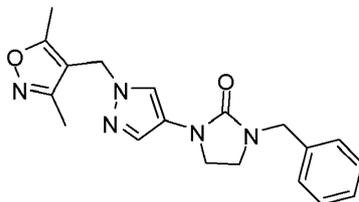
Preparada como en el ejemplo 10-52 a partir de 3-(1-((3,5-dimetilisoxazol-4-il)metil)-1*H*-pirazol-4-il)imidazolidin-2,4-diona (ejemplo 10-1) y bromuro de 4-hidroxifenetilo. Rendimiento: 31%. MS M+H calculado 396,16; encontrado 396,1. Se mostró que el compuesto del título inhibe el receptor del amargor hT2R08 y tuvo una IC<sub>50</sub> de 0,41 μM.

20 **Ejemplo 10-87: 1-(3,4-Dimetoxifenil)-3-(1-((3,5-dimetilisoxazol-4-il)metil)-1*H*-pirazol-4-il)imidazolidin-2,4-diona**



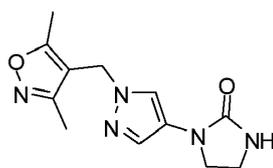
Preparada como en el ejemplo 10-52 a partir de 3-(1-((3,5-dimetilisoaxazol-4-il)metil)-1H-pirazol-4-il)imidazolidin-2,4-diona (ejemplo 10-1) y bromuro de 3,4-dimetoxifenetilo. Rendimiento: 36%. MS M+H calculado 440,19; encontrado 440,2. Se mostró que el compuesto del título inhibe el receptor del amargor hT2R08 y tuvo una IC<sub>50</sub> de 0,26 µM.

**Ejemplo 10-88: 1-Bencil-3-(1-((3,5-dimetilisoaxazol-4-il)metil)-1H-pirazol-4-il)imidazolidin-2-ona**



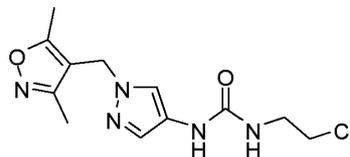
5 Se agitaron 1-(1-((3,5-dimetilisoaxazol-4-il)metil)-1H-pirazol-4-il)imidazolidin-2-ona (ejemplo 10-88a) (50 mg, 0,19 mmoles) e hidruro de sodio al 60% (8 mg, 0,21 mmoles) en DMF (3 ml) a temperatura ambiente durante 15 minutos, y después se enfriaron hasta 0°C. Se añadió bromuro de bencilo (33 mg, 0,19 mmoles) a la mezcla y se dejó calentar a temperatura ambiente durante 2 horas. La reacción se paralizó con metanol, y se concentró en el evaporador giratorio. La reacción se diluyó con salmuera (50 ml), y se extrajo con diclorometano (2 x, 50 ml). Los extractos orgánicos combinados se secaron sobre sulfato de magnesio, se filtraron y se concentraron en el evaporador giratorio. El residuo se purificó mediante cromatografía en columna en sílice (gradiente de 100% hasta 90% de diclorometano en metanol: 30 minutos) para producir 1-bencil-3-(1-((3,5-dimetilisoaxazol-4-il)metil)-1H-pirazol-4-il)imidazolidin-2-ona (21 mg, 31%) como un sólido blanco. MS M+H calculado 352,17; encontrado 352,2. Se mostró que el compuesto del título inhibe el receptor del amargor hT2R08 y tuvo una IC<sub>50</sub> de 0,71 µM.

**Ejemplo 10-88a: 1-(1-((3,5-Dimetilisoaxazol-4-il)metil)-1H-pirazol-4-il)imidazolidin-2-ona**



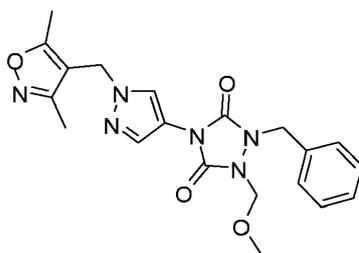
20 Se agitaron 1-(2-cloroetil)-3-(1-((3,5-dimetilisoaxazol-4-il)metil)1H-pirazol-4-il)urea (ejemplo 10-88b) (115 mg, 0,39 mmoles) e hidruro de sodio al 60% (17 mg, 0,42 mmoles) en DMF (2 ml) a 0°C durante 15 minutos, y después se dejó calentar hasta la temperatura ambiente con agitación durante 2 horas. La reacción se paralizó con metanol, y se concentró en el evaporador giratorio. La reacción se diluyó con salmuera (50 ml), y se extrajo con diclorometano (2 x, 50 ml). Los extractos orgánicos combinados se secaron sobre sulfato de magnesio, se filtraron, y se concentraron en el evaporador giratorio. El residuo se purificó mediante cromatografía en columna en sílice (gradiente de 100% hasta 90% de diclorometano en metanol: 30 minutos) para producir 1-(1-((3,5-dimetilisoaxazol-4-il)metil)-1H-pirazol-4-il)imidazolidin-2-ona (98 mg, 97%) como un sólido blanco. RMN <sup>1</sup>H (DMSO-*d*<sub>6</sub>, 400 MHz): δ 2,10 (s, 3H), 2,37 (s, 3H), 3,35-3,39 (m, 2H), 3,61 (d, *J* = 8,8 Hz, 1H), 3,63 (d, *J* = 10,4 Hz, 1H), 5,07 (s, 2H), 6,71 (s, 1H), 7,42 (s, 1H), 7,74 (s, 1H). MS M+H calculado 262,12; encontrado 262,1.

**Ejemplo 10-88b: 1-(2-Cloroetil)-3-(1-((3,5-dimetilisoaxazol-4-il)metil)-1H-pirazol-4-il)urea**



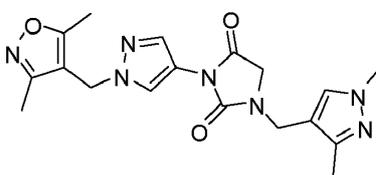
30 Se calentaron a 65°C durante 16 horas 1-((3,5-dimetilisoaxazol-4-il)metil)-1H-pirazol-4-amina (419 mg, 2,18 mmoles) e isocianato de 2-cloroetilo (230 mg, 2,18 mmoles) en acetonitrilo (5 ml). La reacción se enfrió hasta la temperatura ambiente, y se concentró en el evaporador giratorio. El residuo se purificó mediante cromatografía en columna en sílice (gradiente de 100% hasta 90% de diclorometano en metanol: 30 minutos), se secó, y se trituró con acetato de etilo/hexanos (1/9) para producir (1-(2-cloroetil)-3-(1-((3,5-dimetilisoaxazol-4-il)metil)1H-pirazol-4-il)urea (258 mg, 40%) como un sólido amarillo. MS M+H calculado 298,10; encontrado 298,1

**Ejemplo 10-89: 1-Bencil-4-(1-((3,5-dimetilisoaxazol-4-il)metil)-1H-pirazol-4-il)-2-(metoximetil)-1,2,4-triazolidin-3,5-diona**



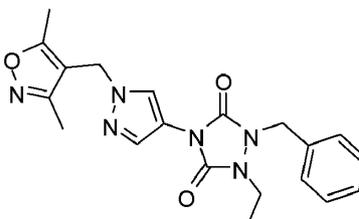
Preparada como en el ejemplo 10-91 a partir de 1-bencil-4-(1-((3,5-dimetilisoxazol-4-il)metil)-1H-pirazol-4-il)-1,2,4-triazolidin-3,5-diona (ejemplo 10-91a) y bromometil metil éter. Rendimiento: 18%. MS M+H calculado 411,17; encontrado 411,2. Se mostró que el compuesto del título inhibe el receptor del amargor hT2R08 y tuvo una IC<sub>50</sub> de 0,02 μM.

**Ejemplo 10-90: 1-((1,3-Dimetil-1H-pirazol-4-il)metil)-3-(1-((3,5-dimetilisoxazol-4-il)metil)-1H-pirazol-4-il)imidazolidin-2,4-diona**



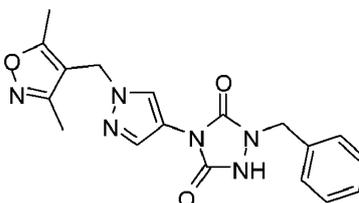
Se disolvieron 3-(1-((3,5-dimetilisoxazol-4-il)metil)-1H-pirazol-4-il)imidazolidin-2,4-diona (10a) (200 mg, 0,7 mmoles), 4-(clorometil)-1,3-dimetil-1H-pirazol (144 mg, 1 mmol), y carbonato de cesio (325 mg, 1 mmol) en 2 ml DMF, y se irradiaron en el reactor de microondas a 165°C durante 5 minutos. La reacción se enfrió hasta la temperatura ambiente, y la sal precipitada se eliminó mediante filtración. La disolución transparente que contiene producto bruto se obtuvo y se purificó mediante HPLC (10 hasta 95% de acetonitrilo/agua; 25 minutos) para producir 1-((1,3-dimetil-1H-pirazol-5-il)metil)-3-(1-((3,5-dimetilisoxazol-4-il)metil)-1H-pirazol-4-il)imidazolidin-2,4-diona (150 mg, 53%) como un sólido marrón claro. RMN <sup>1</sup>H (DMSO, 400 MHz): δ 2,09 (s, 3H), 2,14 (s, 3H), 2,20 (s, 3H), 3,70 (s, 3H), 3,99 (s, 2H), 4,55 (s, 2H), 5,19 (s, 2H), 6,06 (s, H), 7,77 (s, H), 8,17 (s, H).. MS M+H calculado para 384,2; encontrado 384,2. Punto de fusión: 145-146°C.

**Ejemplo 10-91: 1-Bencil-4-(1-((3,5-dimetilisoxazol-4-il)metil)-1H-pirazol-4-il)-2-etil-1,2,4-triazolidin-3,5-diona**



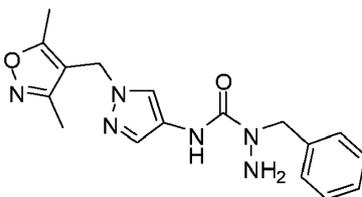
Se calentaron a 80°C durante 15 horas 1-bencil-4-(1-((3,5-dimetilisoxazol-4-il)metil)-1H-pirazol-4-il)-1,2,4-triazolidin-3,5-diona (100 mg, 0,27 mmoles), bromoetano (149 mg, 1,36 mmoles), y carbonato de cesio (355 mg, 1,1 mmoles) en DMF (5 ml). La reacción se enfrió hasta la temperatura ambiente, se diluyó con salmuera (50 ml), y se extrajo con acetato de etilo (2 x, 50 ml). Los extractos orgánicos combinados se secaron sobre sulfato de magnesio, se filtraron, y se concentraron en el evaporador giratorio. El residuo se purificó mediante HPLC (gradiente de 5 hasta 95% de acetonitrilo en H<sub>2</sub>O: 25 minutos) para producir 1-bencil-4-(1-((3,5-dimetilisoxazol-4-il)metil)-1H-pirazol-4-il)-2-etil-1,2,4-triazolidin-3,5-diona (40 mg, 37%) como un aceite. RMN <sup>1</sup>H (DMSO-d<sub>6</sub>, 400 MHz): δ 0,97 (t, J = 7,2 Hz, 3H), 2,13 (s, 3H), 2,39 (s, 3H), 3,58 (q, J = 6,8 Hz, 2H), 4,80 (s, 2H), 5,18 (s, 2H), 7,28-7,36 (m, 5H), 7,77 (s, 1H), 8,19 (s, 1H). MS M+H calculado 395,18; encontrado 395,2. Se mostró que el compuesto del título inhibe el receptor del amargor hT2R08 y tuvo una IC<sub>50</sub> de 0,04 μM.

**Ejemplo 10-91a: 1-bencil-4-(1-((3,5-dimetilisoxazol-4-il)metil)-1H-pirazol-4-il)-1,2,4-triazolidin-3,5-diona**



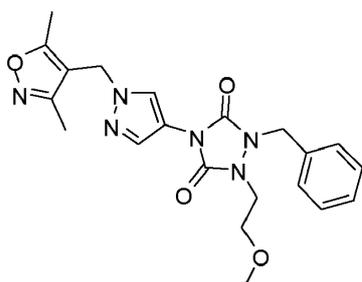
Se calentaron a 100°C durante 48 horas 1-bencil-N-(1-((3,5-dimetilisoxazol-4-il)metil)-1H-pirazol-4-il)hidrazincarboxamida (2,00 g, 5,88 mmoles), cloroformiato de etilo (6,38 g, 58,77 mmoles), y trietilamina (1,78 g, 17,63 mmoles) en acetonitrilo (50 ml). La mezcla se enfrió hasta 80°C, se añadió NaOH (ac) 1 M (5 ml), y la mezcla de reacción se agitó durante 1 hora. La reacción se enfrió hasta la temperatura ambiente, y se concentró en el evaporador giratorio. El residuo se disolvió en diclorometano y se filtró para eliminar las sales, y la disolución se concentró para producir 1-bencil-4-(1-((3,5-dimetilisoxazol-4-il)metil)-1H-pirazol-4-il)-1,2,4-triazolidin-3,5-diona (1,28 g, 60%) como un aceite amarillo. MS M+H calculado 367,14; encontrado 367,2.

**Ejemplo 10-91b: 1-Bencil-N-(1-((3,5-dimetilisoxazol-4-il)metil)-1H-pirazol-4-il)hidrazincarboxamida**



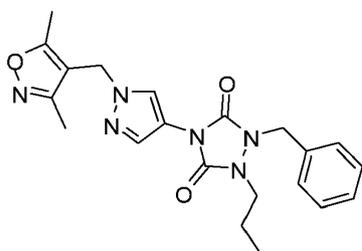
Se calentó a reflujo durante 4 horas 1-((3,5-dimetilisoxazol-4-il)metil)-1H-pirazol-4-carbonil azida (2,79 g, 11,33 mmoles) en tolueno (70 ml) para producir 4-((4-isocianato-1H-pirazol-1-il)metil)-3,5-dimetilisoxazol *in situ*. Se añadieron dihidrocloruro de bencilhidrazina (2,44 g, 12,45 mmoles) y trietilamina (2,29 g, 22,64 mmoles) a la mezcla. La mezcla se calentó a 100°C durante otras 4 horas. La reacción se enfrió hasta la temperatura ambiente, se diluyó con acetato de etilo (150 ml), y se filtró a través de celita. El licor madre se lavó entonces con salmuera (150 ml), y la capa orgánica se secó sobre sulfato de magnesio, se filtró y se concentró. El residuo se purificó mediante cromatografía en columna en sílice (gradiente de 100% hasta 90% diclorometano en metanol: 30 minutos) para producir 1-bencil-N-(1-((3,5-dimetilisoxazol-4-il)metil)-1H-pirazol-4-il)hidrazincarboxamida (2,00 g, 52%) como un aceite. MS M+H calculado 341,16; encontrado 341,2.

**Ejemplo 10-92: 1-Bencil-4-(1-((3,5-dimetilisoxazol-4-il)metil)-1H-pirazol-4-il)-2-(2-metoxietil)-1,2,4-triazolidin-3,5-diona**



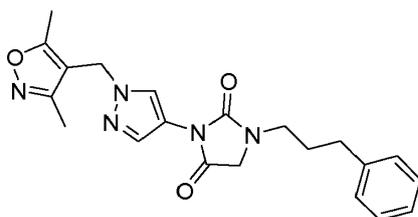
Preparada como en el ejemplo 10-91 a partir de 1-bencil-4-(1-((3,5-dimetilisoxazol-4-il)metil)-1H-pirazol-4-il)-1,2,4-triazolidin-3,5-diona (ejemplo 10-91a) y 2-bromoetil metil éter. Rendimiento: 20%. MS M+H calculado 425,19; encontrado 425,2. Se mostró que el compuesto del título inhibe el receptor del amargor hT2R08 y tuvo una IC<sub>50</sub> de 0,06 μM.

**Ejemplo 10-93: 1-Bencil-4-(1-((3,5-dimetilisoxazol-4-il)metil)-1H-pirazol-4-il)-2-propil-1,2,4-triazolidin-3,5-diona**



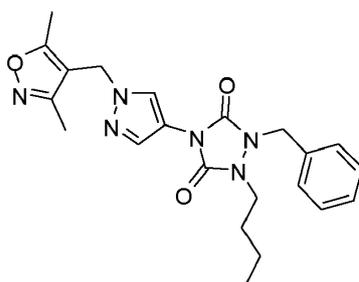
Preparada como en el ejemplo 10-91 a partir de 1-bencil-4-(1-((3,5-dimetilisoxazol-4-il)metil)-1H-pirazol-4-il)-1,2,4-triazolidin-3,5-diona (ejemplo 10-91a) y 1-bromopropano. Rendimiento: 38%. MS M+H calculado 409,19; encontrado 409,2. Se mostró que el compuesto del título inhibe el receptor del amargor hT2R08 y tuvo una IC<sub>50</sub> de 0,06 μM.

**Ejemplo 10-94: 3-(1-((3,5-Dimetilisoxazol-4-il)metil)-1H-pirazol-4-il)-1-(3-fenilpropil)imidazolidin-2,4-diona.**



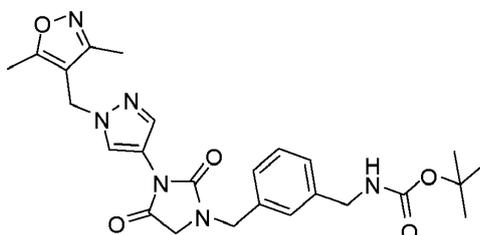
Preparada como en el ejemplo 10-52 a partir de 3-(1-((3,5-dimetilisoazol-4-il)metil)-1H-pirazol-4-il)imidazolidin-2,4-diona (ejemplo 10-1) y (3-bromopropil)benzeno. Rendimiento: 36%. MS M+H calculado 394,2; encontrado 394,2. Se mostró que el compuesto del título inhibe el receptor del amargor hT2R08 y tuvo una IC<sub>50</sub> de 0,26 μM.

5 **Ejemplo 10-95: 1-Bencil-2-butil-4-(1-((3,5-dimetilisoazol-4-il)metil)-1H-pirazol-4-il)-1,2,4-triazolidin-3,5-diona**



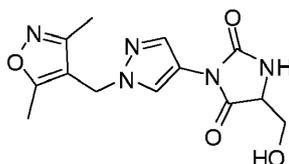
Preparada como en el ejemplo 10-91 a partir de 1-bencil-4-(1-((3,5-dimetilisoazol-4-il)metil)-1H-pirazol-4-il)-1,2,4-triazolidin-3,5-diona (ejemplo 10-91a) y 1-bromobutano. Rendimiento: 22%. MS M+H calculado 423,21; encontrado 423,15. Se mostró que el compuesto del título inhibe el receptor del amargor hT2R08 y tuvo una IC<sub>50</sub> de 0,41 μM.

