

[19] 中华人民共和国国家知识产权局



[12] 发 明 专 利 说 明 书

专利号 ZL 02813289.0

[51] Int. Cl.

C07D 471/04 (2006.01)

C07D 491/052 (2006.01)

C07D 495/04 (2006.01)

A61K 31/4745 (2006.01)

A61K 31/4162 (2006.01)

A61P 3/10 (2006.01)

[45] 授权公告日 2006 年 4 月 5 日

[11] 授权公告号 CN 1249063C

[51] Int. Cl. (续)

A61P 11/06 (2006.01)

A61P 17/06 (2006.01)

A61P 19/02 (2006.01)

A61P 37/02 (2006.01)

[22] 申请日 2002.7.2 [21] 申请号 02813289.0

[30] 优先权

[32] 2001. 7. 4 [33] SE [31] 0102404 - 1

[86] 国际申请 PCT/SE2002/001309 2002.7.2

[87] 国际公布 WO2003/004495 英 2003.1.16

[85] 进入国家阶段日期 2003.12.30

[71] 专利权人 活跃生物技术股份公司

地址 瑞典隆德

[72] 发明人 P·A·比约克 T·费克斯

L·O·G·皮特森 P·索伦森

D·达格拉卡瑟里格

审查员 常晓屿

[74] 专利代理机构 中国国际贸易促进委员会专利
商标事务所

代理人 张 敏

权利要求书 3 页 说明书 24 页

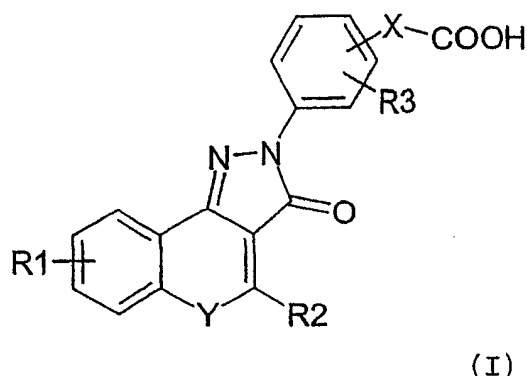
[54] 发明名称

新颖的免疫调制性化合物

[57] 摘要

本发明涉及新颖的杂环化合物、包含所述化合物的药物组合物、所述化合物在临床上治疗医学病症的方法和用途，这些医学病症可以受益于免疫调制，例如类风湿性关节炎、多发性硬化、糖尿病、气喘、移植术、系统性红斑狼疮和牛皮癣。更确切地，本发明涉及新颖的杂环化合物，它们是 CD80 拮抗剂，能够抑制 CD80 与 CD28 之间的相互作用。

1、通式(I)化合物或其药学上可接受的盐:



其中 X 代表一条键或选自 C_{1-3} -烷基、 $NH-C(=O)-C_{1-3}$ -烷基、 $NH-C(=O)-CH_2-O-CH_2$ 或 $C(=O)-NH-$ (氨基酸残基) 的基团;

Y 代表 NR_4 、O 或 S;

R1 代表 H、卤素、 CF_3 、低级烷基或低级烷氧基;

R2 和 R4 独立地代表 H 或低级烷基; 和

R3 代表 H、卤素、低级烷基或低级烷氧基,

其中卤素是 F、Cl 或 Br;

其中低级烷基代表饱和或不饱和的、直链、支链或环状烷基, 具有 1-6 个碳原子; 和

其中低级烷氧基代表饱和或不饱和的、直链、支链或环状烷氧基, 具有 1-6 个碳原子,

其条件是当 X 是一条键、Y 是 NH 和 R3 是 H 时, R2 不是 H。

2、根据权利要求 1 的化合物, 其中 X 是一条键。

3、根据权利要求 1 或 2 的化合物, 其中 Y 是 NH。

4、根据权利要求 1 的化合物, 选自包含下列化合物的组:

[[3-(3-氧代-3,5-二氢吡唑并[4,3-c]喹啉-2-基)苯基氨基甲酰基]甲氧基]乙酸,

N-[4-(3-氧代-3,5-二氢吡唑并[4,3-c]喹啉-2-基)苯基]琥珀酰胺酸,

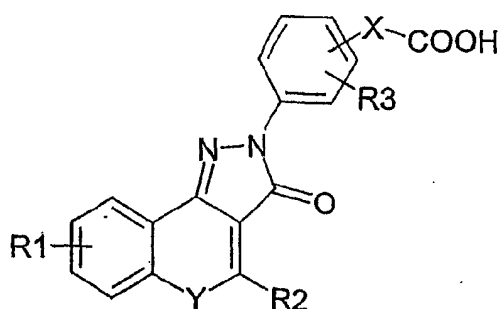
4-[4-(3-氧代-3,5-二氢吡唑并[4,3-c]喹啉-2-基)苯基氨基甲酰基]丁酸,
[[4-(3-氧代-3,5-二氢吡唑并[4,3-c]喹啉-2-基)苯基氨基甲酰基]甲氧基]乙酸,
4-[4-(3-氧代-3,5-二氢吡唑并[4,3-c]喹啉-2-基)苯基氨基甲酰基]-2-苯基丁酸,
N-[3-(3-氧代-3,5-二氢吡唑并[4,3-c]喹啉-2-基)苯基]琥珀酰胺酸,
2-[[4-(3-氧代-3,5-二氢吡唑并[4,3-c]喹啉-2-基)苯基氨基甲酰基]甲基]苯甲酸,
2-氯-4-(3-氧代-3,5-二氢吡唑并[4,3-c]喹啉-2-基)苯甲酸,
4-(6,8-二甲基-3-氧代-3,5-二氢吡唑并[4,3-c]喹啉-2-基)苯甲酸,
4-(8-甲氧基-6-甲基-3-氧代-3,5-二氢吡唑并[4,3-c]喹啉-2-基)苯甲酸,
4-(6,8-二甲氧基-3-氧代-3,5-二氢吡唑并[4,3-c]喹啉-2-基)苯甲酸,
4-(7,9-二甲氧基-3-氧代-3,5-二氢吡唑并[4,3-c]喹啉-2-基)苯甲酸,
4-(6-甲基-3-氧代-8-三氟甲基-3,5-二氢吡唑并[4,3-c]喹啉-2-基)苯甲酸,
4-(7,9-二氯-3-氧代-3,5-二氢吡唑并[4,3-c]喹啉-2-基)苯甲酸,
[4-(3-氧代-3,5-二氢吡唑并[4,3-c]喹啉-2-基)苯基]丙酸,
[4-(3-氧代-3,5-二氢吡唑并[4,3-c]喹啉-2-基)苯基]乙酸,
4-(4-甲基-3-氧代-3H-苯并吡喃并[4,3-c]吡唑-2-基)苯甲酸,
4-(3-氧代-3H-苯并噻喃并[4,3-c]吡唑-2-基)苯甲酸,
4-(5-甲基-3-氧代-3,5-二氢吡唑并[4,3-c]喹啉-2-基)苯甲酸,
2-[4-(3-氧代-3,5-二氢吡唑并[4,3-c]喹啉-2-基)苯甲酰氨基]-3-苯基丙酸, 和
2-[4-(3-氧代-3,5-二氢吡唑并[4,3-c]喹啉-2-基)苯甲酰氨基]-2-乙酸。

5、如权利要求 1-4 任意一项所定义的化合物作为前体药物的用途。

6、根据权利要求 5 的用途，其中所述前体药物为酯的形式。

7、药物组合物，包含根据权利要求 1-6 任意一项的化合物作为活性成分，以及药学上可接受的助剂、稀释剂或载体。

8、通式(I)化合物或其药学上可接受的盐制造药物的用途，



(I)

其中 X 代表一条键或选自 C_{1-3} -烷基、 $NH-C(O)-C_{1-3}$ -烷基、 $NH-C(O)-CH_2-O-CH_2$ 或 $C(O)-NH-$ （氨基酸残基）的基团；

