[19]中华人民共和国国家知识产权局

[51]Int. Cl[7]
C07J 9/00
A61K 31/575 C07J 41/00
C07J 43/00

[12]发明专利申请公开说明书

[21]申请号 00803662.4

[43]公开日 2002年9月11日

[11]公开号 CN 1368977A

[22]申请日 2000.2.9 [21]申请号 00803662.4
[30]优先权
[32]1999.2.10 [33]EP [31]99250040.5
[86]国际申请 PCT/EP00/01074 2000.2.9
[87]国际公布 WO00/47604 英 2000.8.17
[85]进入国家阶段日期 2001.8.10
[71]申请人 舍林股份公司
地址 德国柏林
[72]发明人 托尔斯滕·布卢姆 彼得·埃斯佩林
约阿希姆·库恩克
赫丽斯塔·黑格勒-哈通
莫尼卡·莱瑟

[74]专利代理机构 永新专利商标代理有限公司
代理人 过晓东

权利要求书4页 说明书26页 附图页数0页

[54]发明名称 不饱和胆甾烷衍生物及其在制备调节减数分裂的药物中的应用

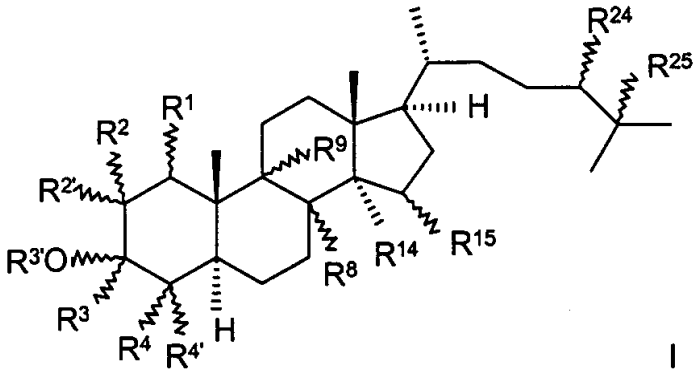
[57]摘要

本发明涉及药物活性的不饱和胆甾烷衍生物,包含这些衍生物作 为活性物质的药物组合物,以及这些新的化合物在制备药物中的应用。更具体而言,已发现本发明的不饱和胆甾烷衍生物可用于调节减数分 裂。

ISSN1008-4274

权 利 要 求 书

1、通式 I 的化合物或其酯：



I

其中：

R^1 代表氢原子、C_2－C_6 烷基、任选经取代的苯基、氰基、CH_2－NH－$COR^{1'}$，或者与 R^2 一起形成另一个键，其中 $R^{1'}$是 C_1－C_8 烷基或者任选经取代的苯基；

R^2 代表氢原子、C_4－C_8 烷基、C_3－C_6 烯基、C_1－C_6 羟基烷基，与 $R^{2'}$一起形成任选取代的亚苄基，与 $R^{2'}$一起形成羟基亚甲基，或者与 R^1 一起形成另一个键；