10 **Ejemplo 10-96: 3-((3-(1-((3,5-Dimetilisoazol-4-il)metil)-1H-pirazol-4-il)-2,4-dioxoimidazolidin-1-il)metil)bencilcarbamato de terc-butilo**



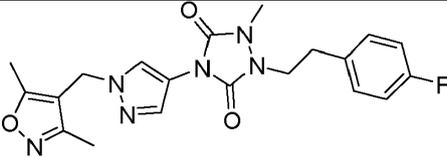
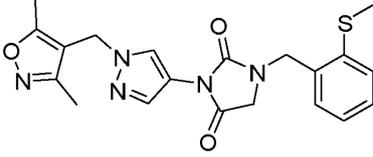
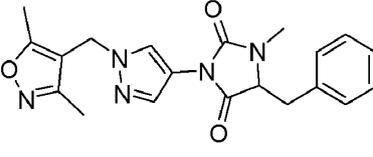
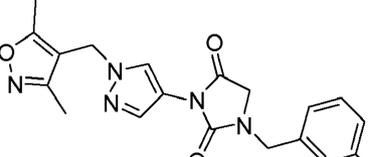
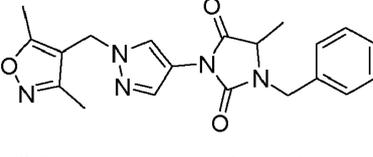
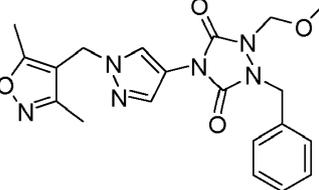
Se agitaron 3-(1-((3,5-dimetilisoazol-4-il)metil)-1H-pirazol-4-il)imidazolidin-2,4-diona (ejemplo 10-1) (070 mg, 0,254 mmoles), 3-(hidroximetil)bencilcarbamato de terc-butilo (0,254 mmoles, 60 mg), azodicarboxilato de dietilo (0,50 mmoles, 86 mg), y P-tBu<sub>3</sub> (125 ml, 0,50 mmoles) en THF (1 ml) durante 4 horas. La reacción se diluyó con acetato de etilo (1,5 ml) y se lavó con disolución saturada de bicarbonato de sodio (2 x, 1,5 ml). La fase orgánica se recogió, y la mezcla se concentró bajo una corriente de nitrógeno. El producto bruto se purificó mediante cromatografía en columna sobre gel de sílice utilizando acetato de etilo como el eluyente. Las fracciones puras se combinaron, y los disolventes se eliminaron en el evaporador giratorio para producir 3-((3-(1-((3,5-dimetilisoazol-4-il)metil)-1H-pirazol-4-il)-2,4-dioxoimidazolidin-1-il)metil)bencilcarbamato de terc-butilo como un sólido blanco (112 mg, 90%). RMN <sup>1</sup>H (CDCl<sub>3</sub>, 400 MHz): δ 1,44 (s, 9H), 2,19 (s, 3H), 2,42 (s, 3H), 3,48 (bs, 1H), 3,84 (s, 2H), 4,31-4,30 (d, J = 6 Hz, 1H), 4,60 (s, 2H), 4,87 (bs, 1H), 5,06 (s, 2H), 7,36 - 7,16 (m, 4H), 7,92 (s, 1H), 8,08 (s, 1H). Se mostró que el compuesto del título inhibe el receptor del amargor hT2R08 y tuvo una IC<sub>50</sub> de 0,90 μM.

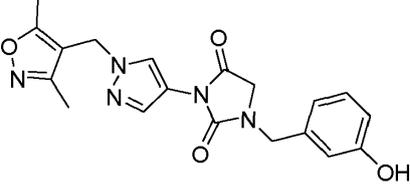
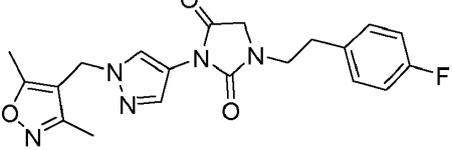
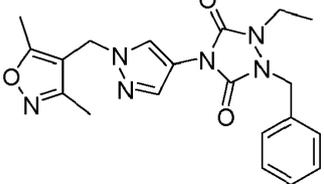
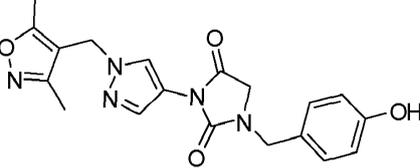
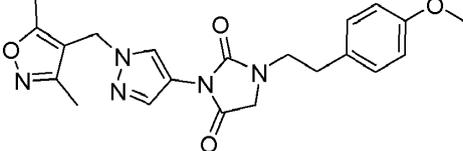
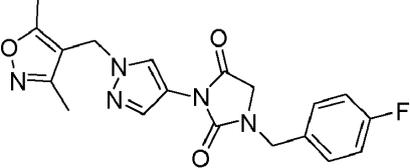
**Ejemplo 10-97: 3-(1-((3,5-Dimetilisoazol-4-il)metil)-1H-pirazol-4-il)-5-(hidroximetil)imidazolidin-2,4-diona**

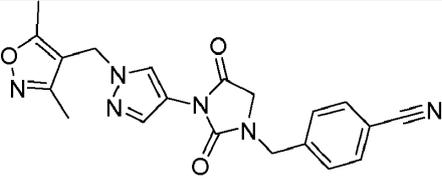
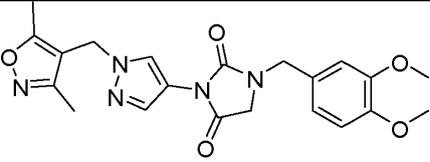
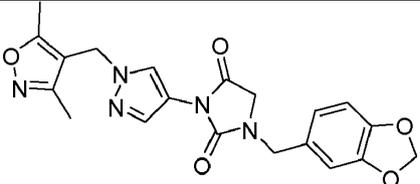
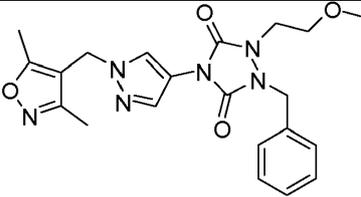
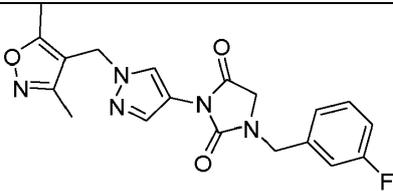
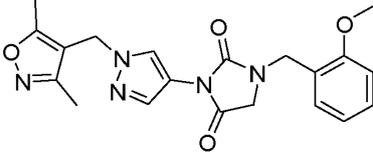


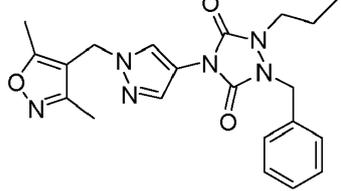
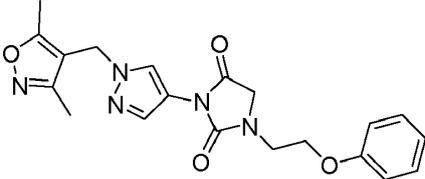
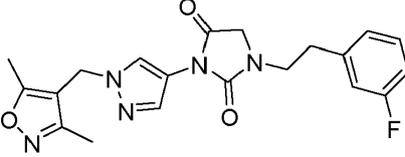
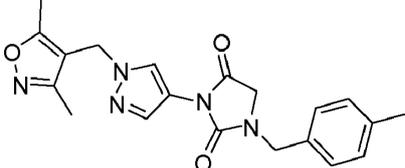
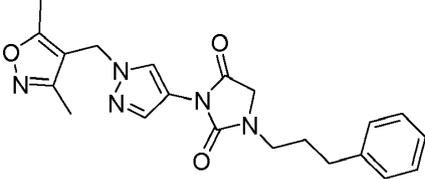
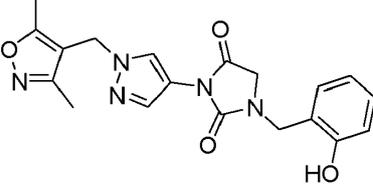
Se pusieron a reflujo 4-((4-isocianato-1H-pirazol-1-il)metil)-3,5-dimetilisoazol (ejemplo 10-1) (784 mg, 3,6 mmoles), hidrocloreto del éster metílico de serina (672 mg, 4,32 mmoles) y trietilamina (1 ml, 7,2 mmoles) en tolueno (16 ml) durante 8 horas. La reacción se dejó enfriar hasta la temperatura ambiente, y después la disolución se concentró en el evaporador giratorio. El producto se purificó mediante HPLC de fase inversa (gradiente de 5 hasta 95% de

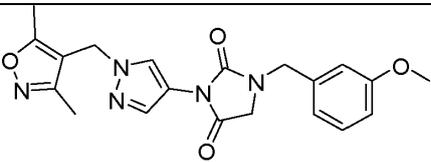
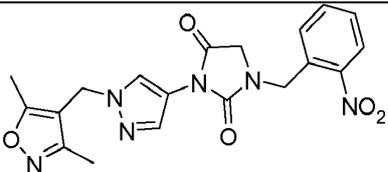
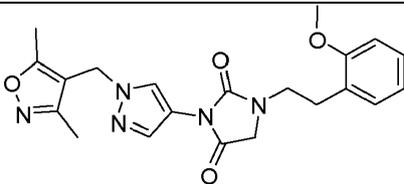
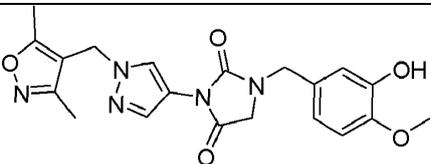
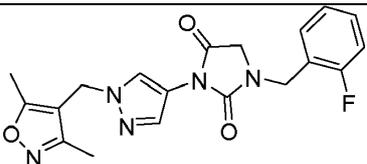
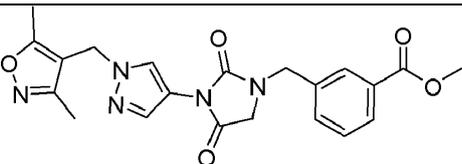
5 acetonitrilo en H<sub>2</sub>O: 16 minutos) para producir 3-(1-((3,5-dimetilisoxazol-4-il)metil)-1H-pirazol-4-il)-5-(hidroximetil)imidazolidin-2,4-diona como un sólido blanco (60 mg, 25%). RMN <sup>1</sup>H (CDCl<sub>3</sub>, 400 MHz): δ (s, 3H), 2,40 (s, 3H), 3,13-3,07 (m, 1H), 3,94-3,93 (d, J = 4 Hz, 2H), 4,21-4,19 (t, J = 4 Hz, 1H), 5,03 (s, 2H), 6,68 (bs, 1H), 7,87 (s, 1H), 7,99 (s, 1H). Se mostró que el compuesto del título inhibe el receptor del amargor hT2R08 y tuvo una IC<sub>50</sub> de 3 μM.

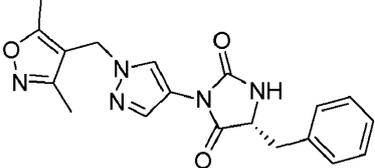
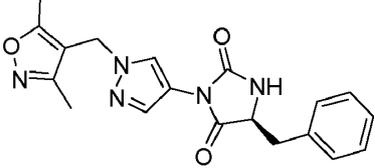
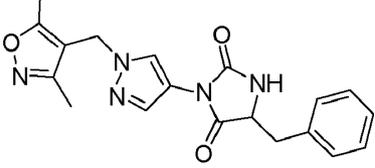
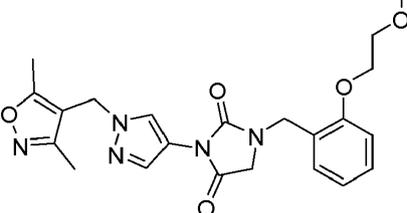
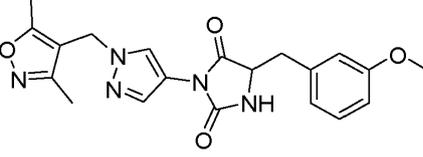
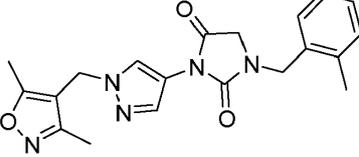
Compuesto nº	Compuesto	IC <sub>50</sub> de hT2R8(μM)
10-66	 <p>4-(1-((3,5-dimetilisoxazol-4-il)metil)-1H-pirazol-4-il)-1-(4-fluorofenil)-2-metil-1,2,4-triazolidin-3,5-diona</p>	0,012
10-15	 <p>3-(1-((3,5-dimetilisoxazol-4-il)metil)-1H-pirazol-4-il)-1-(2-(metiltio)bencil)imidazolidin-2,4-diona</p>	0,016
10-42	 <p>5-bencil-3-(1-((3,5-dimetilisoxazol-4-il)metil)-1H-pirazol-4-il)-1-metilimidazolidin-2,4-diona</p>	0,017
10-26	 <p>3-(1-((3,5-dimetilisoxazol-4-il)metil)-1H-pirazol-4-il)-1-(3-metilbencil)imidazolidin-2,4-diona</p>	0,019
10-43	 <p>1-bencil-3-(1-((3,5-dimetilisoxazol-4-il)metil)-1H-pirazol-4-il)-5-metilimidazolidin-2,4-diona</p>	0,020
10-89	 <p>1-bencil-4-(1-((3,5-dimetilisoxazol-4-il)metil)-1H-pirazol-4-il)-2-(metoximetil)-1,2,4-triazolidin-3,5-diona</p>	0,024

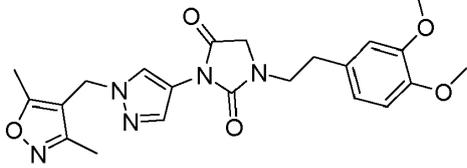
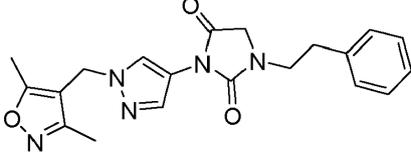
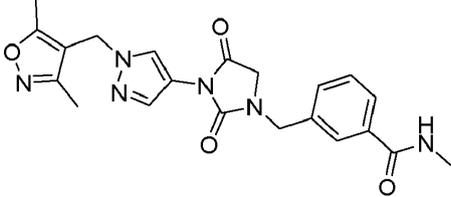
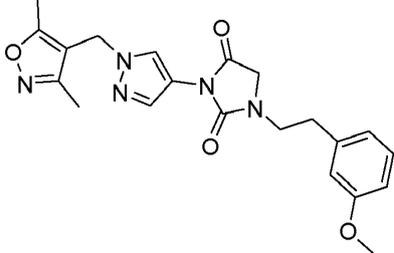
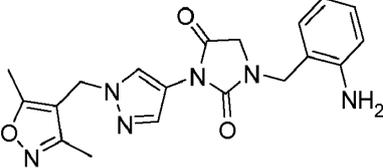
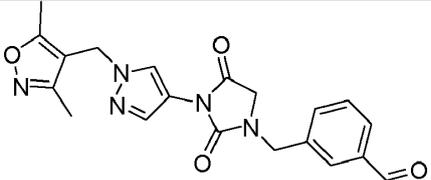
Compuesto nº	Compuesto	IC <sub>50</sub> de hT2R8(µM)
10-10	 <p data-bbox="507 555 1106 611">3-(1-((3,5-dimetilisoxazol-4-il)metil)-1H-pirazol-4-il)-1-(3-hidroxi-bencil)imidazolidin-2,4-diona</p>	0,026
10-84	 <p data-bbox="507 813 1106 869">3-(1-((3,5-dimetilisoxazol-4-il)metil)-1H-pirazol-4-il)-1-(4-fluorofenil)imidazolidin-2,4-diona</p>	0,027
10-91	 <p data-bbox="427 1115 1185 1171">1-bencil-4-(1-((3,5-dimetilisoxazol-4-il)metil)-1H-pirazol-4-il)-2-etil-1,2,4-triazolidin-3,5-diona</p>	0,041
10-12	 <p data-bbox="507 1388 1106 1444">3-(1-((3,5-dimetilisoxazol-4-il)metil)-1H-pirazol-4-il)-1-(4-hidroxi-bencil)imidazolidin-2,4-diona</p>	0,043
10-79	 <p data-bbox="507 1653 1106 1709">3-(1-((3,5-dimetilisoxazol-4-il)metil)-1H-pirazol-4-il)-1-(4-metoxifenil)imidazolidin-2,4-diona</p>	0,044
10-31	 <p data-bbox="507 1926 1106 1982">3-(1-((3,5-dimetilisoxazol-4-il)metil)-1H-pirazol-4-il)-1-(4-fluorobencil)imidazolidin-2,4-diona</p>	0,045