Y 代表 NR_4 、O 或 S；

R_1 代表 H、卤素、 CF_3 、低级烷基或低级烷氧基；

R_2 和 R_4 独立地代表 H 或低级烷基；和

R_3 代表 H、卤素、低级烷基或低级烷氧基，

其中卤素是 F、Cl 或 Br；

其中低级烷基代表饱和或不饱和的、直链、支链或环状烷基，具有 1-6 个碳原子；和

其中低级烷氧基代表饱和或不饱和的、直链、支链或环状烷氧基，具有 1-6 个碳原子，

该药物用于治疗受益于免疫调制的医学病症。

9、根据权利要求 8 的用途，其中所述医学病症选自包含类风湿性关节炎、多发性硬化、糖尿病、气喘、移植术、系统性红斑狼疮和牛皮癣的组。

新颖的免疫调制性化合物

发明领域

本发明涉及免疫调制性化合物、包含所述化合物的药物组合物、所述化合物的用途以及受益于免疫调制的医学病症的治疗方法，其中将所述化合物给药。

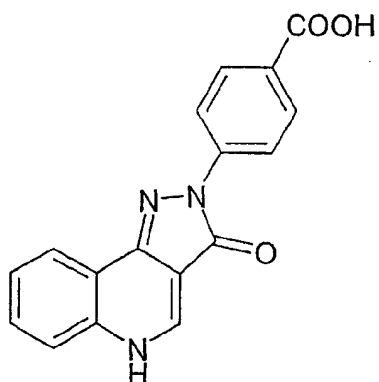
发明背景

免疫系统具有在免疫应答期间和之后通过各种调节性机理控制淋巴细胞活化与失活之间的内环境稳定的能力。其中有特异性抑制和/或关闭免疫应答的机理。因而，当抗原被 MHC 分子呈递给 T 细胞受体时，T 细胞仅在另外的辅助刺激性信号的存在下才变得适当活化的。在没有辅助信号的存在下，不存在淋巴细胞的活化，要么诱发功能性失活的状态，也称无变应性或耐受性，要么 T 细胞因编程性细胞死亡而被特定地删去。

一种这样的辅助刺激信号牵涉 CD80 对专门的抗原呈递细胞与 CD28 对 T 细胞的相互作用，这已被证明是完全的 T 细胞活化所必需的 (Lenschow 等人 (1996) *Annu. Rev. Immunol.*, 14, 233-258)。

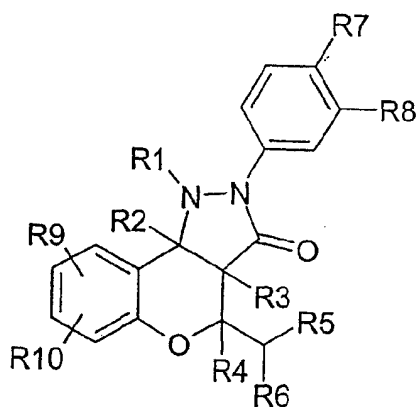
现有技术

在 US 4,312,870 中，公开了化合物 A 是若干神经活性化合物之一，但是没有任何生物学数据。A. Carotti 在 *Bioorganic & Medicinal Chemistry* 6 (1998) 389-399 中描述了一些相关的化合物，从涉及这些化合物的数据可以明显看出，羧酸取代基大大减少生物活性，这是根据对 CNS 苯并二氮杂革受体的亲合性所测量的。



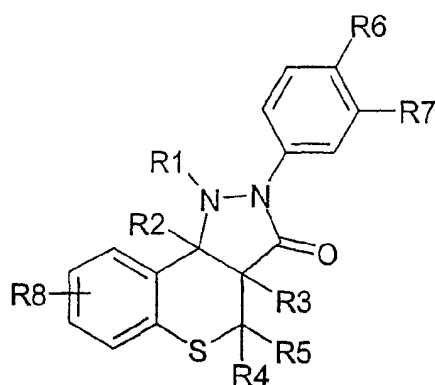
A

EP 0354693A1 (Boots)公开了一般结构 B 的免疫调制性化合物, 但是不包括其中 R7 和/或 R8 是 COOH 或者含有 COOH 基团的结构。



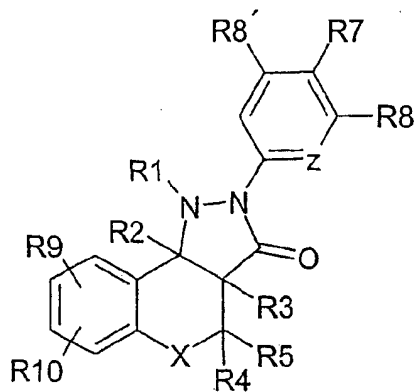
B

类似地, EP 0354694A1 (Boots)公开了一般结构 C 的免疫调制性化合物,但是没有描述其中 R6 和/或 R7 是 COOH 或者含有 COOH 基团的结构。



C

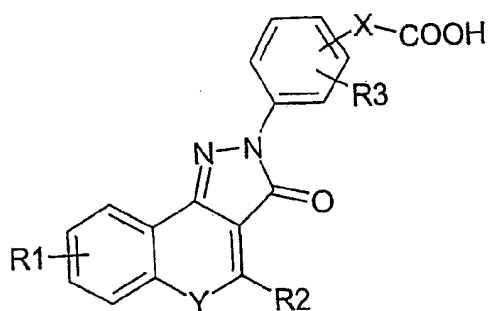
而且, WO 91/11448 (Boots)公开了一般结构 D 的免疫调制性化合物, 但是不存在其中 R7 和/或 R8 和 R8' 是 COOH 或者含有 COOH 基团的结构。



D

发明概述

本发明在第一方面涉及新颖的通式 (I) 化合物或其药学上可接受的盐:



(I)

其中 X 代表一条键或选自取代或未取代的 C_{1-3} -烷基、 $NH-C(O)-C_{1-3}$ -烷基、 $NH-C(O)-CH_2-O-CH_2$ 或 $C(O)-NH-$ (氨基酸残基) 的基团;

Y 代表 NR_4 、O 或 S;

R1 代表 H、卤素、 CF_3 、低级烷基或低级烷氧基;

R2 和 R4 独立地代表 H 或低级烷基; 和

R3 代表 H、卤素、低级烷基或低级烷氧基,

其中卤素是 F、Cl 或 Br;

其中低级烷基代表饱和或不饱和的、直链、支链或环状烷基，具有 1-6 个碳原子；和

其中低级烷氧基代表饱和或不饱和的、直链、支链或环状烷氧基，具有 1-6 个碳原子，

其条件是当 X 是一条键、Y 是 NH 和 R3 是 H 时，R2 不是 H。

在一种优选的化合物发明实施方式中，X 是一条键，在另一种优选的实施方式中，Y 是 NH。

在进一步的实施方式中，化合物选自包含下列化合物的组：

{[3-(3-氧代-3,5-二氢吡唑并[4,3-c]喹啉-2-基)苯基氨基甲酰基]甲氧基}乙酸，

N-[4-(3-氧代-3,5-二氢吡唑并[4,3-c]喹啉-2-基)苯基]琥珀酰胺酸，

4-[4-(3-氧代-3,5-二氢吡唑并[4,3-c]喹啉-2-基)苯基氨基甲酰基]丁酸，

{[4-(3-氧代-3,5-二氢吡唑并[4,3-c]喹啉-2-基)苯基氨基甲酰基]甲氧基}乙酸，

4-[4-(3-氧代-3,5-二氢吡唑并[4,3-c]喹啉-2-基)苯基氨基甲酰基]-2-苯基丁酸，

N-[3-(3-氧代-3,5-二氢吡唑并[4,3-c]喹啉-2-基)苯基]琥珀酰胺酸，

2-{[4-(3-氧代-3,5-二氢吡唑并[4,3-c]喹啉-2-基)苯基氨基甲酰基]甲基}苯甲酸，

2-氯-4-(3-氧代-3,5-二氢吡唑并[4,3-c]喹啉-2-基)苯甲酸，

4-(6,8-二甲基-3-氧代-3,5-二氢吡唑并[4,3-c]喹啉-2-基)苯甲酸，

4-(8-甲氧基-6-甲基-3-氧代-3,5-二氢吡唑并[4,3-c]喹啉-2-基)苯甲酸，

4-(6,8-二甲氧基-3-氧代-3,5-二氢吡唑并[4,3-c]喹啉-2-基)苯甲酸，

4-(7,9-二甲氧基-3-氧代-3,5-二氢吡唑并[4,3-c]喹啉-2-基)苯甲

酸,

4-(6-甲基-3-氧代-8-三氟甲基-3,5-二氢吡唑并[4,3-c]喹啉-2-基)苯甲酸,

4-(7,9-二氯-3-氧代-3,5-二氢吡唑并[4,3-c]喹啉-2-基)苯甲酸,
[4-(3-氧代-3,5-二氢吡唑并[4,3-c]喹啉-2-基)苯基]丙酸,