$R^{2'}$代表氢原子，与 R^2 一起形成任选取代的亚苄基，或者与 R^2 一起形成羟基亚甲基；

R^3 代表氢原子或者与 $R^{3'}$一起形成另一个键；

$R^{3'}$代表氢原子或者与 R^3 一起形成另一个键；

R^4 代表氢原子或者甲基；

$R^{4'}$代表氢原子或者甲基；

R^8 与 R^9 或者与 R^{14} 一起形成另一个键；

R^9 代表氢原子或者与 R^8 一起形成另一个键；

R^{14} 代表 α 一氢原子或者与 R^8 一起形成另一个键，或者与 R^{15} 一起形成另一个键；

R^{15}代表氢原子或者与R^{14}一起形成另一个键；

R^{24}代表氢原子或者与R^{25}一起形成另一个键；

R^{25}代表氢原子或者与R^{24}一起形成另一个键。

其条件是，不包括在 1 和 2 位同时未被修饰的化合物 $R^1=R^2=R^{2'}=H$。

2、如权利要求 1 所述的化合物，其中 R^1 代表氢原子、苯基或者与R^2一起形成另一个键。

3、如权利要求 1 或 2 所述的化合物，其中 R^2 代表 C_4-C_8 烷基、烯丙基或者与 R^1 形成另一个键。

4、如权利要求 1 或 2 所述的化合物，其中 R^2 和 $R^{2'}$代表任选取代的亚苄基。

5、如权利要求 1－4 之一所述的化合物，其是：

2α－烯丙基－4，4－二甲基－5α－胆甾烷－8，14－二烯－3β－醇，

（E）－2－亚苄基－4，4－二甲基－5α－胆甾烷－8，14－二烯－3β－醇，

5α－胆甾烷－1，8，14－三烯－3β－醇，

5α－胆甾烷－1，8，14－三烯－3－酮，

1α－氰基－4，4－二甲基－5α－胆甾烷－8，14－二烯－3β－醇，

1α－氰基－4，4－二甲基－5α－胆甾烷－8，14－二烯－3－酮，

4，4－二甲基－5α－胆甾烷－1，8，14－三烯－3β－醇，

4，4－二甲基－5α－胆甾烷－1，8，14－三烯－3－酮，

（E）－4－[（3β－羟基－4，4－二甲基－5α－胆甾烷－8，14－二

烯－2－亚基）－甲基]苄腈；

（E）－N－[[4－[（3β－羟基－4，4－二甲基－5α－胆甾烷－8，14－二烯－2－亚基）－甲基]苯基]甲基]辛酰胺；

（E）－N－[[4－[（3β－羟基－4，4－二甲基－5α－胆甾烷－8，14－二烯－2－亚基）－甲基]苯基]甲基]－5－（4，4－二氟－5，7－二甲基－4－硼－3a，4a－二氮杂－s－indacen－3－基）戊酰胺；

2α－羟甲基－4，4－二甲基－5α－胆甾烷－8，14－二烯－3α－醇，

2α－辛基－4，4－二甲基－5α－胆甾烷－8，14－二烯－3β－醇，

以及

（E）－4－[（3－氧代－4，4－二甲基－5α－胆甾烷－8，14－二烯－2－亚基）－甲基]苄腈。

6、药物组合物，其包含一种或多种如权利要求 1－5 之一所述的通式 I 化合物作为活性成分。

7、如权利要求 1－5 之一所述的通式 I 化合物在制备减数分裂调节药物中的应用。

8、如权利要求 7 所述的应用，其是用于制备治疗雌性或雄性、优选人的不育症的药物。

9、如权利要求 7 所述的应用，其是用于制备治疗雌性或雄性、优选人的避孕药物。

10、如权利要求 1－5 之一所述的通式 I 化合物在调节人工受精过程中的受精率方面的应用。

11、如权利要求 1—5 之一所述的通式 I 化合物作为工具物质或者作为用于合成生物成像用工具物质的起始物的应用，所述工具物质是用于鉴别所述通式化合物的作用模式。

12、一种调节减数分裂的方法，其包括向需要此等调节作用的受体给药有效量的一种或多种如权利要求 1—5 之一所述的通式 I 化合物。

13、一种调节哺乳动物生殖细胞中的减数分裂的方法，其包括向需要此等调节作用的生殖细胞活体外或体外给药有效量的一种或多种如权利要求 1—5 之一所述的通式 I 化合物。

14、如权利要求 13 所述的方法，其中生殖细胞是卵母细胞或雄性生殖细胞。

说　明　书

不饱和胆甾烷衍生物及其在制备调节减数分裂的药物中的应用

本发明涉及药物活性的不饱和胆甾烷衍生物，包含这些衍生物作为活性物质的药物组合物，以及这些新的化合物在制备药物中的应用。更具体而言，已发现本发明的不饱和胆甾烷衍生物可用于调节减数分裂。

减数分裂是生殖细胞的独特而且是最终的过程。减数分裂包括两个减数分裂过程。第一个分裂过程中，先进行母体基因与父体基因之间的交换，然后染色体对分裂成两个子细胞。这些细胞仅包含染色体和 2c DNA 数量（1n）的一半。第二个减数分裂过程不涉及 DNA 合成。因此，该分裂过程导致仅有 1c DNA 的单倍生殖细胞形成。