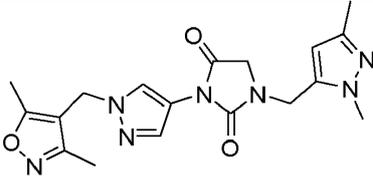
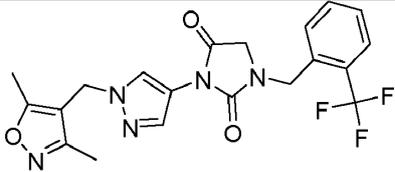
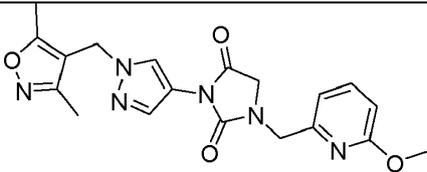
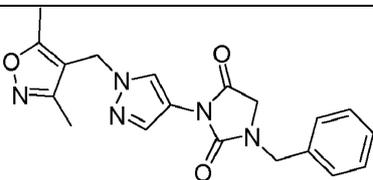
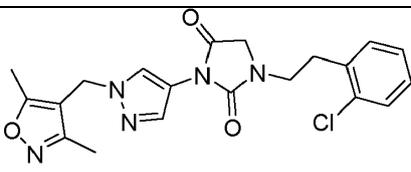
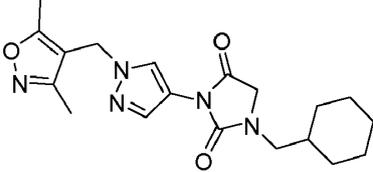
Compuesto nº	Compuesto	IC <sub>50</sub> de hT2R8(µM)
10-32	 <p>4-((3-(1-((3,5-dimetilisoxazol-4-il)metil)-1H-pirazol-4-il)-2,4-dioxoimidazolidin-1-il)metil)benzonitrilo</p>	0,048
10-35	 <p>1-(3,4-dimetoxibencil)-3-(1-((3,5-dimetilisoxazol-4-il)metil)-1H-pirazol-4-il)imidazolidin-2,4-diona</p>	0,051
10-36	 <p>1-(benzo[d][1,3]dioxol-5-ilmetil)-3-(1-((3,5-dimetilisoxazol-4-il)metil)-1H-pirazol-4-il)imidazolidin-2,4-diona</p>	0,053
10-92	 <p>1-bencil-4-(1-((3,5-dimetilisoxazol-4-il)metil)-1H-pirazol-4-il)-2-(2-metoxietil)-1,2,4-triazolidin-3,5-diona</p>	0,057
10-27	 <p>3-(1-((3,5-dimetilisoxazol-4-il)metil)-1H-pirazol-4-il)-1-(3-fluorobencil)imidazolidin-2,4-diona</p>	0,058
10-18	 <p>3-(1-((3,5-dimetilisoxazol-4-il)metil)-1H-pirazol-4-il)-1-(2-metoxibencil)imidazolidin-2,4-diona</p>	0,060

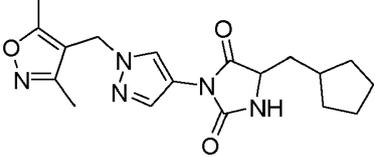
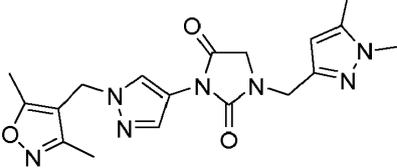
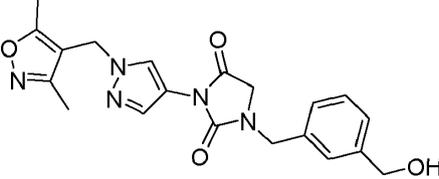
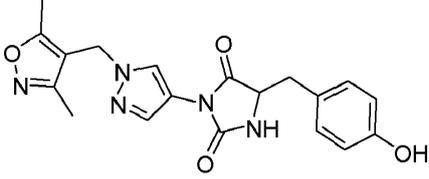
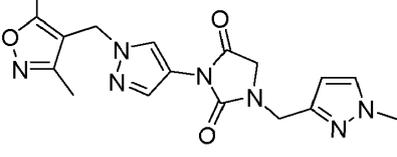
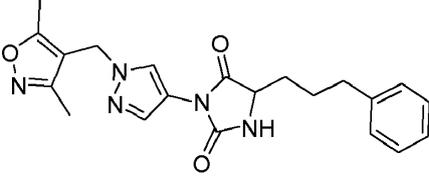
Compuesto nº	Compuesto	IC <sub>50</sub> de hT2R8(µM)
10-93	 <p>1-bencil-4-(1-((3,5-dimetilisoxazol-4-il)metil)-1H-pirazol-4-il)-2-propil-1,2,4-triazolidin-3,5-diona</p>	0,062
10-5	 <p>3-(1-((3,5-dimetilisoxazol-4-il)metil)-1H-pirazol-4-il)-1-(2-fenoxietil)imidazolidin-2,4-diona</p>	0,063
10-77	 <p>3-(1-((3,5-dimetilisoxazol-4-il)metil)-1H-pirazol-4-il)-1-(3-fluorofenil)imidazolidin-2,4-diona</p>	0,064
10-30	 <p>3-(1-((3,5-dimetilisoxazol-4-il)metil)-1H-pirazol-4-il)-1-(4-metilbencil)imidazolidin-2,4-diona</p>	0,065
10-94	 <p>3-(1-((3,5-dimetilisoxazol-4-il)metil)-1H-pirazol-4-il)-1-(3-fenilpropil)imidazolidin-2,4-diona</p>	0,068
10-11	 <p>3-(1-((3,5-dimetilisoxazol-4-il)metil)-1H-pirazol-4-il)-1-(2-hidroxibencil)imidazolidin-2,4-diona</p>	0,069

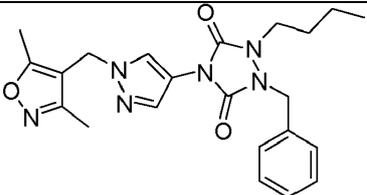
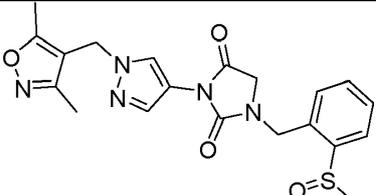
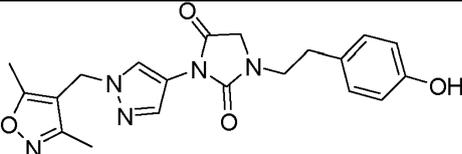
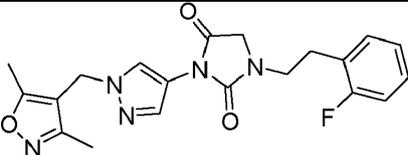
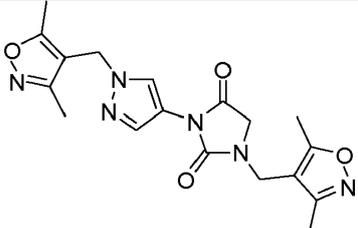
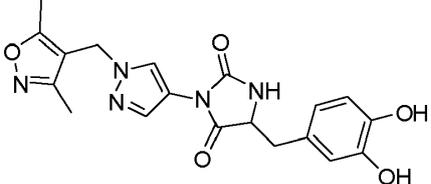
Compuesto nº	Compuesto	IC <sub>50</sub> de hT2R8(µM)
10-6	 <p data-bbox="507 521 1107 577">3-(1-((3,5-dimetilisoxazol-4-il)metil)-1H-pirazol-4-il)-1-(3-metoxibencil)imidazolidin-2,4-diona</p>	0,073
10-23	 <p data-bbox="507 790 1107 846">3-(1-((3,5-dimetilisoxazol-4-il)metil)-1H-pirazol-4-il)-1-(2-nitrobencil)imidazolidin-2,4-diona</p>	0,081
10-76	 <p data-bbox="507 1077 1107 1133">3-(1-((3,5-dimetilisoxazol-4-il)metil)-1H-pirazol-4-il)-1-(2-metoxifenetil)imidazolidin-2,4-diona</p>	0,097
10-13	 <p data-bbox="456 1339 1160 1395">3-(1-((3,5-dimetilisoxazol-4-il)metil)-1H-pirazol-4-il)-1-(3-hidroxi-4-metoxibencil)imidazolidin-2,4-diona</p>	0,087
10-21	 <p data-bbox="507 1601 1107 1657">3-(1-((3,5-dimetilisoxazol-4-il)metil)-1H-pirazol-4-il)-1-(2-fluorobencil)imidazolidin-2,4-diona</p>	0,090
10-7	 <p data-bbox="395 1863 1219 1919">3-((3-(1-((3,5-dimetilisoxazol-4-il)metil)-1H-pirazol-4-il)-2,4-dioxoimidazolidin-1-il)metil)benzoato de metilo</p>	0,102

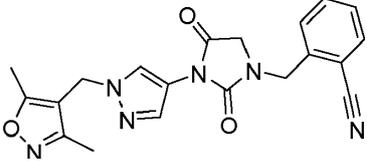
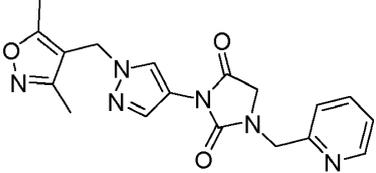
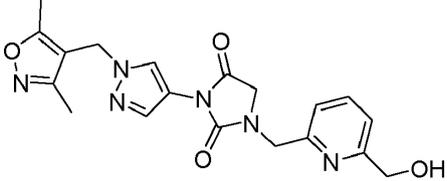
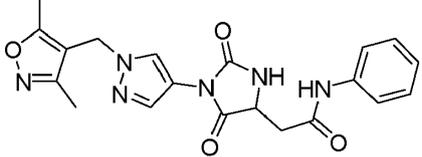
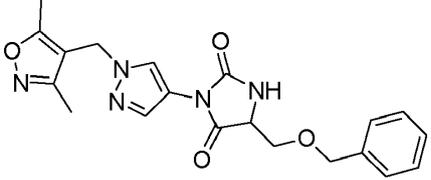
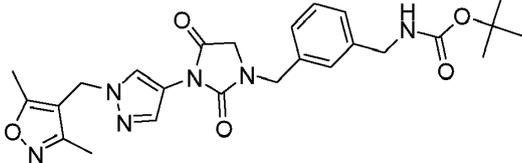
Compuesto nº	Compuesto	IC <sub>50</sub> de hT2R8(µM)
10-4	 <p>(R)-5-bencil-3-(1-((3,5-dimetilisoxazol-4-il)metil)-1H-pirazol-4-il)imidazolidin-2,4-diona</p>	0,112
10-3	 <p>(S)-5-bencil-3-(1-((3,5-dimetilisoxazol-4-il)metil)-1H-pirazol-4-il)imidazolidin-2,4-diona</p>	0,113
10-2	 <p>5-bencil-3-(1-((3,5-dimetilisoxazol-4-il)metil)-1H-pirazol-4-il)imidazolidin-2,4-diona</p>	0,117
10-16	 <p>3-(1-((3,5-dimetilisoxazol-4-il)metil)-1H-pirazol-4-il)-1-(2-(2-metoxietoxi)bencil)imidazolidin-2,4-diona</p>	0,131
10-56	 <p>3-(1-((3,5-dimetilisoxazol-4-il)metil)-1H-pirazol-4-il)-5-(3-metoxibencil)imidazolidin-2,4-diona</p>	0,131
10-20	 <p>3-(1-((3,5-dimetilisoxazol-4-il)metil)-1H-pirazol-4-il)-1-(2-metilbencil)imidazolidin-2,4-diona</p>	0,133

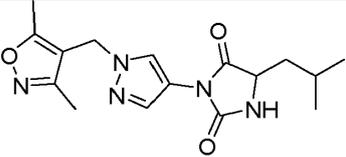
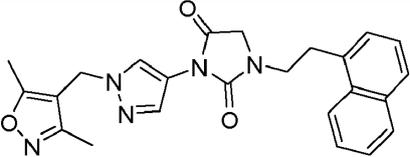
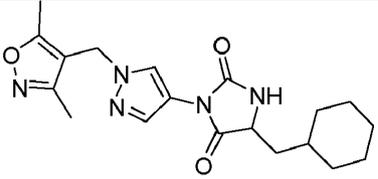
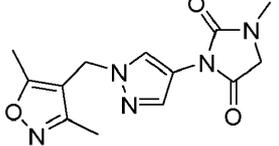
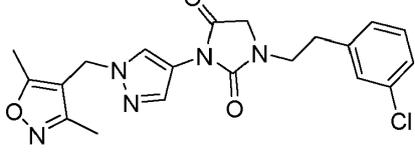
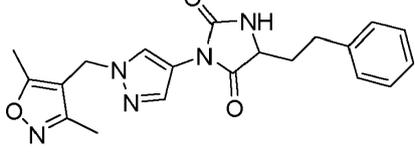
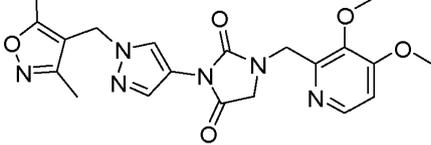
Compuesto nº	Compuesto	IC <sub>50</sub> de hT2R8(µM)
10-87	 <p>1-(3,4-dimetoxifenetil)-3-(1-((3,5-dimetilisoxazol-4-il)metil)-1H-pirazol-4-il)imidazolidin-2,4-diona</p>	0,137
10-78	 <p>3-(1-((3,5-dimetilisoxazol-4-il)metil)-1H-pirazol-4-il)-1-fenilimidazolidin-2,4-diona</p>	0,139
10-9	 <p>3-((3-(1-((3,5-dimetilisoxazol-4-il)metil)-1H-pirazol-4-il)-2,4-dioxoimidazolidin-1-il)metil)-N-metilbenzamida</p>	0,141
10-85	 <p>3-(1-((3,5-dimetilisoxazol-4-il)metil)-1H-pirazol-4-il)-1-(3-metoxifenetil)imidazolidin-2,4-diona</p>	0,158
10-34	 <p>1-(2-aminobencil)-3-(1-((3,5-dimetilisoxazol-4-il)metil)-1H-pirazol-4-il)imidazolidin-2,4-diona</p>	0,163
10-24	 <p>3-((3-(1-((3,5-dimetilisoxazol-4-il)metil)-1H-pirazol-4-il)-2,4-dioxoimidazolidin-1-il)metil)-N-metilbenzamida</p>	0,201

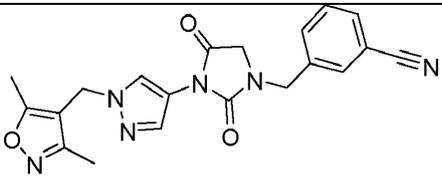
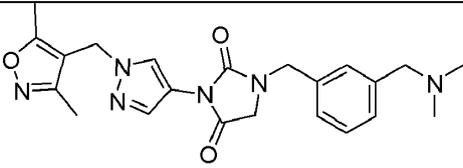
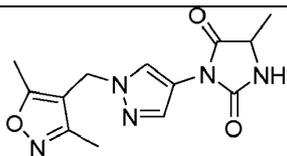
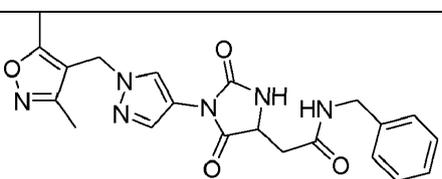
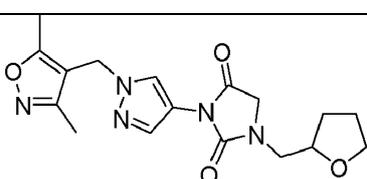
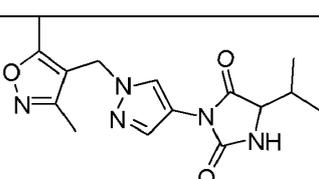
Compuesto nº	Compuesto	IC <sub>50</sub> de hT2R8(μM)
	1-il)metil)benzaldehído	
10-90	 <p>1-((1,3-dimetil-1H-pirazol-5-il)metil)-3-(1-((3,5-dimetilisoxazol-4-il)metil)-1H-pirazol-4-il)imidazolidin-2,4-diona</p>	0,215
10-22	 <p>3-(1-((3,5-dimetilisoxazol-4-il)metil)-1H-pirazol-4-il)-1-(2-(trifluorometil)encil)imidazolidin-2,4-diona</p>	0,221
10-75	 <p>3-(1-((3,5-dimetilisoxazol-4-il)metil)-1H-pirazol-4-il)-1-((6-metoxipiridin-2-il)metil)imidazolidin-2,4-diona</p>	0,229
10-53	 <p>1-bencil-3-(1-((3,5-dimetilisoxazol-4-il)metil)-1H-pirazol-4-il)imidazolidin-2,4-diona</p>	0,257
10-81	 <p>1-(2-clorofenetil)-3-(1-((3,5-dimetilisoxazol-4-il)metil)-1H-pirazol-4-il)imidazolidin-2,4-diona</p>	0,248
10-74	 <p>1-(ciclohexilmetil)-3-(1-((3,5-dimetilisoxazol-4-il)metil)-1H-pirazol-4-il)imidazolidin-2,4-diona</p>	0,276

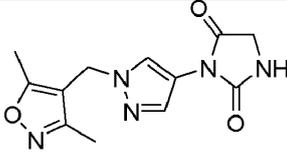
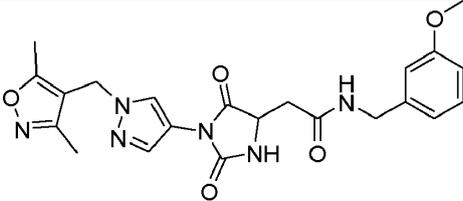
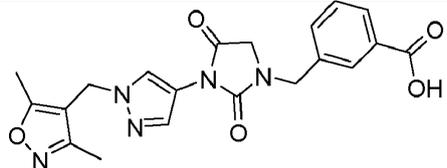
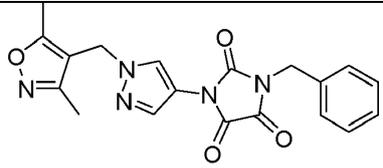
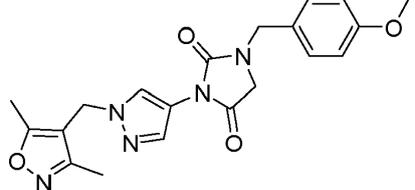
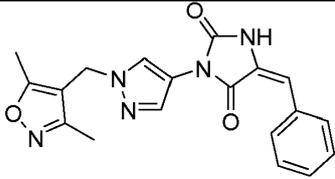
Compuesto nº	Compuesto	IC <sub>50</sub> de hT2R8(µM)
10-58	 <p>5-(ciclopentilmetil)-3-(1-((3,5-dimetilisoxazol-4-il)metil)-1H-pirazol-4-il)imidazolidin-2,4-diona</p>	0,316
10-28	 <p>1-((1,5-dimetil-1H-pirazol-3-il)metil)-3-(1-((3,5-dimetilisoxazol-4-il)metil)-1H-pirazol-4-il)imidazolidin-2,4-diona</p>	0,322
10-33	 <p>3-(1-((3,5-dimetilisoxazol-4-il)metil)-1H-pirazol-4-il)-1-(3-(hidroximetil)bencil)imidazolidin-2,4-diona</p>	0,322
10-59	 <p>3-(1-((3,5-dimetilisoxazol-4-il)metil)-1H-pirazol-4-il)-5-(4-hidroxi-bencil)imidazolidin-2,4-diona</p>	0,327
10-38	 <p>3-(1-((3,5-dimetilisoxazol-4-il)metil)-1H-pirazol-4-il)-1-((1-metil-1H-pirazol-3-il)metil)imidazolidin-2,4-diona</p>	0,363
10-46	 <p>3-(1-((3,5-dimetilisoxazol-4-il)metil)-1H-pirazol-4-il)-5-(3-fenilpropil)imidazolidin-2,4-diona</p>	0,484