[4-(3-氧代-3,5-二氢吡唑并[4,3-c]喹啉-2-基)苯基]乙酸,

4-(4-甲基-3-氧代-3H-苯并吡喃并[4,3-c]吡唑-2-基)苯甲酸,

4-(3-氧代-3H-苯并噻喃并(thiochromeno)[4,3-c]吡唑-2-基)苯甲酸,

4-(5-甲基-3-氧代-3,5-二氢吡唑并[4,3-c]喹啉-2-基)苯甲酸,

2-[4-(3-氧代-3,5-二氢吡唑并[4,3-c]喹啉-2-基)苯甲酰氨基]-3-苯基丙酸, 和

2-[4-(3-氧代-3,5-二氢吡唑并[4,3-c]喹啉-2-基)苯甲酰氨基]-2-乙酸。

在另一种实施方式中,所述化合物是CD80拮抗剂,能够抑制CD80与CD28之间的相互作用。

本发明在第二方面涉及用作药物的如上所述的化合物。

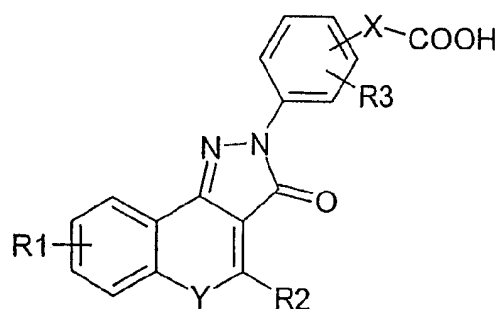
在一种优选的实施方式中,所述化合物用作药物,治疗医学病症,选自包含类风湿性关节炎、多发性硬化、糖尿病、气喘、移植术、系统性红斑狼疮和牛皮癣的组。

本发明在第三方面涉及用作前体药物的如上所述的化合物,优选为酯的形式。

本发明在第四方面涉及药物组合物,包含所述化合物作为活性成分,以及药学上可接受的助剂、稀释剂或载体。

在一种优选的实施方式中,所述药物组合物用于治疗医学病症,选自包含类风湿性关节炎、多发性硬化、糖尿病、气喘、移植术、系统性红斑狼疮和牛皮癣的组。

本发明在第五方面涉及通式(I)化合物或其药学上可接受的盐制造药物的用途,



(I)

其中 X 代表一条键或选自取代或未取代的 C_{1-3} -烷基、 $NH-C(=O)-C_{1-3}$ -烷基、 $NH-C(=O)-CH_2-O-CH_2$ 或 $C(=O)-NH-$ (氨基酸残基) 的基团;

Y 代表 NR_4 、O 或 S;

R1 代表 H、卤素、 CF_3 、低级烷基或低级烷氧基;

R2 和 R4 独立地代表 H 或低级烷基; 和

R3 代表 H、卤素、低级烷基或低级烷氧基,

其中卤素是 F、Cl 或 Br;

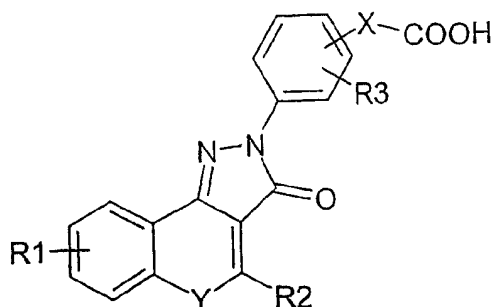
其中低级烷基代表饱和或不饱和的、直链、支链或环状烷基, 具有 1-6 个碳原子; 和

其中低级烷氧基代表饱和或不饱和的、直链、支链或环状烷氧基, 具有 1-6 个碳原子,

该药物用于治疗受益于免疫调制的医学病症。

在一种实施方式中, 所述医学病症选自包含类风湿性关节炎、多发性硬化、糖尿病、气喘、移植术、系统性红斑狼疮和牛皮癣的组。

本发明在第六方面涉及治疗受益于免疫调制的医学病症的方法, 包含给以治疗有效量的通式 (I) 化合物或其药学上可接受的盐:



(I)

其中 X 代表一条键或选自取代或未取代的 C_{1-3} -烷基、 $NH-C(O)-C_{1-3}$ -烷基、 $NH-C(O)-CH_2-O-CH_2$ 或 $C(O)-NH-$ （氨基酸残基）的基团；

Y 代表 NR_4 、O 或 S；

R1 代表 H、卤素、 CF_3 、低级烷基或低级烷氧基；

R2 和 R4 独立地代表 H 或低级烷基；和

R3 代表 H、卤素、低级烷基或低级烷氧基，

其中卤素是 F、Cl 或 Br；

其中低级烷基代表饱和或不饱和的、直链、支链或环状烷基，具有 1 - 6 个碳原子；和

其中低级烷氧基代表饱和或不饱和的、直链、支链或环状烷氧基，具有 1 - 6 个碳原子。

在一种实施方式中，所述医学病症选自包含类风湿性关节炎、多发性硬化、糖尿病、气喘、移植术、系统性红斑狼疮和牛皮癣的组。

在另一种实施方式中，所述每天治疗有效量在 0.001 - 10mg/kg 体重的范围内，优选在 0.1 - 5mg/kg 体重的范围内。

发明的详细说明

本发明涉及杂环化合物、包含它们的药物组合物和所述化合物用于临床治疗受益于免疫调制的医学病症的方法与用途，例如类风湿性关节炎、多发性硬化、糖尿病、气喘、移植术、系统性红斑狼疮和牛皮癣。更确切地，本发明涉及这样的杂环化合物，它们是 CD80 拮抗剂，能够抑制 CD80 与 CD28 之间的相互作用。

按照本发明，已经发现通式 I 化合物是 CD80 拮抗剂。通式 I 化合物抑制 CD80 与 CD28 之间的相互作用。通式 I 化合物的 CD80 拮抗性质已经在表面胞质基因共振 (BIAcore) 实验中得到确认。

优选的是，通式 I 中的 X 是一条键，在这样的情况下，其他取代基会提高活性，例如相邻的间-氯。

本发明的化合物可以是酸的形式，但是也可以是药学上可接受的盐的形式。

本发明的化合物也可以是前体药物的形式，尤其是与适当的醇所

生成的酯。前体药物能够提高药动学和/或溶解度性质。

由于式 I 化合物是能够干扰 CD80 - CD28 相互作用的 CD80 拮抗剂，它们可用于治疗炎症病症和自体免疫疾病，例如类风湿性关节炎、多发性硬化、糖尿病、气喘、移植术、系统性红斑狼疮和牛皮癣。

优选地，按照通常的给药途径，并且配制成通常的药物组合物，其中包含有效量的活性成分和适合的药学上可接受的载体，将有效量的式 I 化合物对需要这类治疗的患者给药。这类组合物可以采取多种剂型，例如制成口服给药的溶液剂、混悬剂、乳剂、片剂、胶囊剂与粉剂、肠胃外给药的无菌溶液剂、直肠给药的栓剂或适合的局部制剂。关于适合的药物制剂的选择与制备的常规工艺例如描述在 “Pharmaceuticals - The Science of Dosage Form Design”，M. B. Aulton, Churchill Livingstone, 1988 中。

适合用在任意上述病症治疗中的每日剂量在 0.001mg/kg 至 10mg/kg 体重的范围内，尤其是在 0.01mg/kg 至 5mg/kg 体重的范围内，这依赖于所要治疗的具体病症、具体患者的年龄与体重和具体患者对药物治疗的反应。精确的个体剂量以及每日剂量将在医师的指导下，取决于标准的医学原理。

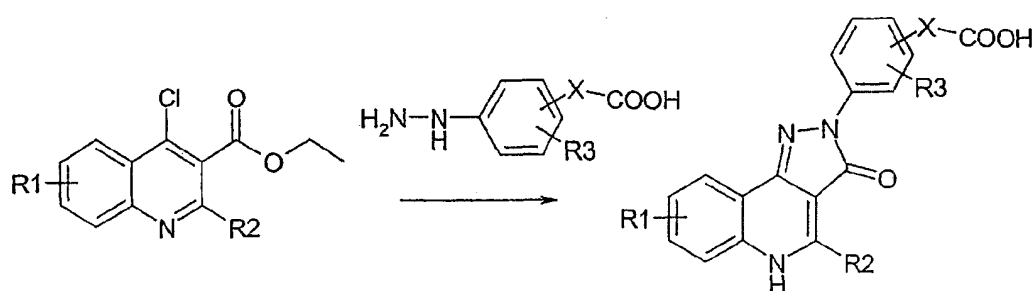
可以向制剂加入各种增强药物的稳定性或给药容易程度的添加剂。药物组合物还可以含有除一种或多种通式 I 化合物以外的另外的治疗上有用的物质。