减数分裂过程在雄和雌生殖细胞中是类似的，但是时间程序以及形成卵及精子的分化过程有非常大的差异。在生命的早期，通常在出生之前，所有的雌生殖细胞都进入第一个减数分裂过程的前期，但所有的细胞随后在该前期中都以卵母细胞的形式停止（dictyate 状态），直至青春期后开始排卵。这样，从生命的早期，雌性就已具有卵母细胞储备，并用至该储备耗尽。雌性中的减数分裂在受精后才完成，而且每个生殖细胞仅产生一个卵子和两个流产极体。相反地，雄性生殖细胞中的一些仅在青春期后进入减数分裂，并在整个生命过程中形成干群（stem population）生殖细胞。一旦开始，雄细胞中的减数分裂将没有显著延迟地进行，并产生 4 个精子。

对于控制雄性和雌性中减数分裂启动的机理仅知道很少。在卵母细胞中，新的研究表明卵泡嘌呤、次黄嘌呤或腺嘌呤有可能是减数分裂停止的原因（Downs, S. M.等人，*Dev Biol* 82 (1985) 454-458；Epplg. J.

J.等人，*Dev Biol* 119 (1986) 313-312；以及 Downs, S. M.，*Mol Reprod Dev* 35 (1993) 82-94)。Byskov 等人首次描述了在胚胎鼠性腺的培养体系中存在扩散性减数分裂调节物质（Byskov, A. G.等人，*Dev Biol* 52 (1976) 193-200)。减数分裂活化物质（MAS）是由其中正进行减数分裂的胚胎鼠卵巢分泌的，而防止减数分裂的物质（MPS）是由具有休止且非减数分裂的生殖细胞的、已发生形态分化的睾丸释放的。这表明 MAS 和 MPS 的相对浓度调节雄和雌生殖细胞中减数分裂的开始、停止和重新开始(Byskov, A. G.等人，在 The Physiology of Reproduction [Knobil, E. 和 Neil, J. D.编辑]中，Raven Press, New York (1994))。已清楚地知道，如果可以调节减数分裂，则可控制繁殖。最近的一篇文章（Byskov, A. G. 等人，*Nature* 374 (1995), 559-562）描述到可从牛睾丸和人卵泡液中分裂出某些活化卵母细胞减数分裂的甾醇。令人遗憾的是，这些甾醇非常不稳定。因而，如果能够得到更稳定的减数分裂活化化合物，则可非常方便地使用这项令人感兴趣的发现。

可刺激减数分裂而且与本专利申请所要求保护的化合物不同的已知化合物描述在 WO 96/27658 中。

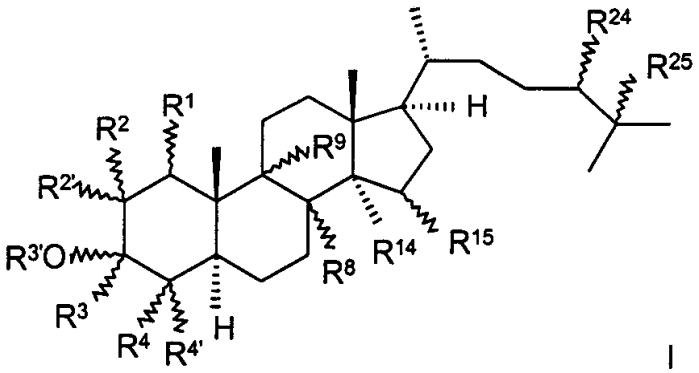
本发明的目的是提供用于通过活化减数分裂来治疗雄性和雌性、特别是人的不育症的化合物。