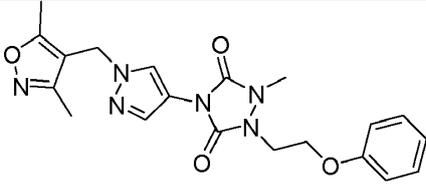
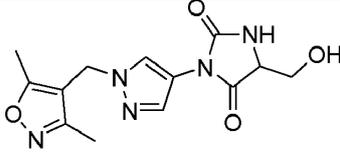
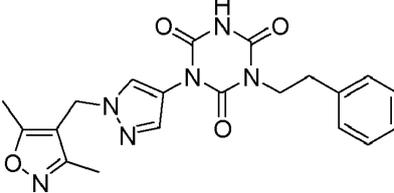
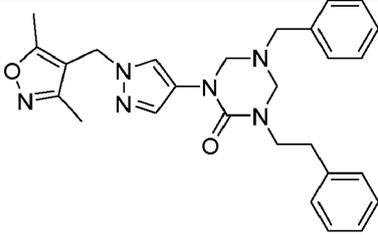
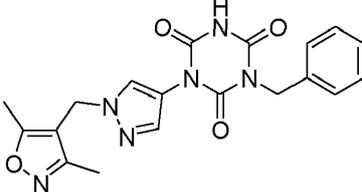
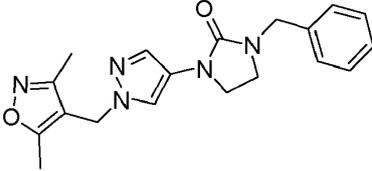
Compuesto nº	Compuesto	IC <sub>50</sub> de hT2R8(µM)
10-95	 <p data-bbox="419 562 1198 618">1-bencil-2-butil-4-(1-((3,5-dimetilisoxazol-4-il)metil)-1H-pirazol-4-il)-1,2,4-triazolidin-3,5-diona</p>	0,409
10-17	 <p data-bbox="507 860 1107 920">3-(1-((3,5-dimetilisoxazol-4-il)metil)-1H-pirazol-4-il)-1-(2-(metilsulfinil)bencil)imidazolidin-2,4-diona</p>	0,412
10-86	 <p data-bbox="507 1122 1107 1182">3-(1-((3,5-dimetilisoxazol-4-il)metil)-1H-pirazol-4-il)-1-(4-hidroxifenetil)imidazolidin-2,4-diona</p>	0,412
10-83	 <p data-bbox="507 1379 1107 1440">3-(1-((3,5-dimetilisoxazol-4-il)metil)-1H-pirazol-4-il)-1-(2-fluorofenetil)imidazolidin-2,4-diona</p>	0,442
10-55	 <p data-bbox="419 1711 1198 1771">1-((3,5-dimetilisoxazol-4-il)metil)-3-(1-((3,5-dimetilisoxazol-4-il)metil)-1H-pirazol-4-il)imidazolidin-2,4-diona</p>	0,479
10-60	 <p data-bbox="419 2002 1198 2063">5-(3,4-dihidroxibencil)-3-(1-((3,5-dimetilisoxazol-4-il)metil)-1H-pirazol-4-il)imidazolidin-2,4-diona</p>	0,513

Compuesto nº	Compuesto	IC <sub>50</sub> de hT2R8(µM)
10-19	 <p>2-((3-(1-((3,5-dimetilisoxazol-4-il)metil)-1H-pirazol-4-il)-2,4-dioxoimidazolidin-1-il)metil)benzoniitrilo</p>	0,550
10-54	 <p>3-(1-((3,5-dimetilisoxazol-4-il)metil)-1H-pirazol-4-il)-1-(piridin-2-ilmetil)imidazolidin-2,4-diona</p>	0,609
10-71	 <p>3-(1-((3,5-dimetilisoxazol-4-il)metil)-1H-pirazol-4-il)-1-((6-(hidroximetil)piridin-2-il)metil)imidazolidin-2,4-diona</p>	0,721
10-48	 <p>2-(1-(1-((3,5-dimetilisoxazol-4-il)metil)-1H-pirazol-4-il)-2,5-dioxoimidazolidin-4-il)-N-fenilacetamida</p>	0,747
10-47	 <p>5-(benciloximetil)-3-(1-((3,5-dimetilisoxazol-4-il)metil)-1H-pirazol-4-il)imidazolidin-2,4-diona</p>	0,766
10-96	 <p>3-((3-(1-((3,5-dimetilisoxazol-4-il)metil)-1H-pirazol-4-il)-2,4-dioxoimidazolidin-1-il)metil)bencilcarbamato de terc-butilo</p>	0,891

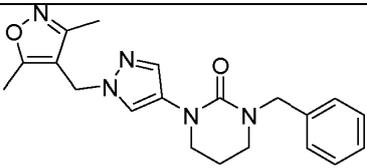
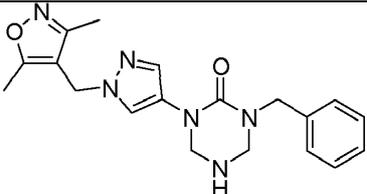
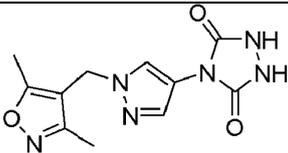
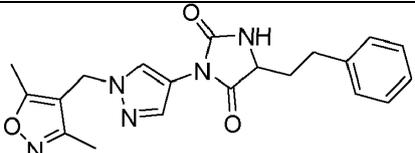
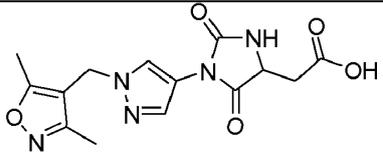
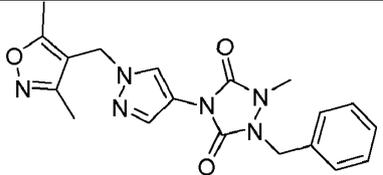
Compuesto nº	Compuesto	IC <sub>50</sub> de hT2R8(µM)
10-61	 <p>3-(1-((3,5-dimetilisoxazol-4-il)metil)-1H-pirazol-4-il)-5-isobutilimidazolidin-2,4-diona</p>	0,912
10-80	 <p>3-(1-((3,5-dimetilisoxazol-4-il)metil)-1H-pirazol-4-il)-1-(2-(naftalen-1-il)etil)imidazolidin-2,4-diona</p>	0,927
10-57	 <p>5-(ciclohexilmetil)-3-(1-((3,5-dimetilisoxazol-4-il)metil)-1H-pirazol-4-il)imidazolidin-2,4-diona</p>	0,962
10-51	 <p>3-(1-((3,5-dimetilisoxazol-4-il)metil)-1H-pirazol-4-il)-1-metilimidazolidin-2,4-diona</p>	0,966
10-82	 <p>1-(3-clorofenetil)-3-(1-((3,5-dimetilisoxazol-4-il)metil)-1H-pirazol-4-il)imidazolidin-2,4-diona</p>	0,982
10-45	 <p>3-(1-((3,5-dimetilisoxazol-4-il)metil)-1H-pirazol-4-il)-5-fenilimidazolidin-2,4-diona</p>	0,793
10-72	 <p>3-(1-((3,5-dimetilisoxazol-4-il)metil)-1H-pirazol-4-il)-1-(2-(3,4-dimetil-5-piridinil)etil)imidazolidin-2,4-diona</p>	0,999

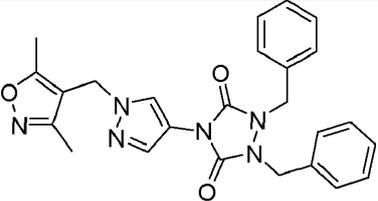
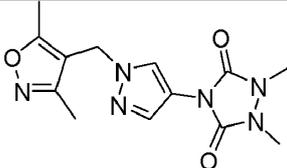
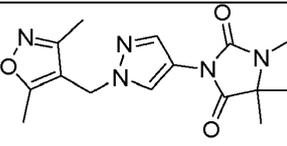
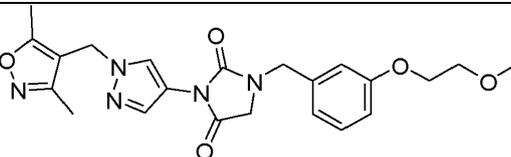
Compuesto nº	Compuesto	IC <sub>50</sub> de hT2R8(µM)
	1-((3,4-dimetoxipiridin-2-il)metil)-3-(1-((3,5-dimetilisoxazol-4-il)metil)-1H-pirazol-4-il)imidazolidin-2,4-diona	
10-25	 <p>3-((3-(1-((3,5-dimetilisoxazol-4-il)metil)-1H-pirazol-4-il)-2,4-dioxoimidazolidin-1-il)metil)benzonitrilo</p>	1,003
10-37	 <p>1-(3-((dimetilamino)metil)encil)-3-(1-((3,5-dimetilisoxazol-4-il)metil)-1H-pirazol-4-il)imidazolidin-2,4-diona</p>	1,220
10-41	 <p>3-(1-((3,5-dimetilisoxazol-4-il)metil)-1H-pirazol-4-il)-5-metilimidazolidin-2,4-diona</p>	1,285
10-49	 <p>N-bencil-2-(1-(1-((3,5-dimetilisoxazol-4-il)metil)-1H-pirazol-4-il)-2,5-dioxoimidazolidin-4-il)acetamida</p>	1,329
10-73	 <p>3-(1-((3,5-dimetilisoxazol-4-il)metil)-1H-pirazol-4-il)-1-((tetrahidrofuran-2-il)metil)imidazolidin-2,4-diona</p>	1,362
10-62	 <p>3-(1-((3,5-dimetilisoxazol-4-il)metil)-1H-pirazol-4-il)-5-isopropilimidazolidin-2,4-diona</p>	1,440

Compuesto nº	Compuesto	IC <sub>50</sub> de hT2R8(µM)
10-1	 <p>3-(1-((3,5-dimetilisoxazol-4-il)metil)-1H-pirazol-4-il)imidazolidin-2,4-diona</p>	1,696
10-50	 <p>2-(1-(1-((3,5-dimetilisoxazol-4-il)metil)-1H-pirazol-4-il)-2,5-dioxoimidazolidin-4-il)-N-(3-metoxibencil)acetamida</p>	1,773
10-8	 <p>Ácido 3-((3-(1-((3,5-dimetilisoxazol-4-il)metil)-1H-pirazol-4-il)-2,4-dioxoimidazolidin-1-il)metil)benzoico</p>	1,798
9-5	 <p>1-bencil-3-(1-((3,5-dimetilisoxazol-4-il)metil)-1H-pirazol-4-il)imidazolidin-2,4,5-triona</p>	2,493
10-29	 <p>3-(1-((3,5-dimetilisoxazol-4-il)metil)-1H-pirazol-4-il)-1-(4-metoxibencil)imidazolidin-2,4-diona</p>	3,117
10-63	 <p>(E)-5-benciliden-3-(1-((3,5-dimetilisoxazol-4-il)metil)-1H-pirazol-4-il)imidazolidin-2,4-diona</p>	

Compuesto nº	Compuesto	IC <sub>50</sub> de hT2R8(µM)
10-67	 <p>4-(1-((3,5-dimetilisoxazol-4-il)metil)-1H-pirazol-4-il)-1-metil-2-(2-fenoxietil)-1,2,4-triazolidin-3,5-diona</p>	
10-97	 <p>3-(1-((3,5-dimetilisoxazol-4-il)metil)-1H-pirazol-4-il)-5-(hidroximetil)imidazolidin-2,4-diona</p>	
9-8	 <p>1-(1-((3,5-dimetilisoxazol-4-il)metil)-1H-pirazol-4-il)-3-fenetil-1,3,5-triazinan-2,4,6-triona</p>	6,151
9-7	 <p>5-bencil-1-(1-((3,5-dimetilisoxazol-4-il)metil)-1H-pirazol-4-il)-3-fenetil-1,3,5-triazinan-2-ona</p>	6,580
9-9	 <p>1-bencil-3-(1-((3,5-dimetilisoxazol-4-il)metil)-1H-pirazol-4-il)-1,3,5-triazinan-2,4,6-triona</p>	1,562
10-88	 <p>1-bencil-3-(1-((3,5-dimetilisoxazol-4-il)metil)-1H-pirazol-4-il)imidazolidin-2-ona</p>	1,250

ES 2 545 121 T3

Compuesto nº	Compuesto	IC <sub>50</sub> de hT2R8(µM)
9-5	 <p>1-bencil-3-(1-((3,5-dimetilisoxazol-4-il)metil)-1H-pirazol-4-il)tetrahidropirimidin-2(1H)-ona</p>	3,434
9-6	 <p>1-bencil-3-(1-((3,5-dimetilisoxazol-4-il)metil)-1H-pirazol-4-il)-1,3,5-triazinan-2-ona</p>	6,029
10-68	 <p>4-(1-((3,5-dimetilisoxazol-4-il)metil)-1H-pirazol-4-il)-1,2,4-triazolidin-3,5-diona</p>	
10-45	 <p>3-(1-((3,5-dimetilisoxazol-4-il)metil)-1H-pirazol-4-il)-5-fenilimidazolidin-2,4-diona</p>	0,793
10-44	 <p>Ácido 2-(1-(1-((3,5-dimetilisoxazol-4-il)metil)-1H-pirazol-4-il)-2,5-dioximidazolidin-4-il)acético</p>	
10-65	 <p>1-bencil-4-(1-((3,5-dimetilisoxazol-4-il)metil)-1H-pirazol-4-il)-2-metil-1,2,4-triazolidin-3,5-diona</p>	0,019

Compuesto nº	Compuesto	IC <sub>50</sub> de hT2R8(µM)
10-70	 <p>1,2-dibencil-4-(1-((3,5-dimetilisoxazol-4-il)metil)-1H-pirazol-4-il)-1,2,4-triazolidin-3,5-diona</p>	1,799
10-69	 <p>4-(1-((3,5-dimetilisoxazol-4-il)metil)-1H-pirazol-4-il)-1,2-dimetil-1,2,4-triazolidin-3,5-diona</p>	0,707
10-52	 <p>3-(1-((3,5-dimetilisoxazol-4-il)metil)-1H-pirazol-4-il)-1,5,5-trimetilimidazolidin-2,4-diona</p>	0,810
10-14	 <p>3-(1-((3,5-dimetilisoxazol-4-il)metil)-1H-pirazol-4-il)-1-(3-(2-metoxietoxi)bencil)imidazolidin-2,4-diona</p>	0,071

**Ejemplo 11. hT2R8 contribuye al amargor de la sacarina para personas con versiones “no catadoras” de los genes hT2R43 y hT2R44**

La FIG. 6 muestra las relaciones de respuesta frente a la dosis y los efectos de la sacarina sobre las actividades del receptor en células transfectadas que expresan variantes de hT2R43, hT2R44 y hT2R8. hT2R8 es menos sensible a sacarina en el ensayo in vitro que los alelos hT2R43-W35 y hT2R44-W35 “catadores”, pero responde mejor que los alelos hT2R43-S35 y hT2R44-R35 “no catadores”. Pronin et al., Curr Biol. 17: 1403-8 (2007). Basándose en el análisis de genotipaje, se seleccionaron cinco individuos con los alelos “catadores” (hT2R43-W35 y/o hT2R44-W35) y cinco con los alelos “no catadores” (hT2R43-S35 y hT2R44-R35). Cada sujeto se presentó con 6 pares de soluciones y se le pidió que determinase cuál de las muestras en un par tenía un sabor más amargo. El resultado mostrado en la Tabla 8, más abajo, muestra que el bloqueador de hT2R8 Comp. D reduce el sabor amargo de sacarina para personas con los alelos “no catadores” de hT2R43 y hT2R44, pero no tuvo ningún efecto sobre personas con los alelos “catadores” de esos genes.

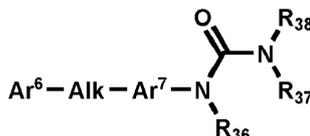
Tabla 8: Resultados de las pruebas de sabor

Prueba de sabor	Agonista amargo	Grupo de genotipo	Seleccionado como más amargo		Valor de P
			sin	+ Comp. D	
1	sacarina	hT2R43-W35 y/o hT2R44-W35	13	17	0,82

2	sacarina	hT2R43-S35 y hT2R44-R35	27	3	<0,001
---	----------	-------------------------	----	---	--------

Otros compuestos ejemplares proporcionados por la presente solicitud y/o adecuados para ser utilizados para métodos de la presente invención incluyen compuestos de las siguientes fórmulas.

En un primer aspecto, la solicitud se refiere a un compuesto de la fórmula:



- 5 o una sal, hidrato, solvato, N-óxido o profármaco del mismo,  
 en la que  $\text{Ar}^6$  y  $\text{Ar}^7$  son, iguales o diferentes independientemente entre sí, un grupo arilo de cinco o seis miembros o un grupo heteroarilo de cinco o seis miembros;

Alk es un grupo alquilo, opcionalmente interrumpido por un heteroátomo;

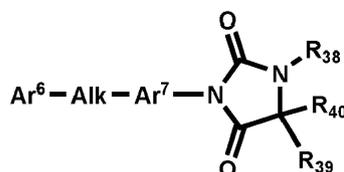
- 10  $\text{R}_{36}$  y  $\text{R}_{37}$  son, iguales o diferentes independientemente entre sí, H, alquilo, o,  $\text{R}_{36}$  y  $\text{R}_{37}$ , junto con los átomos a los que están unidos, forman un heterociclo de cinco o seis miembros opcionalmente sustituido; y

- 15  $\text{R}_{38}$  es H, alquilo sustituido o no sustituido, cicloalquilalquilo sustituido o no sustituido, heterocicloalquilalquilo sustituido o no sustituido, arilo sustituido o no sustituido, arilamidoalquilo sustituido o no sustituido, heteroarilamidoalquilo sustituido o no sustituido, arilalquilo sustituido o no sustituido, arilalcoxi sustituido o no sustituido, heteroarilo sustituido o no sustituido, heteroarilalquilo sustituido o no sustituido, o haloalquilo.

En un aspecto, los compuestos de la solicitud contienen un heterociclo de cinco miembros.

En una realización, el heterociclo de cinco miembros es una hidantoína o una urea cíclica sustituida o no sustituida.