下列非限制性实验部分进一步阐述本发明。

实验部分

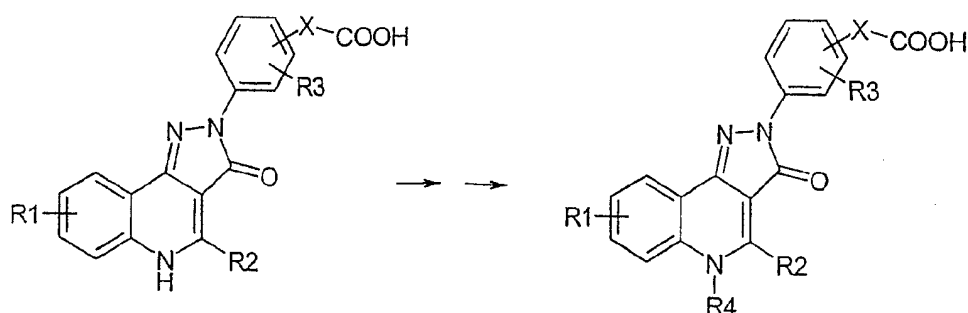
通式 I 化合物可以通过下述方法制备。上述现有技术所引用的专利文献也包括有用的合成方法。

因而，其中 $Y = N$ 且 X 是烷基链的通式 I 化合物可以如下列反应所示加以制备：

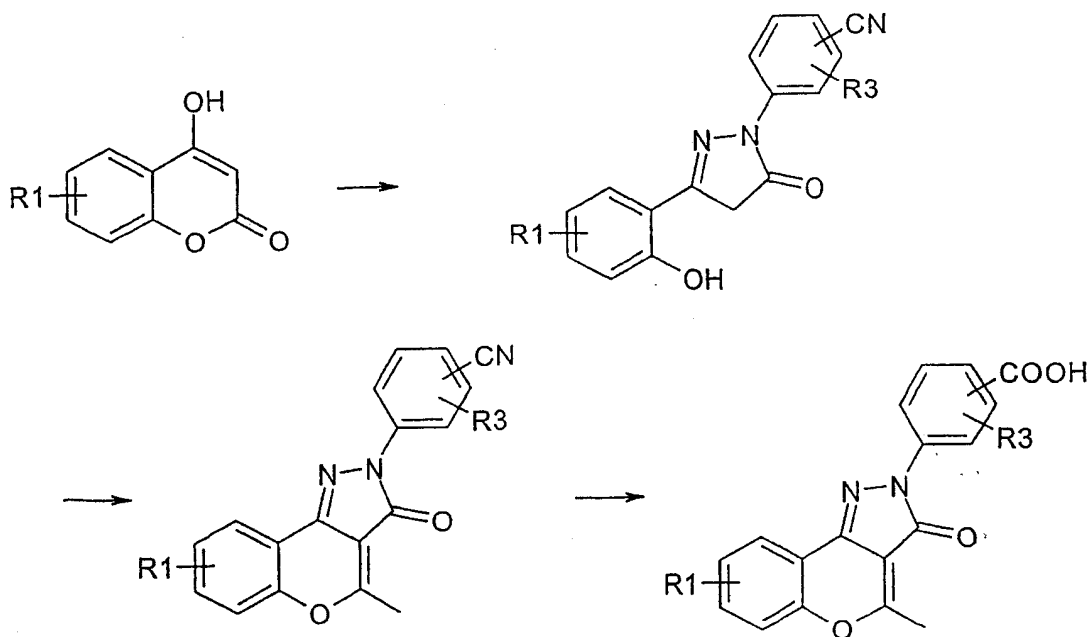


原料可借助已知方法而得 (L. Savini 等人, *Bioorganic & Medicinal Chemistry* 6 (1998) 389-399), 与胍衍生物的反应是这样进行的, 在适合的溶剂中加热, 例如正丁醇。在酸于反应条件下被酯化的情况下, 水解作用仍得到酸。胍衍生物的制备是遵照文献方法完成的 (Hunsberger 等人, *J. Org. Chem.* 21 (1956) 394, 395, 396; Harden F. A. 等人, *J. Med. Chem.* 34 (1991) 2892-8)。

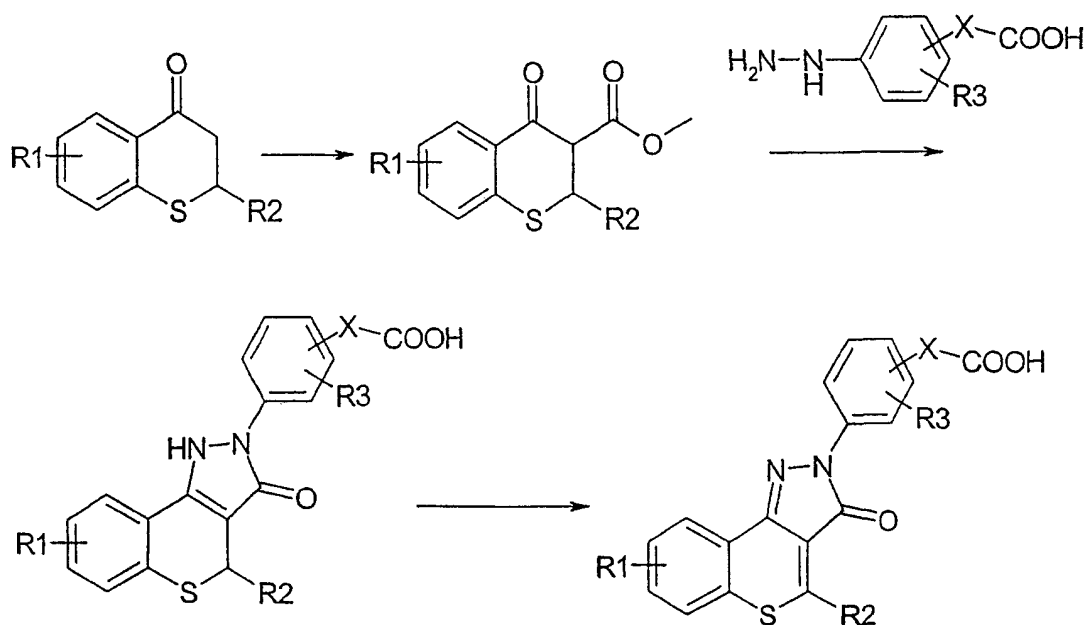
其中 R4 是低级烷基的化合物可以通过随后的烷基化作用而得。如果烷基化作用导致酯的生成, 那么通过水解作用容易得到对应的酸。



其中 Y = 0 且 X 是烷基链的通式 I 化合物可以按照各种文献方法制备 (Ghosh C. K. 等人, *Synthesis* (1978) 779-781; Frogett J. A. 等人, *J. Chem. Research (S)* (1997) 30-31)。当 R2 = Me 时, 一种合成途径如下所述。随后水解羧基, 生成对应的酸。

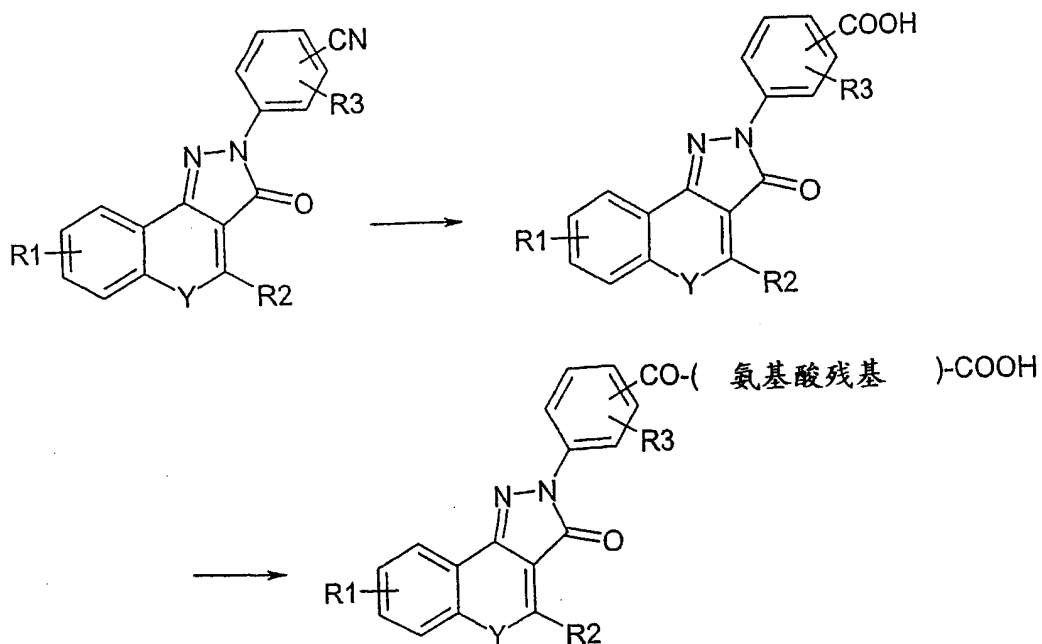


其中 $Y = S$ 且 X 是烷基链的通式 I 化合物可以利用文献所述方法 (Donelly M. X. D. 等人, J. Chem. Soc. Perkin Trans. 1 (1993) 1729-1735; Lombardino J. G. 等人, J. Med. Chem. 24 (1981) 830-834), 如下所示制备。通过在空气中搅拌, 完成最后的氧化作用。