En una realización, la hidantoína es una hidantoína de la fórmula:



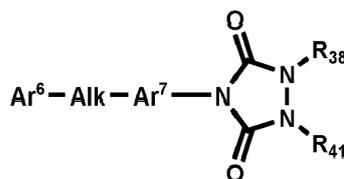
- 20 o una sal, hidrato, solvato, N-óxido o profármaco de la misma,  
 en la que  $\text{Ar}^6$  y  $\text{Ar}^7$  son, iguales o diferentes independientemente entre sí, un grupo arilo de cinco o seis miembros o un grupo heteroarilo de cinco o seis miembros;

Alk es un grupo alquilo, opcionalmente interrumpido por un heteroátomo;

- 25  $\text{R}_{38}$  es H, alquilo sustituido o no sustituido, cicloalquilalquilo sustituido o no sustituido, heterocicloalquilalquilo sustituido o no sustituido, arilo sustituido o no sustituido, arilamidoalquilo sustituido o no sustituido, heteroarilamidoalquilo sustituido o no sustituido, arilalquilo sustituido o no sustituido, arilalcoxi sustituido o no sustituido, heteroarilo sustituido o no sustituido, heteroarilalquilo sustituido o no sustituido, o haloalquilo; y

- 30  $\text{R}_{39}$  y  $\text{R}_{40}$  son, iguales o diferentes independientemente entre sí, H, alquilo sustituido o no sustituido, cicloalquilalquilo sustituido o no sustituido, heterocicloalquilalquilo sustituido o no sustituido, arilo sustituido o no sustituido, arilamidoalquilo sustituido o no sustituido, arilalquilamidoalquilo sustituido o no sustituido, heteroarilamidoalquilo sustituido o no sustituido, heteroarilalquilamidoalquilo sustituido o no sustituido, arilalquilo sustituido o no sustituido, arilalcoxi sustituido o no sustituido, heteroarilo sustituido o no sustituido, heteroarilalquilo sustituido o no sustituido, haloalquilo, o  $\text{R}_{39}$  y  $\text{R}_{40}$ , junto con el átomo de carbono al que están unidos, forman un grupo C=O o un grupo alquenilo sustituido o no sustituido.

- 35 En otro aspecto, los compuestos de la solicitud contienen un heterociclo de cinco miembros que es un urazol. En una realización, el urazol es un urazol de la fórmula:



o una sal, hidrato, solvato, N-óxido o profármaco del mismo,

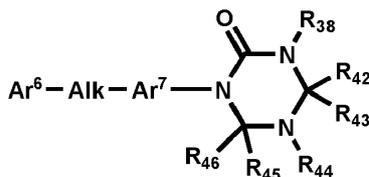
en la que  $Ar^6$  y  $Ar^7$  son, iguales o diferentes independientemente entre sí, un grupo arilo de cinco o seis miembros o un grupo heteroarilo de cinco o seis miembros;

- 5 Alk es un grupo alquilo, opcionalmente interrumpido por un heteroátomo;

$R_{38}$  es H, alquilo sustituido o no sustituido, cicloalquilalquilo sustituido o no sustituido, heterocicloalquilalquilo sustituido o no sustituido, arilo sustituido o no sustituido, arilamidoalquilo sustituido o no sustituido, heteroarilamidoalquilo sustituido o no sustituido, arilalquilo sustituido o no sustituido, arilalcoxi sustituido o no sustituido, heteroarilo sustituido o no sustituido, heteroarilalquilo sustituido o no sustituido, o haloalquilo; y

- 10  $R_{41}$  es H, alquilo sustituido o no sustituido, cicloalquilalquilo sustituido o no sustituido, heterocicloalquilalquilo sustituido o no sustituido, arilo sustituido o no sustituido, arilamidoalquilo sustituido o no sustituido, arilalquilamidoalquilo sustituido o no sustituido, heteroarilamidoalquilo sustituido o no sustituido, heteroarilalquilamidoalquilo sustituido o no sustituido, arilalquilo sustituido o no sustituido, arilalcoxi sustituido o no sustituido, heteroarilo sustituido o no sustituido, heteroarilalquilo sustituido o no sustituido, o haloalquilo.

- 15 En otro aspecto, los compuestos de la solicitud contienen un heterociclo de seis miembros. En una realización, el heterociclo de seis miembros es un heterociclo de seis miembros de la fórmula:

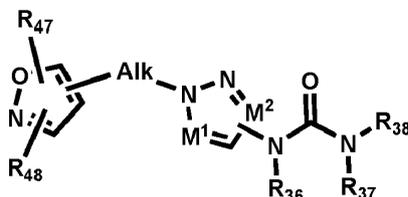


o una sal, hidrato, solvato, N-óxido o profármaco del mismo,

- 20 en la que  $R_{38}$  es H, alquilo sustituido o no sustituido, cicloalquilalquilo sustituido o no sustituido, heterocicloalquilalquilo sustituido o no sustituido, arilo sustituido o no sustituido, arilamidoalquilo sustituido o no sustituido, heteroarilamidoalquilo sustituido o no sustituido, arilalquilo sustituido o no sustituido, arilalcoxi sustituido o no sustituido, heteroarilo sustituido o no sustituido, heteroarilalquilo sustituido o no sustituido, o haloalquilo; y

- 25  $R_{42}$ ,  $R_{43}$ ,  $R_{44}$ ,  $R_{45}$ , y  $R_{46}$  son, iguales o diferentes independientemente entre sí, H, alquilo sustituido o no sustituido, cicloalquilalquilo sustituido o no sustituido, arilalquilo sustituido o no sustituido, arilalcoxi sustituido o no sustituido, heteroarilo sustituido o no sustituido, heteroarilalquilo sustituido o no sustituido, o  $R_{42}$  y  $R_{43}$ , o  $R_{45}$  y  $R_{46}$ , junto con los átomos de carbono a los que están unidos, forman un grupo C=O.

En aún otro aspecto, la invención se refiere a un compuesto de la fórmula:



o una sal o N-óxido del mismo, en la que Alk es un grupo alquilo;

- 30  $M^1$  es N o  $CR_{49}$ , en el que  $R_{49}$  es H o alquilo sustituido o no sustituido;

$M^2$  es N o  $CR_{50}$ , en el que  $R_{50}$  es H o alquilo sustituido o no sustituido;

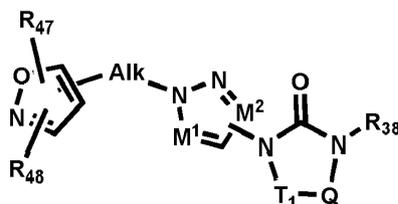
$R_{36}$  y  $R_{37}$ , junto con los átomos a los que están unidos, forman un heterociclo de cinco o seis miembros opcionalmente sustituido; y

- 35  $R_{38}$  es H, alquilo sustituido o no sustituido, cicloalquilalquilo sustituido o no sustituido, heterocicloalquilalquilo sustituido o no sustituido, arilo sustituido o no sustituido, arilamidoalquilo sustituido o no sustituido,

heteroarilamidoalquilo sustituido o no sustituido, arilalquilo sustituido o no sustituido, arilalcoxi sustituido o no sustituido, heteroarilo sustituido o no sustituido, heteroarilalquilo sustituido o no sustituido, o haloalquilo;

5  $R_{47}$  es H, alquilo sustituido o no sustituido, alcoxi sustituido o no sustituido, arilo sustituido o no sustituido, arilalquilo sustituido o no sustituido, o halo; y  $R_{48}$  es H, alquilo sustituido o no sustituido, alcoxi sustituido o no sustituido, arilo sustituido o no sustituido, arilalquilo sustituido o no sustituido, o halo.

En aún otro aspecto, la invención se refiere a un compuesto de la fórmula:



o una sal o N-óxido del mismo,

en la que Alk es un grupo alquilo;

10  $T_1$  es C=O y Q es  $CR_{51}R_{52}$  o  $NR_{51}$ , en los que  $R_{51}$  y  $R_{52}$  son, iguales o diferentes independientemente entre sí, H, alquilo sustituido o no sustituido, cicloalquilalquilo sustituido o no sustituido, heterocicloalquilalquilo sustituido o no sustituido, arilo sustituido o no sustituido, arilamidoalquilo sustituido o no sustituido, arilalquilamidoalquilo sustituido o no sustituido, heteroarilamidoalquilo sustituido o no sustituido, heteroarilalquilamidoalquilo sustituido o no sustituido, arilalquilo sustituido o no sustituido, arilalcoxi sustituido o no sustituido, heteroarilo sustituido o no sustituido, heteroarilalquilo sustituido o no sustituido, haloalquilo, o  $R_{51}$  y  $R_{52}$ , junto con el átomo de carbono al que están unidos, forman un grupo C=O o un grupo alqueno sustituido o no sustituido;

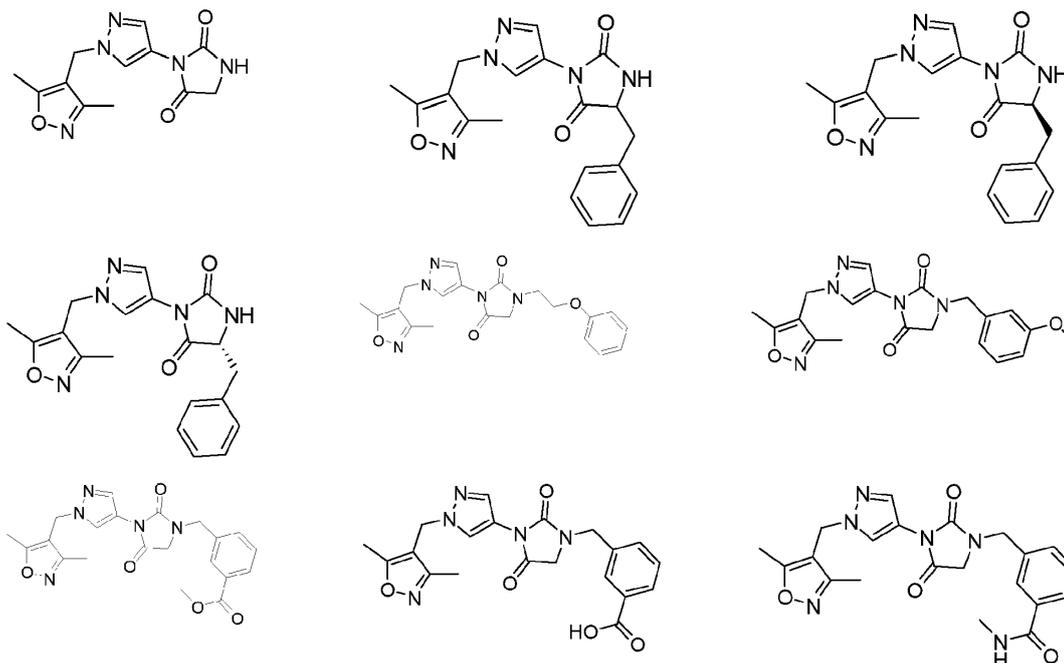
$M^1$  es N o  $CR_{49}$ , en el que  $R_{49}$  es H o alquilo sustituido o no sustituido;

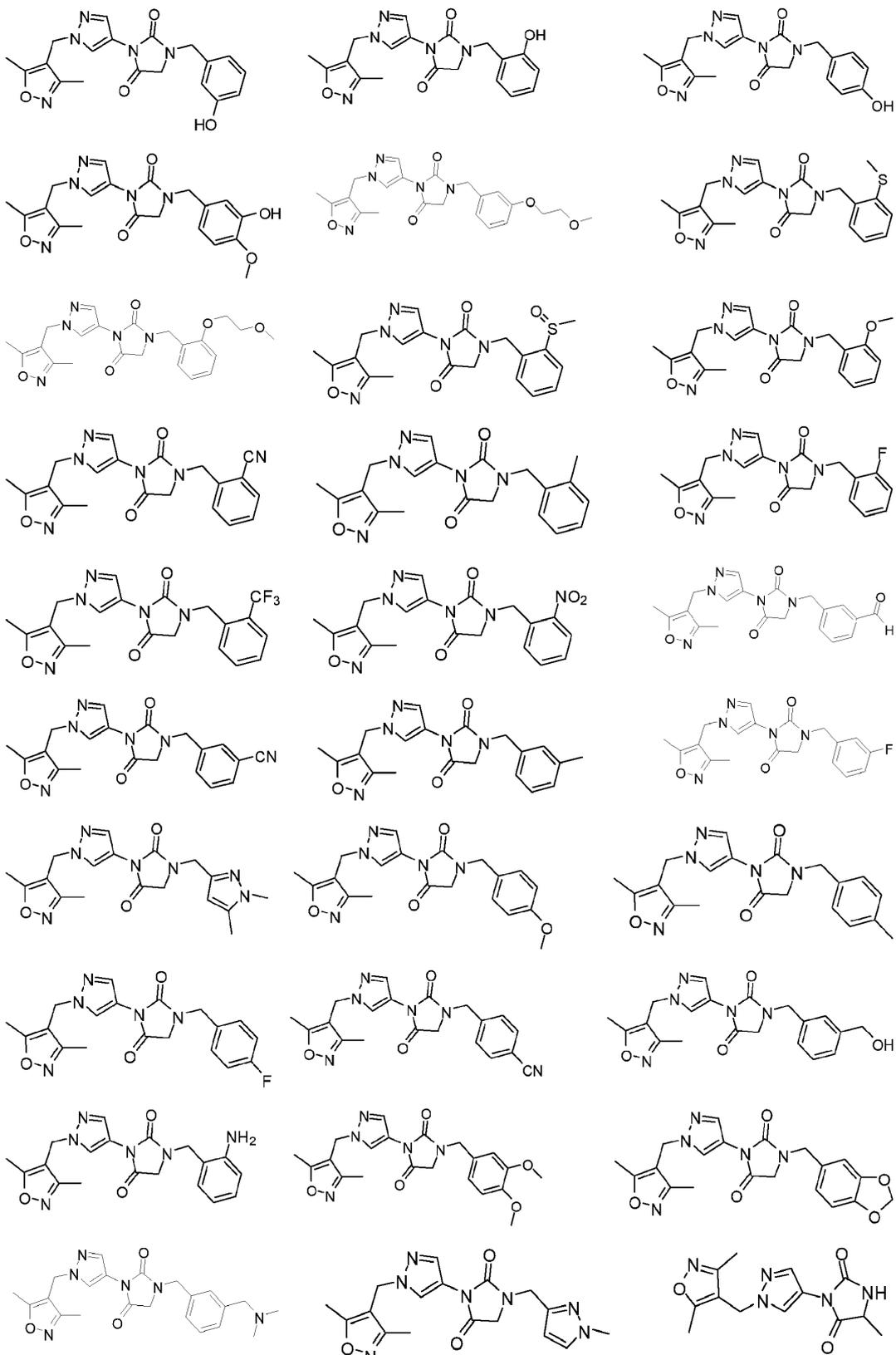
$M^2$  es N o  $CR_{50}$ , en el que  $R_{50}$  es H o alquilo sustituido o no sustituido;

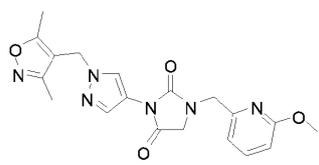
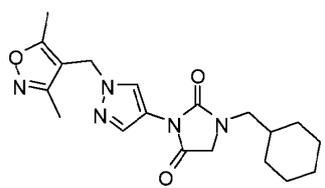
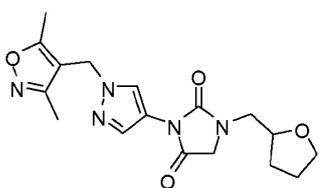
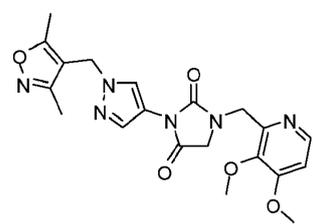
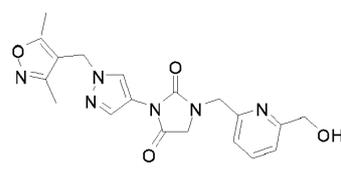
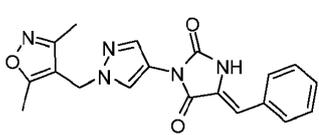
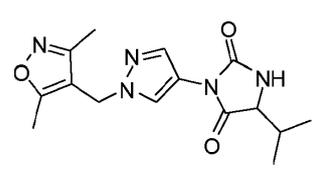
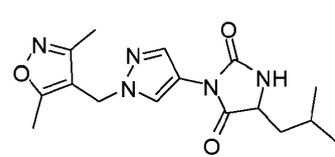
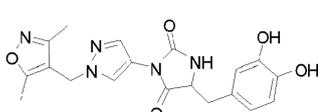
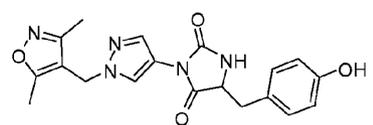
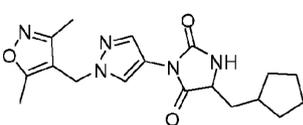
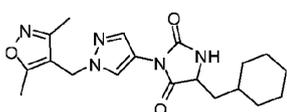
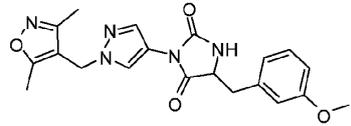
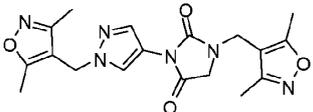
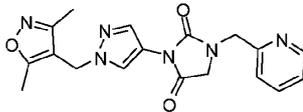
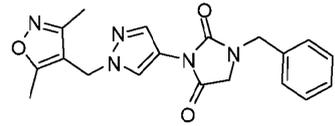
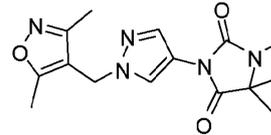
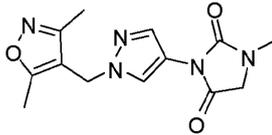
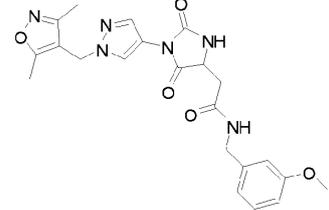
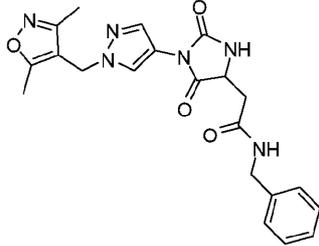
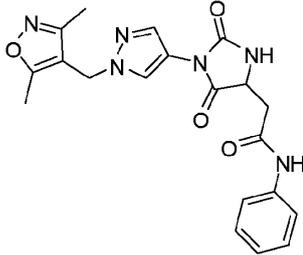
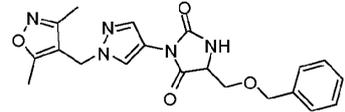
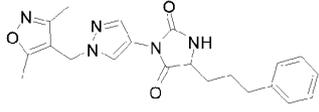
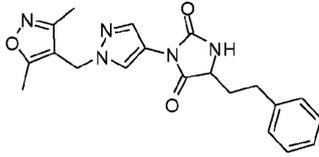
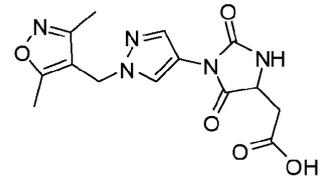
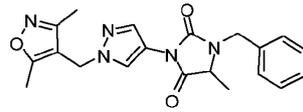
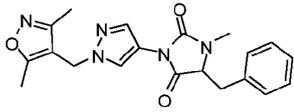
20  $R_{38}$  es H, alquilo sustituido o no sustituido, cicloalquilalquilo sustituido o no sustituido, heterocicloalquilalquilo sustituido o no sustituido, arilo sustituido o no sustituido, arilamidoalquilo sustituido o no sustituido, heteroarilamidoalquilo sustituido o no sustituido, arilalquilo sustituido o no sustituido, arilalcoxi sustituido o no sustituido, heteroarilo sustituido o no sustituido, heteroarilalquilo sustituido o no sustituido, o haloalquilo;