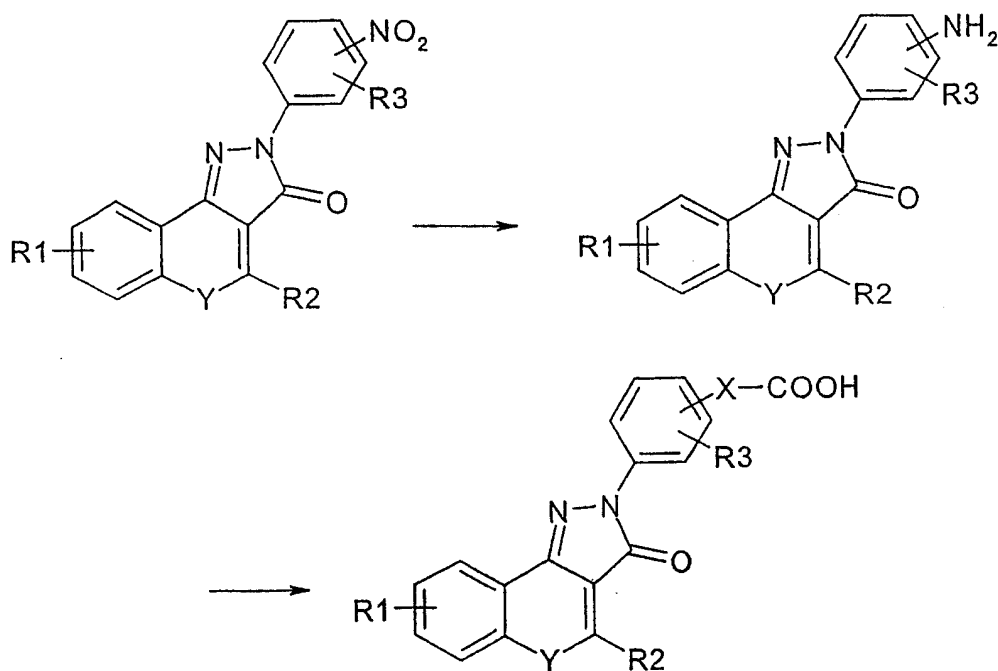


其中 X 是一条键的化合物也可以从对应的氟化物衍生物得到, 氮

基酸衍生物是通过酸与适当的氨基酸的缩合作用而制备的。



其中X是NH-C(O)-(烷基)-和NH-C(O)-CH₂-O-CH₂-的化合物可以通过硝基的还原作用(L. Savini 等人, Bioorganic & Medicinal Chemistry 6 (1998) 389-399)和随后与适当的酸酐的酰化作用加以制备。



实施例

下列实施例意在阐述发明，而不是限制其范围。化合物是利用 Beilstein 的 Autonom 2.1 命名的。NMR 光谱是在 Bruker ARX 400 仪器上记录的。芳族区中的耦合常数主要被表示为单峰(s)、双峰(d)、三重峰(t)，以反映 NMR 光谱的外观。

实施例 1

{[3-(3-氧代-3,5-二氢吡唑并[4,3-c]喹啉-2-基)苯基氨基甲酰基]甲氧基}乙酸

向 2-(3-氨基苯基)-2,5-二氢吡唑并[4,3-c]喹啉-3-酮(0.050g, 0.18mmol)的 DMF (0.8ml)悬液加入二甘醇酸酐(0.025g, 0.22mmol)和 4-二甲氨基吡啶(0.007g, 0.05mmol)。将澄清的溶液在室温下搅拌，在反应期间有产物沉淀出来。3 小时后，向混合物加入水。收集沉淀，用水洗涤，干燥，得到 {[3-(3-氧代-3,5-二氢吡唑并[4,3-c]喹啉-2-基)苯基氨基甲酰基]甲氧基}乙酸(0.064g):

^1H NMR (400 MHz, DMSO- d_6) δ 12.8 (1H, bs), 10.02 (1H, s), 8.69 (1H, s), 8.37 (1H, s), 8.18 (1H, d), 7.95 (1H, d), 7.62-7.70 (2H, m), 7.49-7.55 (2H, m), 7.33 (1H, t), 4.19 (2H, s), 4.17 (2H, s); ESI MS m/z 393 ($M+H^+$)

利用基本上相同的方法，制备下列化合物:

N-[4-(3-氧代-3,5-二氢吡唑并[4,3-c]喹啉-2-基)苯基]琥珀酰胺酸

^1H NMR (400 MHz, DMSO- d_6) δ 9.98 (1H, s), 8.67 (1H, s), 8.18 (1H, d), 8.08 (2H, d), 7.58-7.70 (4H, m), 7.51 (1H, t), 2.47-2.57 (4H, m); ESI MS m/z 377 ($M+H^+$).

4-[4-(3-氧代-3,5-二氢吡唑并[4,3-c]喹啉-2-基)苯基氨基甲酰基]丁酸

^1H NMR (400 MHz, DMSO- d_6) δ 9.89 (1H, s), 8.67 (1H, s), 8.18 (1H, d), 8.08 (2H, d), 7.60-7.69 (4H, m), 7.51 (1H, t), 2.33 (2H, t), 2.25 (2H, t), 1.75-1.83 (2H, m); ESI MS m/z 391 ($M+H^+$).

{[4-(3-氧代-3,5-二氢吡唑并[4,3-c]喹啉-2-基)苯基氨基甲酰基]甲氧基}乙酸

^1H NMR (400 MHz, DMSO- d_6) δ 12.76 (1H, bs), 9.86 (1H, s), 8.68 (1H, d), 8.19 (1H, d), 8.11 (2H, d), 7.61-7.69 (4H, m), 7.52 (1H, t), 4.19 (2H, s), 4.15 (2H, s); ESI MS m/z 393 ($M+H^+$).

4-[4-(3-氧代-3,5-二氢吡唑并[4,3-c]喹啉-2-基)苯基氨基甲酰基]-2-苯基丁酸

^1H NMR (400 MHz, DMSO- d_6) (含有一些 3-苯基区域异构体)
 δ 9.86 (1H, s), 8.67 (1H, s), 8.18 (1H, d), 8.07 (2H, d), 7.58-7.69 (4H, m), 7.51 (1H, t), 7.20-7.38 (5H, m), 3.55 (1H, t), 2.10-2.30 (3H, m), 1.90-2.02 (1H, m); ESI MS m/z 467 ($M+H^+$).

N-[3-(3-氧代-3,5-二氢吡唑并[4,3-c]喹啉-2-基)苯基]琥珀酰胺酸

^1H NMR (400 MHz, DMSO- d_6) δ 10.05 (1H, s), 8.68 (1H, s), 8.31 (1H, s), 8.17 (1H, d), 7.90 (1H, d), 7.62-7.70 (2H, m), 7.48-7.55 (2H, m), 7.30 (1H, t), 2.49-2.57 (4H, m); ESI MS m/z 377 ($M+H^+$).

2-{[4-(3-氧代-3,5-二氢吡唑并[4,3-c]喹啉-2-基)苯基氨基甲酰基]甲基}苯甲酸

^1H NMR (400 MHz, DMSO- d_6) δ 10.11 (1H, s), 8.67 (1H, s), 8.18 (1H, d), 8.08 (2H, d), 7.85 (1H, d), 7.59-7.69 (4H, m), 7.46-7.54 (2H, m), 7.35 (2H, t), 4.07 (2H, s); ESI MS m/z 439 ($M+H^+$).

实施例 2

4-(3-氧代-3,5-二氢吡唑并[4,3-c]喹啉-2-基)苯甲酸

在密封的试管内, 将 4-氯喹啉-3-羧酸乙酯(11.8mg, 0.5mmol)与 4-胍基苯甲酸(7.6mg, 0.5mmol)的正丁醇(0.5ml)溶液在 115°C 下搅拌过夜。冷却至 50-70°C 后, 加入庚烷(1.0ml), 进一步冷却至室温使

产物结晶。除去溶剂，将产物用庚烷洗涤，在真空下干燥，得到 4-(3-氧代-3,5-二氢吡唑并[4,3-c]喹啉-2-基)苯甲酸(13mg)。

^1H NMR (400 MHz, DMSO- d_6) δ 12.9 (1H, s), 8.77 (1H, d), 8.38 (2H, d), 8.25 (1H, d), 8.03 (2H, d), 7.65-7.77 (2H, m), 7.58 (1H, t).

利用基本上相同的方法，制备下列化合物：

3-(3-氧代-3,5-二氢吡唑并[4,3-c]喹啉-2-基)苯甲酸

^1H NMR (400 MHz, DMSO- d_6) δ 12.87 (1H, bs), 8.78 (1H, s), 8.72 (1H, d), 8.46 (1H, d), 8.23 (1H, d), 7.63-7.72 (3H, m), 7.51-7.56 (2H, m); ESI MS m/z 306 ($M+H^+$).

2-氯-4-(3-氧代-3,5-二氢吡唑并[4,3-c]喹啉-2-基)苯甲酸

该反应中，使用 2-氯-4-胍基苯甲酸的盐酸盐，因此还向混合物加入 Et_3N (2eq).

^1H NMR (400 MHz, DMSO- d_6) δ 13.00 (1H, bs), 8.76 (1H, d), 8.44 (1H, s), 8.22-8.28 (2H, m), 7.94 (1H, d), 7.65-7.74 (2H, m), 7.55 (1H, t); ESI MS m/z 340 ($M+H^+$).

4-(6-甲基-3-氧代-3,5-二氢吡唑并[4,3-c]喹啉-2-基)苯甲酸

^1H NMR (400 MHz, DMSO- d_6) δ 12.1 (1H, s), 8.52 (1H, d), 8.38 (2H, d), 8.12 (1H, d), 8.03 (2H, d), 7.56 (1H, d), 7.48 (1H, t), 2.58 (3H, s).

4-(8-甲基-3-氧代-3,5-二氢吡唑并[4,3-c]喹啉-2-基)苯甲酸

^1H NMR (400 MHz, DMSO- d_6) δ 12.9 (1H, s), 8.73 (1H, d), 8.39 (2H, d), 8.06 (1H, s), 8.03 (2H, d), 7.64 (1H, d), 7.53 (1H, d), 2.50 (3H, s, DMSO 讯号).

4-(6,8-二甲基-3-氧代-3,5-二氢吡唑并[4,3-c]喹啉-2-基)苯甲酸

^1H NMR (400 MHz, DMSO- d_6) δ 8.48 (1H, s), 8.38 (2H, d), 8.03 (2H, d), 7.92 (1H, s), 7.40 (1H, s), 2.57 (3H, s), 2.45 (3H, s).

4-(8-叔丁基-3-氧代-3,5-二氢吡唑并[4,3-c]喹啉-2-基)苯甲酸

^1H NMR (400 MHz, DMSO- d_6) δ 12.9 (1H, s), 8.75 (1H, d), 8.40 (2H, d), 8.17 (1H, s), 8.03 (2H, d), 7.81 (1H, d), 7.69 (1H, d), 1.40 (9H, s).

4-(8-甲氧基-6-甲基-3-氧代-3,5-二氢吡唑并[4,3-c]喹啉-2-基)苯甲酸

^1H NMR (400 MHz, DMSO- d_6) δ 12.3 (1H, s), 8.45 (1H, d), 8.41 (2H, d), 8.03 (2H, d), 7.49 (1H, d), 7.21 (1H, d), 3.93 (3H, s), 2.57 (3H, s).

4-(8-甲氧基-3-氧代-3,5-二氢吡唑并[4,3-c]喹啉-2-基)苯甲酸

^1H NMR (400 MHz, DMSO- d_6) δ 12.9 (1H, s), 8.71 (1H, d), 8.41 (2H, d), 8.03 (2H, d), 7.70 (1H, d), 7.61 (1H, d), 7.32 (1H, dd), 3.94 (3H, s).

4-(6,8-二甲氧基-3-氧代-3,5-二氢吡唑并[4,3-c]喹啉-2-基)苯甲酸

^1H NMR (400 MHz, DMSO- d_6) δ 8.40 (2H, d), 8.31 (1H, s), 8.03 (2H, d), 7.18 (1H, d), 6.93 (1H, d), 4.03 (3H, s), 3.95 (3H, s).

4-(7,9-二甲氧基-3-氧代-3,5-二氢吡唑并[4,3-c]喹啉-2-基)苯甲酸

^1H NMR (400 MHz, DMSO- d_6) δ 12.6 (s, 1H), 8.61 (1H, s), 8.36 (2H, d), 8.01 (2H, d), 6.79 (1H, d), 6.69 (1H, d), 4.00 (3H, s), 3.87 (3H, s).

4-(3-氧代-8-三氟甲基-3,5-二氢吡唑并[4,3-c]喹啉-2-基)苯甲酸

^1H NMR (400 MHz, DMSO- d_6) δ 13.1 (1H, s), 8.85 (1H, d), 8.38 (2H, d), 8.10 (1H, s), 8.03 (2H, d), 7.87 (1H, d), 7.73 (1H, d).

4-(6-氟-3-氧代-3,5-二氢吡唑并[4,3-c]喹啉-2-基)苯甲酸

^1H NMR (400 MHz, DMSO- d_6) δ 13.0 (1H, s), 8.58 (1H, s), 8.37 (2H, d), 8.06 (1H, d), 8.04 (2H, d), 7.54-7.66 (2H, m).

4-(6-氯-3-氧代-3,5-二氢吡唑并[4,3-c]喹啉-2-基)苯甲酸

^1H NMR (400 MHz, DMSO- d_6) δ 8.47 (1H, s), 8.36 (2H, d), 8.24 (1H, d), 8.04 (2H, d), 7.88 (1H, d), 7.57 (1H, t).

4-(8-氯-3-氧代-3,5-二氢吡唑并[4,3-c]喹啉-2-基)苯甲酸

^1H NMR (400 MHz, DMSO- d_6) δ 13.0 (1H, s), 8.82 (1H, d), 8.38 (2H, d), 8.20 (1H, s), 8.03 (2H, d), 7.76 (2H, s).

4-(7,9-二氯-3-氧代-3,5-二氢吡唑并[4,3-c]喹啉-2-基)苯甲酸

^1H NMR (400 MHz, DMSO- d_6) δ 13.0 (s, 1H), 8.81 (1H, s), 8.36 (2H, d), 8.04 (2H, d), 7.78 (1H, d), 7.71 (1H, d).

实施例 3**[4-(3-氧代-3,5-二氢吡唑并[4,3-c]喹啉-2-基)苯基]丙酸**

将 4-氯喹啉-3-羧酸乙酯 (0.050g, 0.21mmol) 与 3-(4-胍基苯基)丙酸 (0.046g, 0.25mmol) 的 2-丙醇 (3ml) 悬液在 84°C 油浴中加热 10 小时。收集沉淀, 用 2-丙醇洗涤, 干燥, 得到产物的 2-丙基酯 (0.031g):

^1H NMR (400 MHz, DMSO- d_6) δ 12.8 (1H, bs), 8.66 (1H, d), 8.18 (1H, d), 8.07 (2H, d), 7.60-7.72 (2H, m), 7.52 (1H, t), 7.26 (2H, d), 4.85 (1H, m), 2.82 (2H, t), 2.55 (2H, t), 1.12 (6H, d).

将酯 (0.019g) 溶于 EtOH (0.8ml) 与 1M NaOH (0.4ml), 进行水解。90 分钟后, 混合物用 2M HCl 酸化, 收集沉淀, 用水洗涤, 干燥, 得到 [4-(3-氧代-3,5-二氢吡唑并[4,3-c]喹啉-2-基)苯基]丙酸 (0.016g):

^1H NMR (400 MHz, DMSO- d_6) δ 8.66 (1H, s), 8.18 (1H, d), 8.07 (2H, d), 8.61-8.69 (2H, m), 7.51 (1H, t), 7.26 (2H, d), 2.81 (2H, t), 2.52 (2H, t); ESI MS m/z 334 ($M+H^+$).

利用基本上相同的方法, 制备下列化合物:

[4-(3-氧代-3,5-二氢吡唑并[4,3-c]喹啉-2-基)苯基]乙酸正丁基酯

^1H NMR (400 MHz, DMSO- d_6) δ 12.8 (1H, bs), 8.68 (1H, d), 8.18 (1H, d), 8.13 (2H, d), 7.61-7.72 (2H, m), 7.53 (1H, t), 7.30 (2H, d), 4.02 (2H, t), 3.63 (2H, s), 1.52 (2H, m), 1.28 (2H, m), 0.83 (3H, t); 和

[4-(3-氧代-3,5-二氢吡唑并[4,3-c]喹啉-2-基)苯基]乙酸

^1H NMR (400 MHz, DMSO- d_6) δ 8.67 (1H, s), 8.19 (1H, d), 8.11 (2H, d), 7.61-7.69 (2H, m), 7.52 (1H, t), 7.29 (2H, d), 3.54 (2H, s); ESI MS m/z 320 ($M+H^+$).