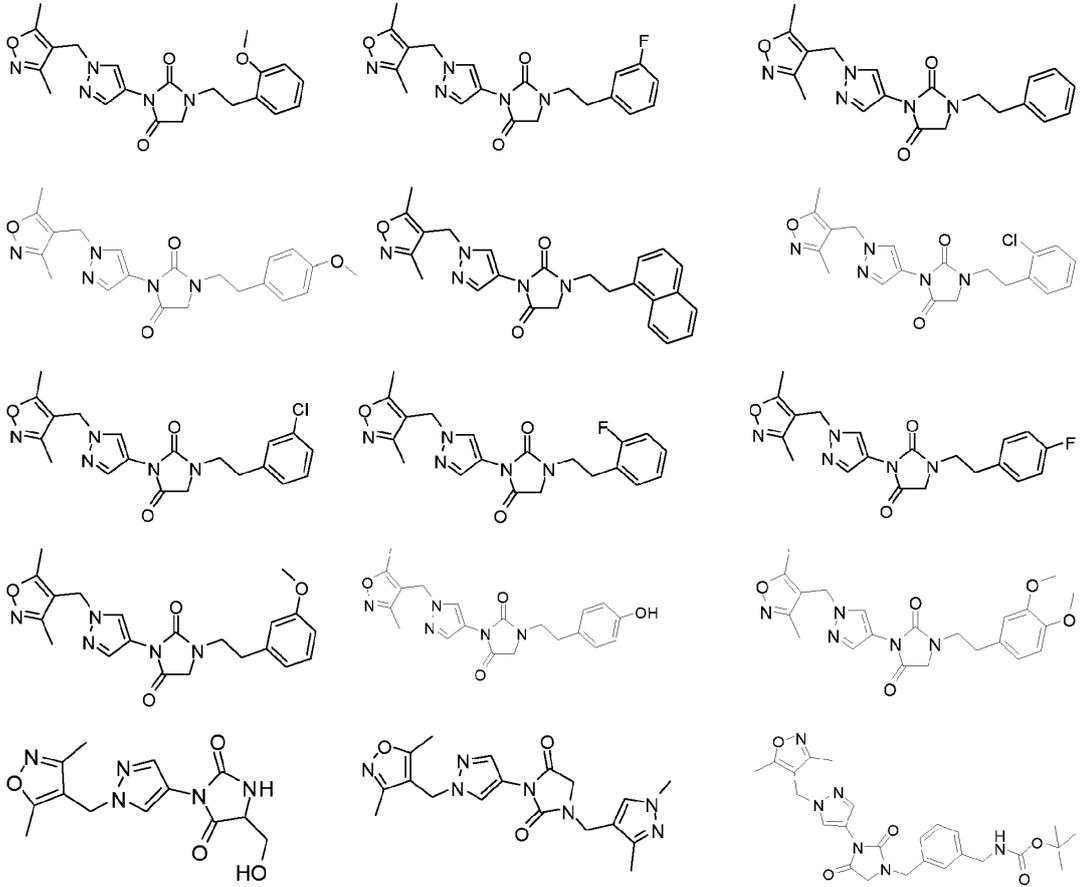
25  $R_{47}$  es H, alquilo sustituido o no sustituido, alcoxi sustituido o no sustituido, arilo sustituido o no sustituido, arilalquilo sustituido o no sustituido, o halo; y  $R_{48}$  es H, alquilo sustituido o no sustituido, alcoxi sustituido o no sustituido, arilo sustituido o no sustituido, arilalquilo sustituido o no sustituido, o halo.

En aún otro aspecto, la invención se refiere a un compuesto de la fórmula:





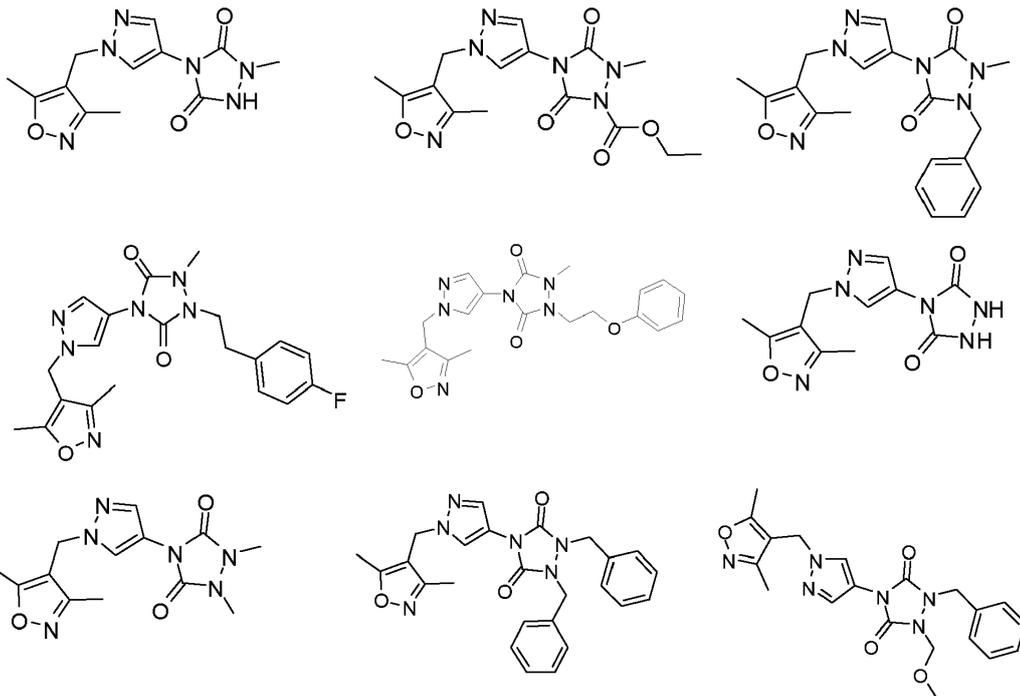




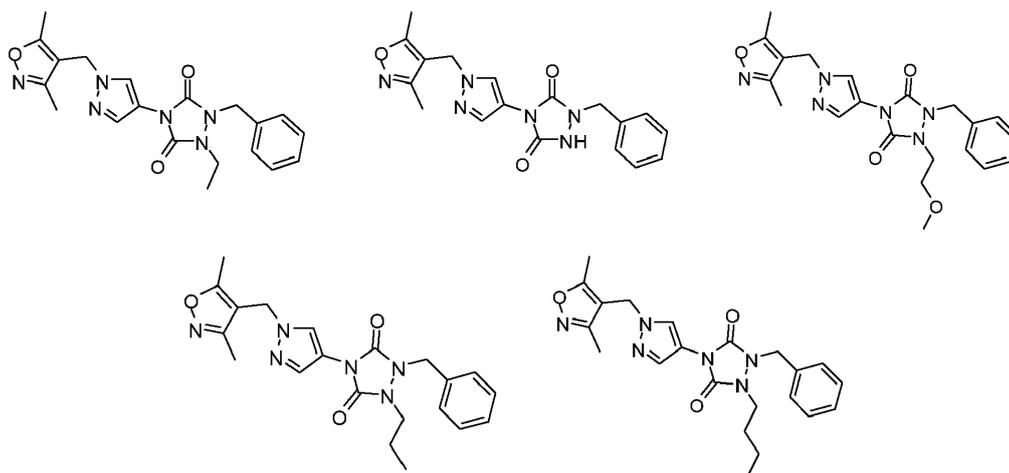
5

o una sal o N-óxido del mismo.

En aún otro aspecto, la invención se refiere a un compuesto de la fórmula:



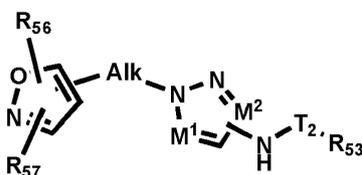
10



o una sal o N-óxido del mismo.

En aún otro aspecto, la solicitud se refiere a un método para obtener un compuesto de la fórmula:

5



o una sal, hidrato, solvato, N-óxido o profármaco del mismo,

en la que Alk es un grupo alquilo, opcionalmente interrumpido por un heteroátomo;

T<sub>2</sub> es C=S, C=O, o S(O)<sub>2</sub>;

10

R<sub>53</sub> es alquilo sustituido o no sustituido, cicloalquilo sustituido o no sustituido, heteroarilo sustituido o no sustituido, arilo sustituido o no sustituido, o aralquilo sustituido o no sustituido;

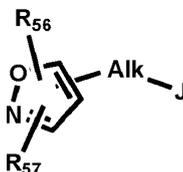
M<sup>1</sup> es N o CR<sub>54</sub>, en el que R<sub>54</sub> es H o alquilo sustituido o no sustituido;

M<sup>2</sup> es N o CR<sub>55</sub>, en el que R<sub>55</sub> es H o alquilo sustituido o no sustituido;

R<sub>56</sub> es H, alquilo sustituido o no sustituido, alcoxi sustituido o no sustituido, arilo sustituido o no sustituido, arilalquilo sustituido o no sustituido, o halo; y

15

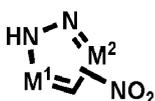
R<sub>57</sub> es H, alquilo sustituido o no sustituido, alcoxi sustituido o no sustituido, arilo sustituido o no sustituido, arilalquilo sustituido o no sustituido, o halo; en el que el método comprende hacer reaccionar un compuesto de la fórmula:



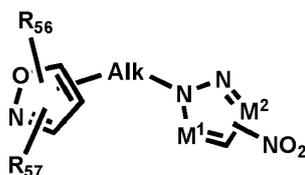
en la que R<sub>56</sub>, R<sub>57</sub>, y Alk se definen anteriormente y J es un grupo saliente;

con un compuesto de la fórmula:

20



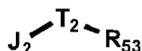
en la que M<sup>1</sup> y M<sup>2</sup> se definen anteriormente, para dar un compuesto de la fórmula



que tiene un grupo NO<sub>2</sub>;

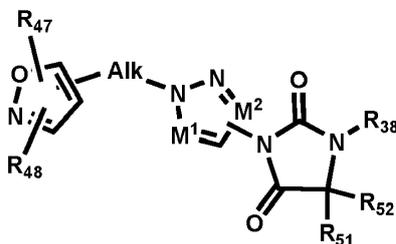
reducir el grupo NO<sub>2</sub> para dar un compuesto que tiene un grupo NH<sub>2</sub>; y hacer reaccionar el compuesto que tiene un grupo NH<sub>2</sub> con un compuesto de la fórmula

5



en la que J<sub>2</sub> es un grupo saliente y T<sub>2</sub> y R<sub>53</sub> se definen anteriormente.

En aún otro aspecto, la invención se refiere a un método para obtener un compuesto de la fórmula A:



o una sal, hidrato, solvato, N-óxido o profármaco del mismo,

10 en la que Alk es un grupo alquilo, opcionalmente interrumpido por un heteroátomo;

R<sub>51</sub> y R<sub>52</sub> son, iguales o diferentes independientemente entre sí, H, alquilo sustituido o no sustituido, cicloalquilalquilo sustituido o no sustituido, heterocicloalquilalquilo sustituido o no sustituido, arilo sustituido o no sustituido, arilamidoalquilo sustituido o no sustituido, arilalquilamidoalquilo sustituido o no sustituido, heteroarilamidoalquilo sustituido o no sustituido, heteroarilalquilamidoalquilo sustituido o no sustituido, arilalquilo sustituido o no sustituido, arilalcoxi sustituido o no sustituido, heteroarilo sustituido o no sustituido, heteroarilalquilo sustituido o no sustituido, haloalquilo, o R<sub>51</sub> y R<sub>52</sub>, junto con el átomo de carbono al que están unidos, forman un grupo alquenilo sustituido o no sustituido;

15

M<sup>1</sup> es N o CR<sub>49</sub>, en el que R<sub>49</sub> es H o alquilo sustituido o no sustituido;

M<sup>2</sup> es N o CR<sub>50</sub>, en el que R<sub>50</sub> es H o alquilo sustituido o no sustituido;

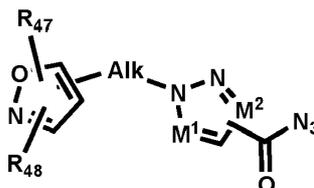
20

R<sub>38</sub> es H, alquilo sustituido o no sustituido, cicloalquilalquilo sustituido o no sustituido, heterocicloalquilalquilo sustituido o no sustituido, arilo sustituido o no sustituido, arilamidoalquilo sustituido o no sustituido, heteroarilamidoalquilo sustituido o no sustituido, arilalquilo sustituido o no sustituido, arilalcoxi sustituido o no sustituido, heteroarilo sustituido o no sustituido, heteroarilalquilo sustituido o no sustituido, o haloalquilo;

25

R<sub>47</sub> es H, alquilo sustituido o no sustituido, alcoxi sustituido o no sustituido, arilo sustituido o no sustituido, arilalquilo sustituido o no sustituido, o halo; y R<sub>48</sub> es H, alquilo sustituido o no sustituido, alcoxi sustituido o no sustituido, arilo sustituido o no sustituido, arilalquilo sustituido o no sustituido, o halo;

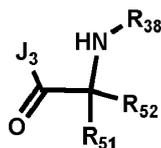
en el que el método comprende calentar un compuesto de la fórmula B:



en la que R<sub>47</sub>, R<sub>48</sub>, Alk, M<sup>1</sup>, y M<sup>2</sup> se definen anteriormente;

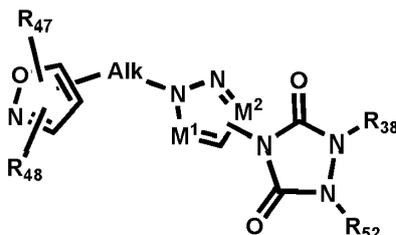
30

para convertir el grupo -CON<sub>3</sub> en un grupo -N=C=O, y entonces hacer reaccionar con un compuesto de la fórmula D:



en la que  $J_3$  es un grupo saliente y  $R_{38}$ ,  $R_{51}$ , y  $R_{52}$  se definen anteriormente.

En aún otro aspecto, la solicitud se refiere a un método para obtener un compuesto de la fórmula:



5 o una sal, hidrato, solvato, N-óxido o profármaco del mismo,

en la que Alk es un grupo alquilo, opcionalmente interrumpido por un heteroátomo;

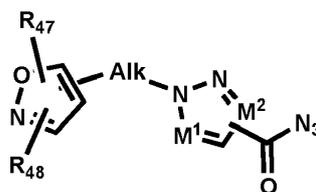
$R_{52}$  es H, alquilo sustituido o no sustituido, cicloalquilalquilo sustituido o no sustituido, heterocicloalquilalquilo sustituido o no sustituido, arilo sustituido o no sustituido, arilamidoalquilo sustituido o no sustituido, arilalquilamidoalquilo sustituido o no sustituido, heteroarilamidoalquilo sustituido o no sustituido, heteroarilalquilamidoalquilo sustituido o no sustituido, arilalquilo sustituido o no sustituido, arilalcoxi sustituido o no sustituido, heteroarilo sustituido o no sustituido, heteroarilalquilo sustituido o no sustituido, haloalquilo;

$M^1$  es N o  $CR_{49}$ , en el que  $R_{49}$  es H o alquilo sustituido o no sustituido;

$M^2$  es N o  $CR_{50}$ , en el que  $R_{50}$  es H o alquilo sustituido o no sustituido;

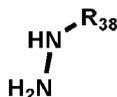
$R_{38}$  es H, alquilo sustituido o no sustituido, cicloalquilalquilo sustituido o no sustituido, heterocicloalquilalquilo sustituido o no sustituido, arilo sustituido o no sustituido, arilamidoalquilo sustituido o no sustituido, heteroarilamidoalquilo sustituido o no sustituido, arilalquilo sustituido o no sustituido, arilalcoxi sustituido o no sustituido, heteroarilo sustituido o no sustituido, heteroarilalquilo sustituido o no sustituido, o haloalquilo;

$R_{47}$  es H, alquilo sustituido o no sustituido, alcoxi sustituido o no sustituido, arilo sustituido o no sustituido, arilalquilo sustituido o no sustituido, o halo; y  $R_{48}$  es H, alquilo sustituido o no sustituido, alcoxi sustituido o no sustituido, arilo sustituido o no sustituido, arilalquilo sustituido o no sustituido, o halo; en el que el método comprende calentar un compuesto de la fórmula:



en la que  $R_{47}$ ,  $R_{48}$ , Alk,  $M^1$ , y  $M^2$  se definen anteriormente;

para convertir el grupo  $-CON_3$  en un grupo  $-N=C=O$ , y entonces hacer reaccionar con una hidrazina de la fórmula:

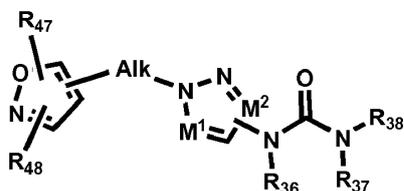


25

en la que  $R_{38}$  se define anteriormente.