实施例 4

3-(4-胍基苯基)丙酸

在 0°C 下, 将 3-(4-氨基苯基)丙酸 (0.50g, 3.0mmol) 的浓盐酸 (3.5ml) 悬液用亚硝酸钠 (0.21g, 3.0mmol) 的 H_2O (1.7ml) 溶液处理。将反应物搅拌 45 分钟, 然后在 0°C 下滴加氯化亚锡 (1.26g, 6.7mmol) 的浓盐酸 (1.5ml) 溶液。将反应物在室温下搅拌 1 小时。收集沉淀, 干燥, 得到盐酸盐 (0.54g)。将该盐 (0.100g) 溶于少量水, 用 1M NaOH 调至碱性。过滤除去固形物, 滤液用酸性酸酸化, 得到沉淀。收集固体, 用水洗涤, 干燥, 得到 3-(4-胍基苯基)丙酸 (0.050g):

^1H NMR (400 MHz, DMSO- d_6) δ 6.90 (2H, d), 6.64 (2H, d), 2.63 (2H, t), 2.39 (2H, t).

利用基本上相同的方法, 制备下列化合物:

2-氯-4-胍基苯甲酸盐盐酸盐

该反应中, 收集盐酸盐, 从乙醇中重结晶纯化: ^1H NMR (400 MHz, DMSO- d_6) δ 8.97 (1H, bs), 7.76 (1H, d), 7.03 (1H, s), 6.88 (1H, d).

实施例 5

4-[3-(2-羟基苯基)-5-氧代-4,5-二氢吡唑-1-基]苄腈

将 4-羟基香豆素 (0.71g, 4.4mmol) 与 4-氨基苯胍 (0.88g, 6.6mmol) 的无水甲苯悬液在 125°C 油浴中加热。在反应期间缓慢蒸馏

甲苯，分离水。除去总计 30ml 甲苯。3 小时后，使溶液冷却，过滤沉淀，用甲苯洗涤，干燥。将粗产物溶于 CH_2Cl_2 。过滤除去固形物，然后将溶液用 2M HCl 洗涤。将有机相干燥，过滤，蒸发溶剂，得到 4-[3-(2-羟基苯基)-5-氧代-4,5-二氢吡唑-1-基]苄腈(0.44g):

 ^1H

NMR (400 MHz, CDCl_3) δ 9.86 (1H, s), 8.01 (2H, d), 7.73 (2H, d), 7.41 (1H, t), 7.23-7.26 (1H, m), 7.08 (1H, d), 6.98 (1H, t), 3.99 (2H, s).

实施例 6

4-(4-甲基-3-氧代-3H-苯并吡喃并[4,3-c]吡唑-2-基)苄腈

将 4-[3-(2-羟基苯基)-5-氧代-4,5-二氢吡唑-1-基]苄腈(0.25g, 0.9mmol)与原乙酸三乙酯(1.6ml)的混合物在 120°C 油浴中加热 15 分钟。冷却后，过滤沉淀，用乙醚洗涤，干燥，得到 4-(4-甲基-3-氧代-3H-苯并吡喃并[4,3-c]吡唑-2-基)苄腈(0.22g):

^1H NMR (400 MHz, CDCl_3) δ 8.35 (2H, d), 8.18 (1H, d), 7.70 (2H, d), 7.58-7.62 (1H, m), 7.47-7.51 (2H, m), 2.84 (3H, s); ESI MS m/z 302 ($\text{M}+\text{H}^+$).

实施例 7

4-(4-甲基-3-氧代-3H-苯并吡喃并[4,3-c]吡唑-2-基)苯甲酸

将 4-(4-甲基-3-氧代-3H-苯并吡喃并[4,3-c]吡唑-2-基)苄腈(0.030g, 0.10mmol)、乙酸(0.4ml)、 H_2SO_4 (0.4ml)与水(0.4ml)的混合物在 100°C 油浴中加热 19 小时。冷却后，加入水，收集沉淀，用水洗涤，干燥，得到 4-(4-甲基-3-氧代-3H-苯并吡喃并[4,3-c]吡唑-2-基)苯甲酸(0.029g):

 ^1H NMR (400

MHz, $\text{DMSO}-d_6$) δ 8.21 (2H, d), 8.13 (1H, d), 8.01 (2H, d), 7.67-7.75 (2H, m), 7.54-7.58 (1H, m), 2.78 (3H, s); ESI MS m/z 321 ($\text{M}+\text{H}^+$).

利用基本上相同的方法，制备下述化合物:

4-(3-氧代-3H-苯并噻喃并[4,3-c]吡唑-2-基)苯甲酸

^1H NMR (400 MHz, DMSO- d_6) δ 9.29 (1H, s), 8.44 (1H, d), 8.24 (2H, d), 8.03 (2H, d), 7.98 (1H, d), 7.67-7.76 (2H, m); ESI MS m/z 323 ($M+H^+$).

实施例 8

4-氧代苯并二氢噻喃-3-羧酸甲基酯

在 N_2 气氛下, 将溶于无水 THF (7ml) 的 LHMDs (1.12g, 6.7mmol) 冷却至 -78°C 。在 20 分钟内滴加苯并二氢噻喃-4-酮 (1.00g, 6.1mmol) 的无水 THF (20ml) 溶液。另外 60 分钟后, 在 5 分钟内滴加氰基甲酸甲酯 (0.62g, 7.3mmol) 的无水 THF (1.5ml) 溶液, 然后将悬液在 -78°C 下搅拌 80 分钟。将悬液倒入 10% NH_4Cl 中, 用乙醚萃取。将有机相用水洗涤, 干燥 (Na_2SO_4), 过滤, 蒸发溶剂。粗产物经过硅胶色谱纯化 (庚烷-乙酸乙酯 10:1), 得到 4-氧代苯并二氢噻喃-3-羧酸甲基酯 (0.65g):

^1H NMR (400 MHz, CDCl_3 ; 烯醇互变异构体) δ 12.64 (1H, s), 7.83 (1H, d), 7.25-7.29 (2H, m), 7.16-7.20 (1H, m), 3.84 (3H, s), 3.71 (2H, s).

实施例 9

4-(3-氧代-1,4-二氢-3H-苯并噻喃并[4,3-c]吡唑-2-基)苄腈

在 N_2 气氛下, 将 4-氧代苯并二氢噻喃-3-羧酸甲基酯 (0.200g, 0.90mmol)、4-氰基苯腈 (0.132g, 0.99mmol) 与少量新戊酸一起在 118°C 油浴中加热。1 小时后, 将混合物冷却至室温, 然后用乙醚研制。过滤沉淀, 干燥, 得到 4-(3-氧代-1,4-二氢-3H-苯并噻喃并[4,3-c]吡唑-2-基)苄腈 (0.233g):

^1H NMR (400 MHz, DMSO- d_6) δ 8.06 (2H, d), 7.92 (2H, d), 7.80-7.83 (1H, m), 7.30-7.33 (1H, m), 7.18-7.25 (2H, m), 3.91 (2H, s).

实施例 10

4-(3-氧代-3H-苯并噻喃并[4,3-c]吡唑-2-基)苄腈

将 4-(3-氧代-1,4-二氢-3H-苯并噻喃并[4,3-c]吡唑-2-基)苄腈 (0.100g, 0.33mmol) 的 DMSO (2ml) 溶液在室温下剧烈搅拌, 用空气冲洗溶液。48 小时后, 过滤沉淀, 用甲苯洗涤, 干燥。粗产物经过甲苯重结晶纯化, 得到 4-(3-氧代-3H-苯并噻喃并[4,3-c]吡唑-2-基)苄腈 (0.036g):

^1H NMR (400 MHz, CDCl_3) δ 8.65 (1H, s), 8.53 (1H, d), 8.38 (2H, d), 7.72 (2H, d), 7.66 (2H, t), 7.58-7.62 (1H, m); ESI MS m/z 304 ($\text{M}+\text{H}^+$).

实施例 11

4-(5-甲基-3-氧代-3,5-二氢吡唑并[4,3-c]喹啉-2-基)苯甲酸

在 N_2 气氛下, 向 NaH (55%) (0.017g, 0.39mmol) 的 DMF (0.5ml) 悬浮液中分小批量加入 4-(3-氧代-3,5-二氢吡唑并[4,3-c]喹啉-2-基)苯甲酸 (0.050g, 0.16mmol) 的 DMF (1ml) 悬浮液。将反应物在室温下搅拌。1 小时后, 加入 MeI (0.053g, 0.38mmol)。另外 24 小时后, 加入水, 过滤除去固形物 (主要由酯产物组成)。将滤液用 2M HCl 酸化。收集沉淀, 用水洗涤, 干燥, 得到 4-(5-甲基-3-氧代-3,5-二氢吡唑并[4,3-c]喹啉-2-基)苯甲酸 (0.018g)。其中含有大约 10% 酯产物:

^1H NMR (400 MHz, $\text{DMSO}-d_6$) δ 8.89 (1H, s), 8.34 (2H, d), 8.29 (1H, d), 7.99 (2H, d), 7.85 (1H, d), 7.76 (1H, t), 7.62 (1H, t), 4.00 (3H, s); ESI MS m/z 320 ($\text{M}+\text{H}^+$).