REIVINDICACIONES

1. Un compuesto de la fórmula:



o una sal o N-óxido del mismo,

5 en la que Alk es un grupo alquilo;

M<sup>1</sup> es N o CR<sub>49</sub>, en el que R<sub>49</sub> es H o alquilo sustituido o no sustituido;

M<sup>2</sup> es N o CR<sub>50</sub>, en el que R<sub>50</sub> es H o alquilo sustituido o no sustituido;

R<sub>36</sub> y R<sub>37</sub>, junto con los átomos a los que están unidos, forman un heterociclo de cinco o seis miembros opcionalmente sustituido; y

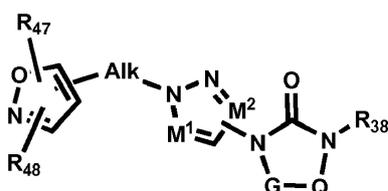
10 R<sub>38</sub> es H, alquilo sustituido o no sustituido, cicloalquilalquilo sustituido o no sustituido, heterocicloalquilalquilo sustituido o no sustituido, arilo sustituido o no sustituido, arilamidoalquilo sustituido o no sustituido, heteroarilamidoalquilo sustituido o no sustituido, arilalquilo sustituido o no sustituido, arilalcoxi sustituido o no sustituido, heteroarilo sustituido o no sustituido, heteroarilalquilo sustituido o no sustituido, o haloalquilo,

15 R<sub>47</sub> es H, alquilo sustituido o no sustituido, alcoxi sustituido o no sustituido, arilo sustituido o no sustituido, arilalquilo sustituido o no sustituido, o halo; y

R<sub>48</sub> es H, alquilo sustituido o no sustituido, alcoxi sustituido o no sustituido, arilo sustituido o no sustituido, arilalquilo sustituido o no sustituido, o halo.

2. El compuesto de la reivindicación 1, en el que el heterociclo de cinco miembros formado por R<sub>36</sub> y R<sub>37</sub> es una hidantoína o o una urea cíclica sustituida o no sustituida, o una sal o N-óxido de la misma.

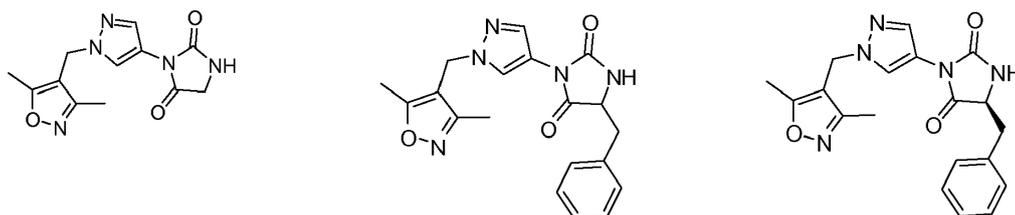
20 3. El compuesto de la reivindicación 1, que tiene la siguiente fórmula:



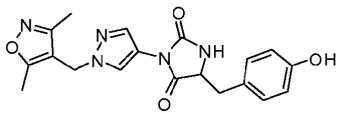
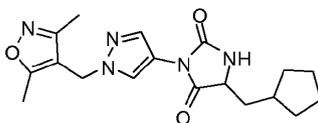
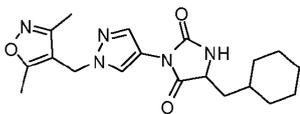
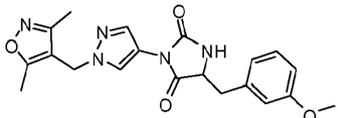
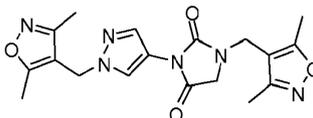
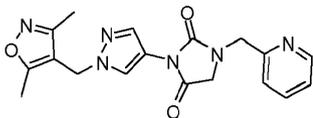
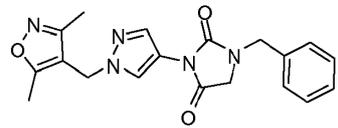
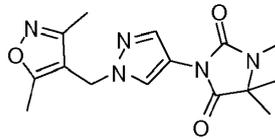
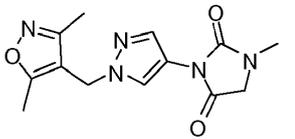
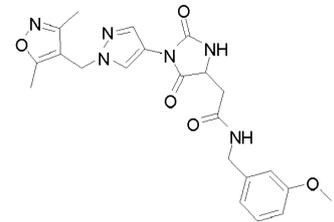
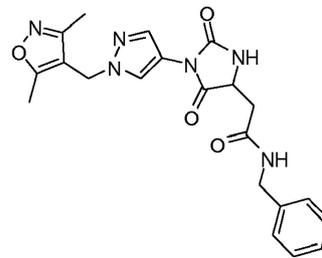
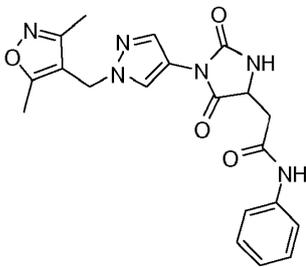
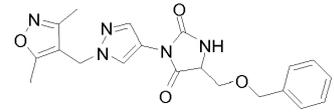
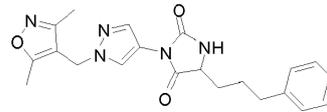
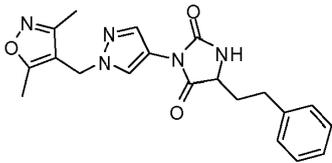
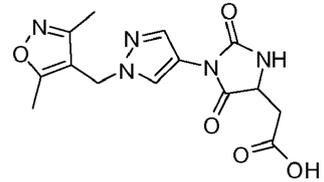
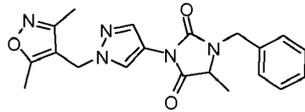
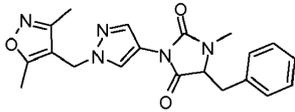
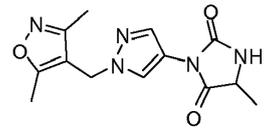
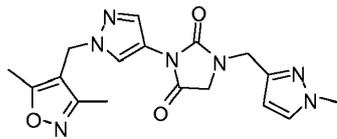
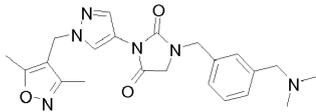
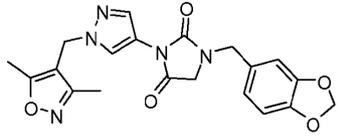
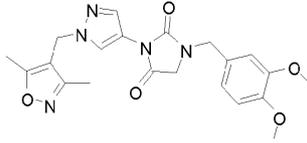
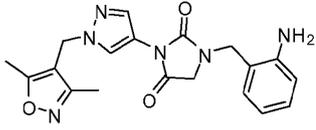
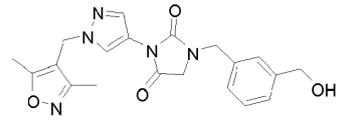
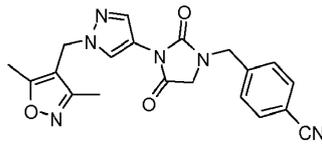
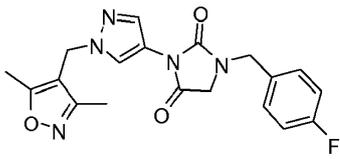
o una sal o N-óxido del mismo,

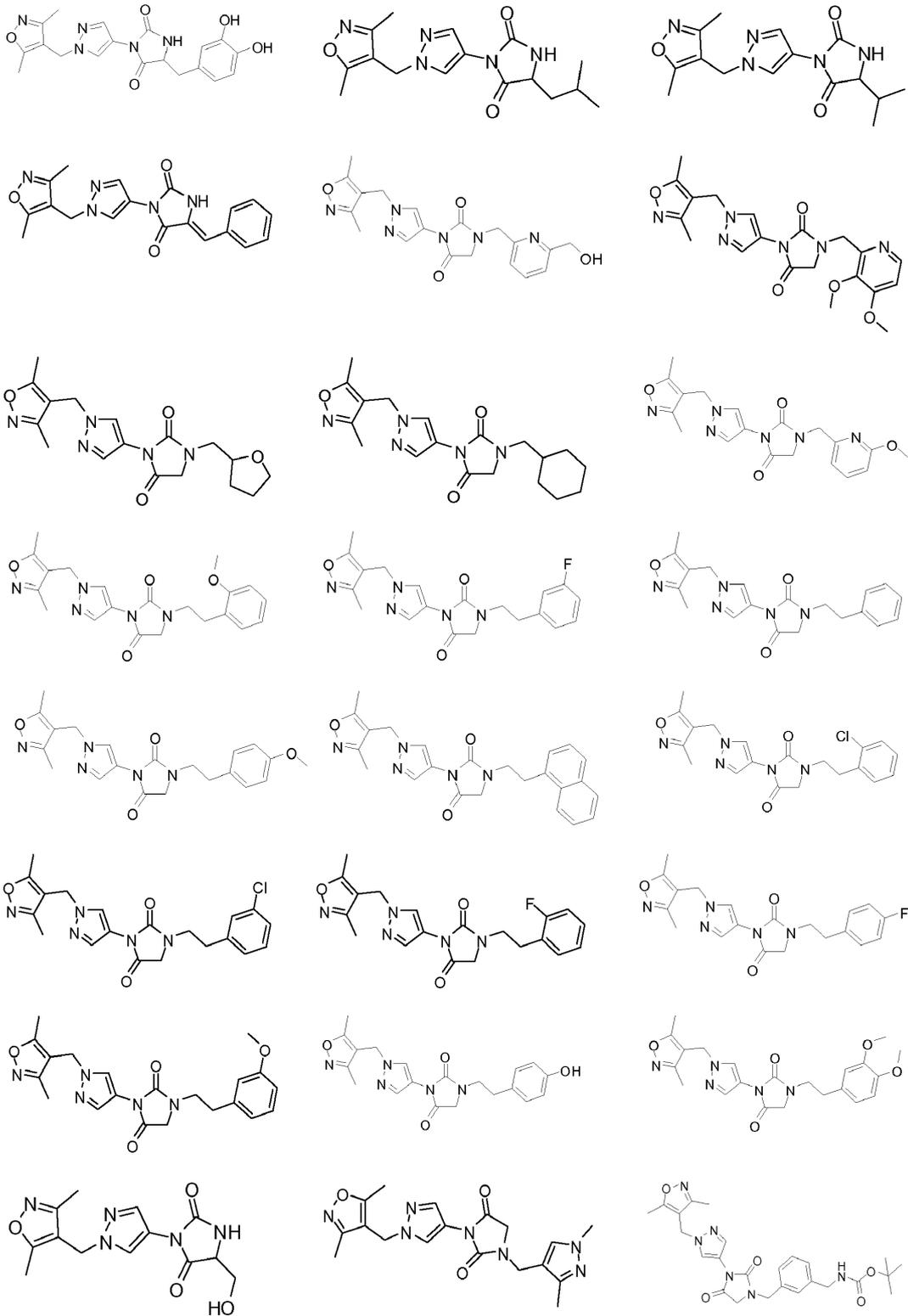
25 G es C=O y Q es CR<sub>51</sub>R<sub>52</sub> o NR<sub>51</sub>, en los que R<sub>51</sub> y R<sub>52</sub> son, iguales o diferentes independientemente entre sí, H, alquilo sustituido o no sustituido, cicloalquilalquilo sustituido o no sustituido, heterocicloalquilalquilo sustituido o no sustituido, arilo sustituido o no sustituido, arilamidoalquilo sustituido o no sustituido, arilalquilamidoalquilo sustituido o no sustituido, heteroarilamidoalquilo sustituido o no sustituido, heteroarilalquilamidoalquilo sustituido o no sustituido, arilalquilo sustituido o no sustituido, arilalcoxi sustituido o no sustituido, heteroarilo sustituido o no sustituido, heteroarilalquilo sustituido o no sustituido, haloalquilo, o R<sub>51</sub> y R<sub>52</sub>, junto con el átomo de carbono al que están unidos, forman un grupo C=O o un grupo alquenoil sustituido o no sustituido.

30 4. El compuesto de una cualquiera de las reivindicaciones 1-3, o una sal o N-óxido del mismo, que tiene la fórmula:

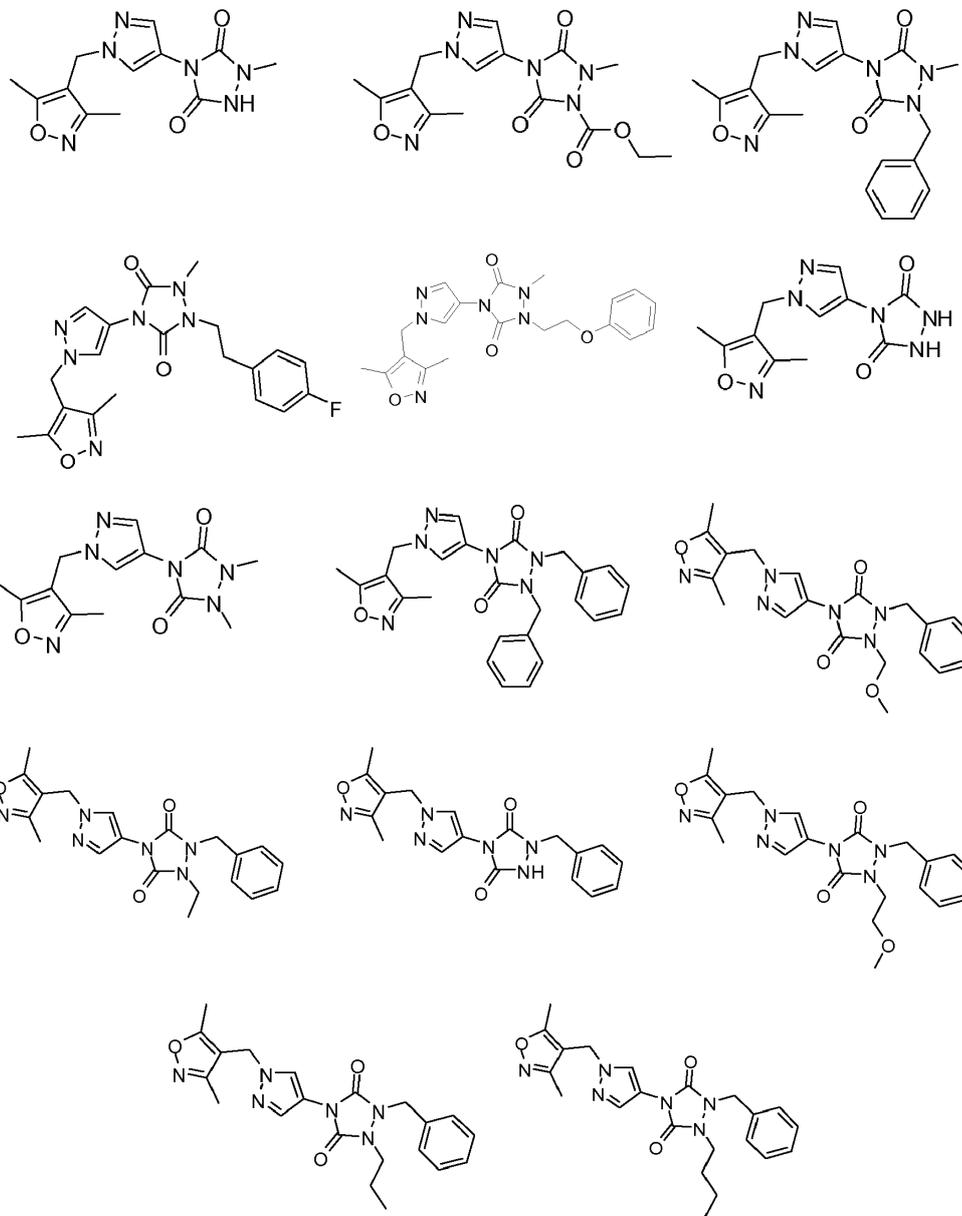






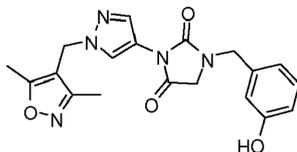


5. El compuesto de una cualquiera de las reivindicaciones 1-3 o una sal o N-óxido del mismo, que tiene la fórmula:



5

6. El compuesto de una cualquiera de las reivindicaciones 1-4 o una sal o N-óxido del mismo, que tiene la fórmula:



10

7. Una composición que comprende uno o más compuestos de una cualquiera de las reivindicaciones 1-6 o una sal o N-óxido de los mismos, y uno o más vehículos farmacéuticamente aceptables.

8. La composición de la reivindicación 7, que es un alimento, bebida o medicamento para consumo humano.

9. Una composición de café o alimentaria o de bebida con sabor a café, o de medicamento, que comprende al menos un compuesto de una cualquiera de las reivindicaciones 1-6 o una sal o N-óxido del mismo.

15

10. Una composición alimentaria, de bebida, o de medicamento que tiene un sabor amargo, en la que dicho sabor amargo se alivia o elimina por la adición de una cantidad eficaz de un compuesto de una cualquiera de las reivindicaciones 1-6 o una sal o N-óxido del mismo.

11. La composición de las reivindicaciones 9 o 10

(a) en la que al menos un compuesto es un antagonista de hT2R8,

(b) en la que dicha bebida es una bebida de café instantáneo, una bebida de café molido, o una bebida de café en polvo, o

5 (c) en la que dicha bebida es una bebida de café instantáneo.

12. Una composición para la ingestión por seres humanos o animales, que comprende uno o más compuestos de una de las reivindicaciones 1-6 o una sal o N-óxido de los mismos.

13. La composición de la reivindicación 12, en la que dicha composición

(a) es un producto alimentario o de bebida; o

10 (b) es un producto no comestible.

14. La composición de la reivindicación 13, en la que

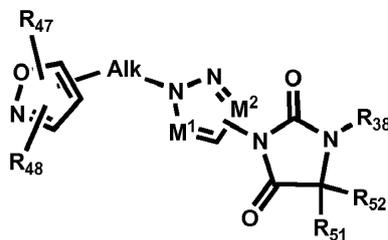
(a) el producto de bebida es una bebida de café lista para beber, soluble y liofilizada, una mezcla de bebidas de café, o un concentrado de bebida de café;

15 (b) el producto de bebida es un sustituto de la nata, un sustituto de la nata no lácteo, o un blanqueador para bebidas de café;

(c) el producto no comestible es un suplemento, un nutracéutico, un producto alimentario funcional, una sustancia farmacéutica, medicación de venta libre, producto para el cuidado bucal, o un producto cosmético; o

(d) el producto no comestible es un producto para el cuidado bucal seleccionado del grupo que consiste en un dentífrico, colutorio, o goma de mascar.