实施例 12

2-[4-(3-氧代-3,5-二氢吡唑并[4,3-c]喹啉-2-基)苯甲酰氨基]-3-苯基丙酸

将 4-(3-氧代-3,5-二氢吡唑并[4,3-c]喹啉-2-基)苯甲酸 (30mg, 0.1mmol) 溶于 DMF (0.5ml), 加入 18mg (0.1mmol) 羰基二咪唑 (90% 纯),

将混合物搅拌 4 小时。将苯丙氨酸(33mg, 0.2mmol)溶于 H₂O (0.5ml) 与三乙胺(0.05ml), 加入到活化的酸中。将该反应混合物在 75℃ 下加热 2 小时。冷却后, 调至酸性, 用 H₂O 稀释 5x。过滤沉淀, 用 H₂O 洗涤, 在真空下干燥。经过快速色谱纯化, 用 EtOAc/MeOH (7:3) 洗脱, 得到少量 2-[4-(3-氧代-3,5-二氢吡唑并[4,3-c]喹啉-2-基)苯甲酰氨基]-3-苯基丙酸。该物质含有大约 10%原料。

¹H NMR (400 MHz, DMSO-d₆) δ 8.7 (1H, s), 8.31 (2H, d), 8.21 (1H, d), 7.82 (2H, d), 7.70 (1H, d), 7.62 (1H, t), 7.50 (1H, t), 7.2-7.3 (4H, m), 7.17 (1H, t), 4.50 (1H, m), 3.1-3.2 (2H,m).

利用基本上相同的方法, 制备下述化合物:
2-[4-(3-氧代-3,5-二氢吡唑并[4,3-c]喹啉-2-基)苯甲酰氨基]-2-乙酸

¹H NMR (400 MHz, DMSO-d₆) δ 8.7 (1H, s), 8.36 (2H, d), 8.22 (1H, d), 7.92 (2H, d), 7.70 (1H, d), 7.63 (1H, t), 7.51 (1H, t), 3.85 (2H,d).

实施例 13

时间分辨荧光竞争测定方案: CD28 - CD80 相互作用

试剂	供应商
Eu 标记的抗兔抗体 (αR-Eu)	Wallac Oy, Turku, Finland
兔抗小鼠 IgG, Fc 片段特异性 (RαmIg (Fc))	Jackson Immunoresearch Laboratories Inc.
人 CD28-小鼠 IgG1 (Fc) (CD28-mFc)	Active Biotech Research AB
人 CD80-小鼠 C215 Fab (C215Fab-hCD80)	Active Biotech Research AB
小鼠 C215Fab	Active Biotech Research AB
生物素耦合的山羊抗小鼠 IgG κ轻链 (GαMκ-biot)	Southern Biotechnology Ass. Inc.
链霉抗生物素-别藻蓝蛋白 (SA-APC)	Wallac Oy, Turku, Finland

测定缓冲液

50mM Tris-HCl, 150mM NaCl, 0.05% Tween 20, pH 7.8, 含有 0.1% BSA (w/v), 使用前加入。

样本制备

将所要测试抑制效果的物质从 20mM 储液浓度 (DMSO) 连续在测定缓冲液中稀释至制备浓度 200、100、50 和 25 μ M。小孔中的最终浓度分别为 100、50、25 和 12.5 μ M。本测定法中耐受的最大最终 DMSO 浓度为 0.5%。酌情调节稀释液系列, 扩充测量 IC₅₀。

对照

将 CTLA4-hIg (Fc) 稀释至工作浓度 20nM 和 2nM, 得到小孔中的最终浓度为 10nM 和 1nM。在这些浓度下 (10nM 和 1nM), 观察到大约 90% 和 30% 的抑制水平。

试剂混合物的制备

对于 1 个平板:

向含有 1.1ml 测定缓冲液的试管加入下列试剂:

试剂	体积/1.1ml 测定缓冲液	制备浓度	小孔中的最终浓度
α R-Eu	4.2 μ l, 取自 0.528mg/ml	2 μ g/ml	1 μ g/ml
R α mFc	2.8 μ l, 取自 2.4mg/ml	6 μ g/ml	3 μ g/ml
CD28-mFc	2.6 μ l, 取自 0.4mg/ml	0.95 μ g/ml (10nM)	0.48 μ g/ml (5nM)
G α m κ -生物素	8.8 μ l, 取自 0.5mg/ml	4 μ g/ml	2 μ g/ml
SA-APC	15.4 μ l, 取自 1mg/ml	16 μ g/ml	8 μ g/ml

CD80FabC215 混合物

将 900 μ l 上述试剂混合物转移至新的试管。按照 20nM 的制备浓度加入 CD80FabC215 (也就是 4.3 μ l, 取自 0.4mg/ml 储备溶液)。小孔中的最终浓度为 10nM。

FabC215 混合物

向其余 200 μ l 试剂混合物加入 C215Fab 作为非特异性结合 (NSB) 的对照。从 0.36mg/ml 储备溶液取 0.5 μ l, 得到制备浓度为 20nM, 小孔中的最终浓度为 10nM。

吸移

利用单通道电子吸移管，将含有 C215Fab 的试剂混合物转移至黑色半区 96 孔微量滴定板的第 12 列、第 E-H 行（4 个孔），每孔 10 μ l。利用单通道电子吸移管，将含有 CD80FabC215 的试剂混合物转移至平板上的其他孔，每孔 10 μ l。

B0: 将测定缓冲液吸移至第 12 列、第 A-D 行含有 CD80FabC215 的小孔（4 个孔），每孔 10 μ l。

NSB: 将测定缓冲液吸移至第 12 列、第 E-H 行含有 C215Fab 的小孔（4 个孔），每孔 10 μ l。

将 20nM 和 2nM（最终浓度 10nM 和 1nM）的 CTLA4-hIg (Fc) 吸移至 11 E-F 和 11 G-H 小孔，每孔 10 μ l，一式两份。

样本稀释液系列：其余小孔，每孔 10 μ l，一式两份。

培育

将平板盖上塑料盖，在暗处培育：最初在室温下 (RTS) 在摇动平台上培育 1 小时，在 +4 $^{\circ}$ C 下静态培育过夜，最后在 RTS 下培育 1 小时，然后读数。

测量

在 Victor 1420 多标记计数器上测量平板，利用 LANCE 方案 (#2) 测量双波长下的发射，来自 APC (665nm) 和铕 (Europium) (615nm)。第一次测量：激发波长 340nm，发射波长 665nm，延迟 50 μ s，窗口时间 200 μ s。第二次测量：激发波长 340nm，发射波长 615nm，延迟 50 μ s，窗口时间 200 μ s。

计算

测定荧光信号比 1000*665nm/615nm，由此计算抑制百分比。绘制 logit b 图 (Logit b = LN (%结合/(100%-%结合)，对 Log 浓度作图)，由此计算 IC₅₀。

进行至少两次测定，目的是得到两个相当的化合物 IC₅₀ 值。

结果

得到下列代表性结果：

4-(3-氧代-3,5-二氢吡唑并[4,3-c]喹啉-2-基)苯甲酸

$$IC_{50} = 0.48\mu M$$

2-氯-4-(3-氧代-3,5-二氢吡唑并[4,3-c]喹啉-2-基)苯甲酸

$$IC_{50} = 0.27\mu M$$

3-(3-氧代-3,5-二氢吡唑并[4,3-c]喹啉-2-基)苯甲酸

$$IC_{50} = 0.88\mu M$$

N-[4-(3-氧代-3,5-二氢吡唑并[4,3-c]喹啉-2-基)苯基]琥珀酰

胺酸

$$IC_{50} = 0.6\mu M$$

[4-(3-氧代-3,5-二氢吡唑并[4,3-c]喹啉-2-基)苯基]丙酸

$$IC_{50} = 1.6\mu M$$

2-[4-(3-氧代-3,5-二氢吡唑并[4,3-c]喹啉-2-基)苯甲酰氨基]-2-乙酸

$$IC_{50} = 3.9\mu M$$

4-(3-氧代-3H-苯并噻喃[4,3-c]吡唑-2-基)苯甲酸

$$IC_{50} = 13.5\mu M$$