20 15. Método de fabricación de un compuesto de fórmula A:



A

o una sal o N-óxido del mismo,

en la que Alk es un grupo alquilo, opcionalmente interrumpido por un heteroátomo;

25 R<sub>51</sub> y R<sub>52</sub> son, iguales o diferentes independientemente entre sí, H, alquilo sustituido o no sustituido, cicloalquilalquilo sustituido o no sustituido, heterocicloalquilalquilo sustituido o no sustituido, arilo sustituido o no sustituido, arilamidoalquilo sustituido o no sustituido, arilalquilamidoalquilo sustituido o no sustituido, heteroarilamidoalquilo sustituido o no sustituido, heteroarilalquilamidoalquilo sustituido o no sustituido, arilalquilo sustituido o no sustituido, arilalcoxi sustituido o no sustituido, heteroarilo sustituido o no sustituido, heteroarilalquilo sustituido o no sustituido, haloalquilo, o R<sub>51</sub> y R<sub>52</sub>, junto con el átomo de carbono al que están unidos, forman un grupo alquenilo sustituido o no sustituido;

M<sup>1</sup> es N o CR<sub>49</sub>, en el que R<sub>49</sub> es H o alquilo sustituido o no sustituido;

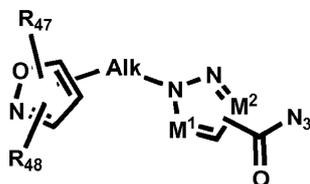
M<sup>2</sup> es N o CR<sub>50</sub>, en el que R<sub>50</sub> es H o alquilo sustituido o no sustituido;

35 R<sub>38</sub> es H, alquilo sustituido o no sustituido, cicloalquilalquilo sustituido o no sustituido, heterocicloalquilalquilo sustituido o no sustituido, arilo sustituido o no sustituido, arilamidoalquilo sustituido o no sustituido, heteroarilamidoalquilo sustituido o no sustituido, arilalquilo sustituido o no sustituido, arilalcoxi sustituido o no sustituido, heteroarilo sustituido o no sustituido, heteroarilalquilo sustituido o no sustituido, o haloalquilo;

R<sub>47</sub> es H, alquilo sustituido o no sustituido, alcoxi sustituido o no sustituido, arilo sustituido o no sustituido, arilalquilo sustituido o no sustituido, o halo; y

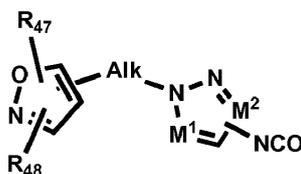
R<sub>48</sub> es H, alquilo sustituido o no sustituido, alcoxi sustituido o no sustituido, arilo sustituido o no sustituido, arilalquilo sustituido o no sustituido, o halo;

en el que el método comprende calentar y convertir un compuesto de la fórmula B:



B

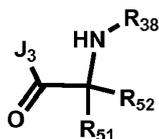
5 en un compuesto de la fórmula C:



C

en la que R<sub>47</sub>, R<sub>48</sub>, Alk, M<sup>1</sup>, y M<sup>2</sup> se definen anteriormente;

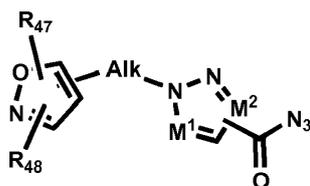
y hacer reaccionar el compuesto de fórmula C con un compuesto de la fórmula D:



D

10 en la que J<sub>3</sub> es un grupo saliente y R<sub>38</sub>, R<sub>51</sub>, y R<sub>52</sub> se definen anteriormente, para dar el compuesto de fórmula A.

16. Un compuesto de la fórmula B:



B

o una sal o N-óxido del mismo,

en la que Alk es un grupo alquilo, opcionalmente interrumpido por un heteroátomo;

15 M<sup>1</sup> es N o CR<sub>49</sub>, en el que R<sub>49</sub> es H o alquilo sustituido o no sustituido;

M<sup>2</sup> es N o CR<sub>50</sub>, en el que R<sub>50</sub> es H o alquilo sustituido o no sustituido;

R<sub>47</sub> es H, alquilo sustituido o no sustituido, alcoxi sustituido o no sustituido, arilo sustituido o no sustituido, arilalquilo sustituido o no sustituido, o halo; y

20 R<sub>48</sub> es H, alquilo sustituido o no sustituido, alcoxi sustituido o no sustituido, arilo sustituido o no sustituido, arilalquilo sustituido o no sustituido, o halo.

17. El compuesto de la reivindicación 16, o una sal o N-óxido del mismo, en el que:

Alk es un grupo alquilo;

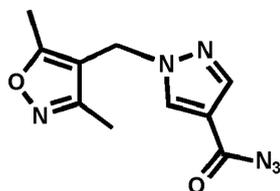
M<sup>1</sup> es CR<sub>49</sub>, en el que R<sub>49</sub> es H o alquilo sustituido o no sustituido;

$M^2$  es  $CR_{50}$ , en el que  $R_{50}$  es H o alquilo sustituido o no sustituido;

$R_{47}$  es alquilo sustituido o no sustituido; y

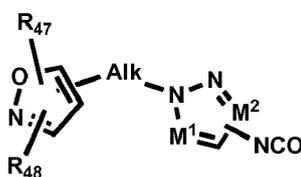
$R_{48}$  es alquilo sustituido o no sustituido.

18. El compuesto de la reivindicación 17, en el que el compuesto de fórmula B tiene la fórmula:



5

19. El compuesto de la fórmula C:



C

en la que Alk es un grupo alquilo, opcionalmente interrumpido por un heteroátomo;

$M^1$  es N o  $CR_{49}$ , en el que  $R_{49}$  es H o alquilo sustituido o no sustituido;

10  $M^2$  es N o  $CR_{50}$ , en el que  $R_{50}$  es H o alquilo sustituido o no sustituido;

$R_{47}$  es H, alquilo sustituido o no sustituido, alcoxi sustituido o no sustituido, arilo sustituido o no sustituido, arilalquilo sustituido o no sustituido, o halo; y

$R_{48}$  es H, alquilo sustituido o no sustituido, alcoxi sustituido o no sustituido, arilo sustituido o no sustituido, arilalquilo sustituido o no sustituido, o halo.

15 20. El compuesto de la reivindicación 19, en el que:

Alk es un grupo alquilo;

$M^1$  es  $CR_{49}$ , en el que  $R_{49}$  es H o alquilo sustituido o no sustituido;

$M^2$  es  $CR_{50}$ , en el que  $R_{50}$  es H o alquilo sustituido o no sustituido;

$R_{47}$  es alquilo sustituido o no sustituido; y

20  $R_{48}$  es alquilo sustituido o no sustituido.

21. El compuesto de la reivindicación 19, en el que el compuesto de fórmula C tiene la fórmula:

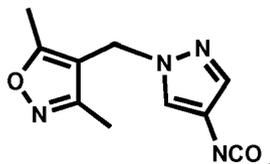


Fig. 1 La fracción amarga del café activó hT2R8 y hT2R14

[Fracción del café] = 1 mg/ml

Colorante azul = 1,9 mM FD&C 1

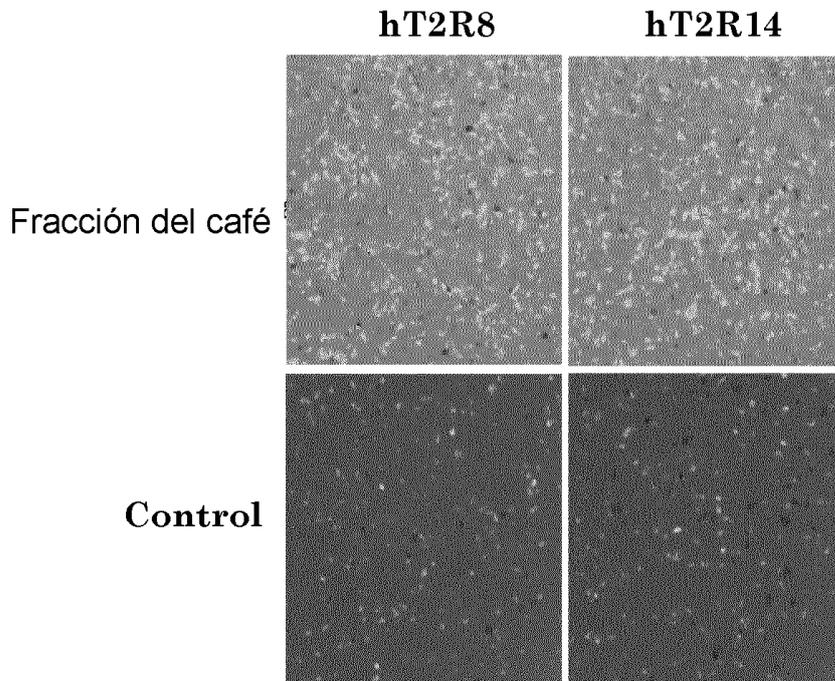


Fig. 2 Respuesta dependiente de la dosis de hT2R8 y hT2R14 a la fracción del café

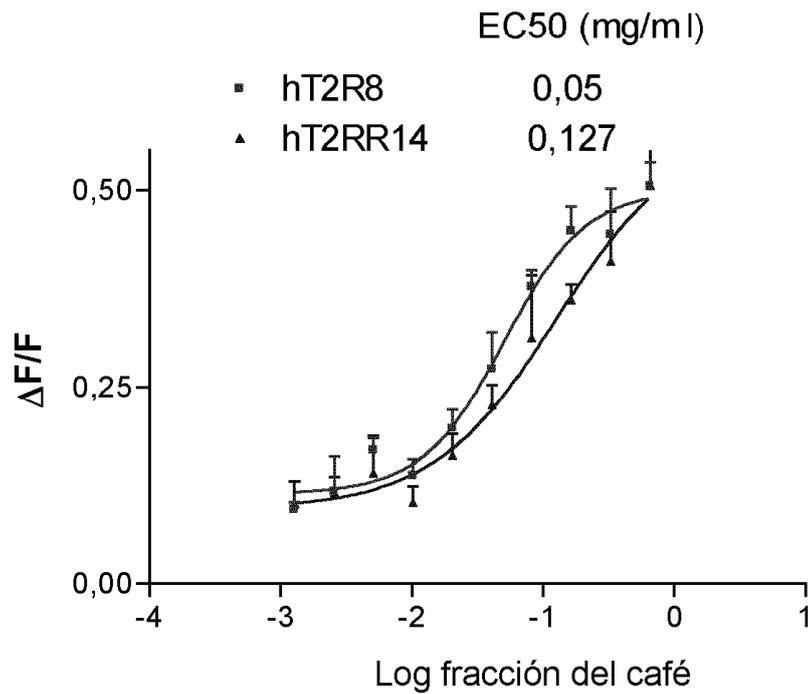


Fig. 3 Curvas de inhibición dependiente de la dosis para compuesto A y B sobre la estirpe celular estable de hT2R8

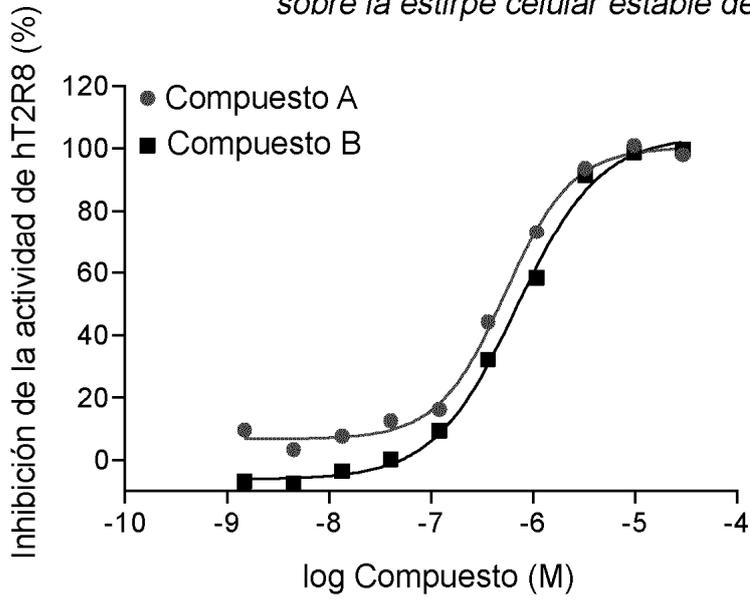


Fig. 4 Curvas de inhibición dependiente de la dosis para compuesto C sobre la estirpe celular estable de hT2R14

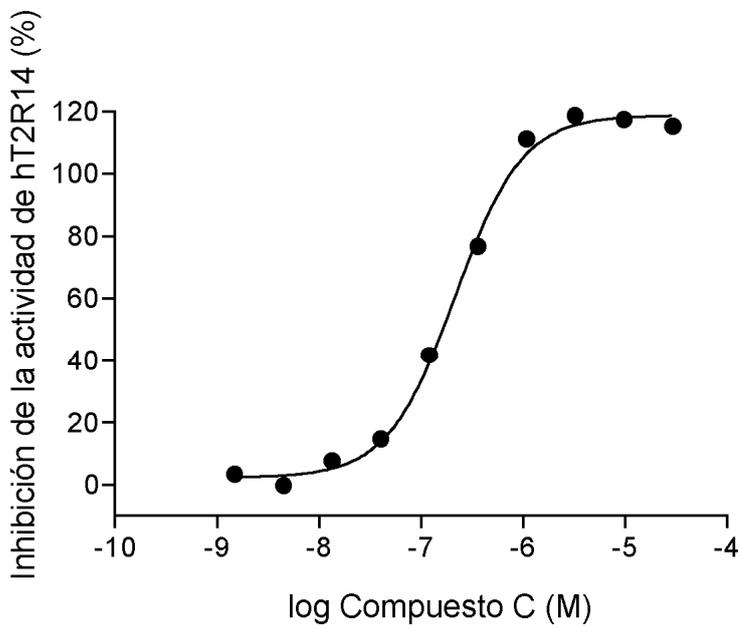


Figura 5 Actividad de inhibición de S5105 sobre 22 hT2Rs

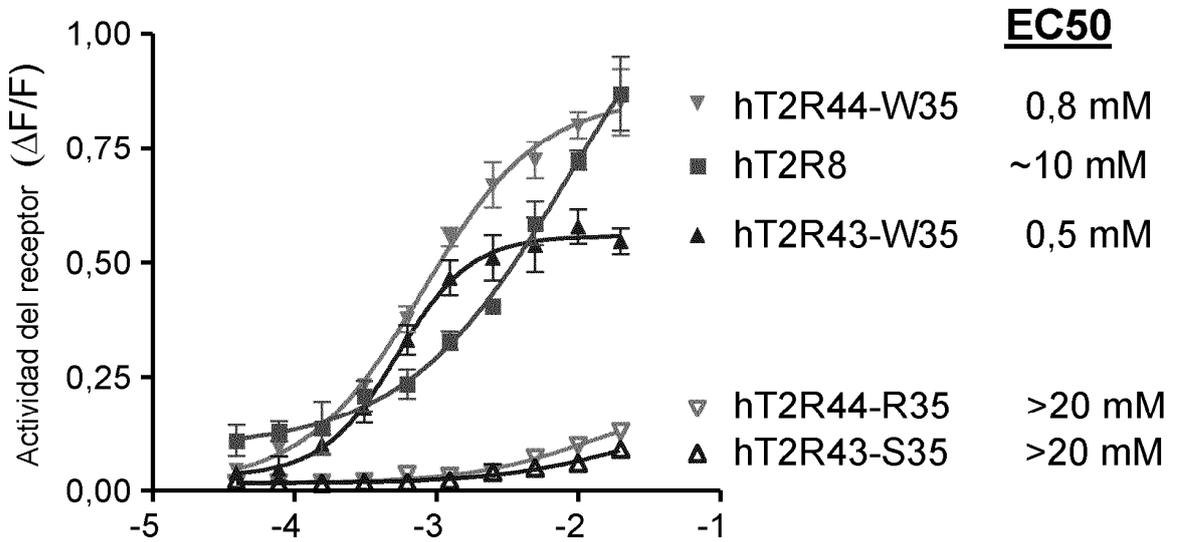
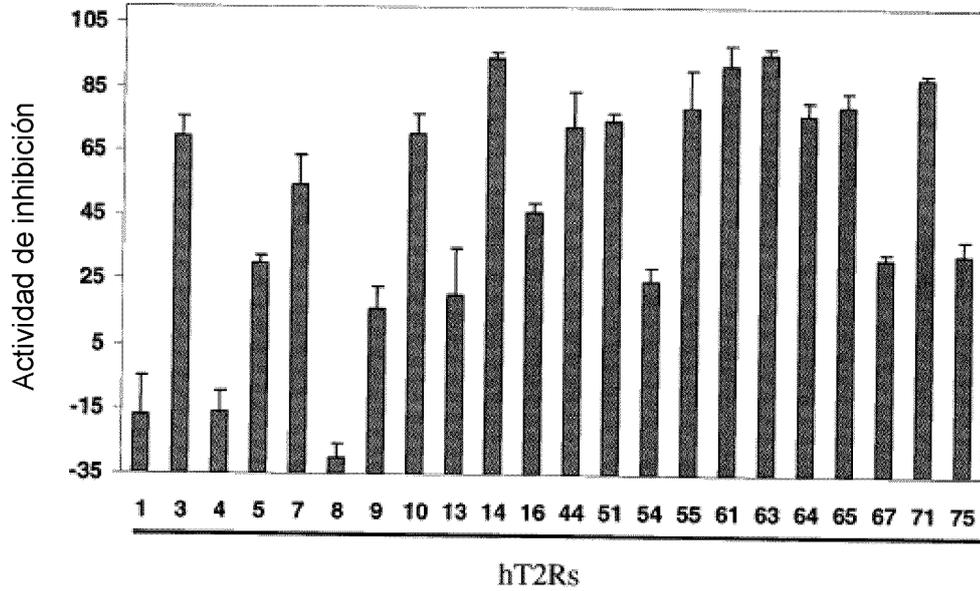


FIG. 6