本发明的再一个目的是提供可通过抑制减数分裂在雌性和雄性、特别是人中作为避孕药的新型化合物。

根据本发明，所提供的新型、稳定的化合物具有令人感兴趣的药理性质。具体而言，在此所述的化合物可用于调节卵母细胞和雄生殖细胞中的减数分裂。

本发明的又一个目的是提供新型的化合物，该化合物对于引入荧光标记物是合适的底物。经连接的分子可设计并合成，用于生物成像的目的。

本发明涉及通式 I 的不饱和胆甾烷衍生物或其酯：



I

其中：

R^1 代表氢原子、C_2－C_6 烷基、任选经取代的苯基、氰基、CH_2－NH－$COR^{1'}$，其中 $R^{1'}$是 C_1－C_8 烷基或者任选经取代的苯基，或者与 R^2 一起形成另一个键；

R^2 代表氢原子、C_4－C_8 烷基、C_3－C_6 烯基、C_1－C_6 羟基烷基，与 $R^{2'}$一起形成任选取代的亚苄基，与 $R^{2'}$一起形成羟基亚甲基，或者与 R^1 一起形成另一个键；

$R^{2'}$代表氢原子，与 R^2 一起形成任选取代的亚苄基，或者与 R^2 一起形成羟基亚甲基；

R^3 代表氢原子或者与 $R^{3'}$一起形成另一个键；

$R^{3'}$代表氢原子或者与 R^3 一起形成另一个键；

R^4 代表氢原子或者甲基；

$R^{4'}$代表氢原子或者甲基；

R^8 与 R^9 或者与 R^{14} 一起形成另一个键；

R^9 代表氢原子或者与 R^8 一起形成另一个键；

R^{14} 代表 α 一氢原子或者与 R^8 一起形成另一个键，或者与 R^{15} 一起形成另一个键；

R^{15} 代表氢原子或者与 R^{14} 一起形成另一个键；

R^{24} 代表氢原子或者与 R^{25} 一起形成另一个键；

R^{25}代表氢原子或者与R^{24}一起形成另一个键。

其条件是，不包括在 1 和 2 位同时未被修饰的化合物 $R^1=R^2=R^{2'}=H$。

通式 I 的化合物在分子中具有多个手性中心，并因而存在几种异构体形式。所有这些异构体形式以及它们的混合物都在本发明的范围内（除非另有说明）。

优选的通式 I 化合物是其中：R^1代表氢原子、苯基或者与 R^2一起形成另一个键。其他优选的化合物是其中：R^2代表 C_4-C_8烷基、烯丙基或者与 R^1形成另一个键。其中 R^2和 $R^{2'}$代表任选取代的亚苄基的化合物也是优选的。

在另一个实施方案中，本发明涉及通式 I 化合物的酯。此等酯是用酸酯化通式 I 化合物的一个或多个羟基而形成的，所述酸例如选自于以下组中：琥珀酸以及其他脂族二羧酸、烟酸、异烟酸、乙基碳酸、磷酸、磺酸、氨基磺酸、苯甲酸、乙酸、丙酸以及其他脂族单羧酸。

本发明之说明书和权利要求书中所使用的烷基在单独或者组合使用时都可以是直链或支链烷基。C_2-C_6烷基是指具有 2－6 个碳原子的烷基，优选的例子是乙基、丙基、异丙基、丁基、叔丁基、戊基、己基和环己基，更优选乙基。类似地，C_1-C_8烷基是指具有 1－8 个碳原子的烷基，其优选的例子是甲基、乙基、丙基、异丙基、丁基、叔丁基、戊基、己基和辛基，更优选是甲基、乙基、丙基、异丙基、丁基和叔丁基，最优选是甲基和乙基。

本发明的式 I 化合物特别优选是以下化合物：

2α－烯丙基－4，4－二甲基－5α－胆甾烷－8，14－二烯－3β－醇，

（E）－2－亚苄基－4，4－二甲基－5α－胆甾烷－8，14－二烯－3β－醇，

5α－胆甾烷－1，8，14－三烯－3β－醇，

5α－胆甾烷－1，8，14－三烯－3－酮，

1α－氰基－4，4－二甲基－5α－胆甾烷－8，14－二烯－3β－醇，

1α－氰基－4，4－二甲基－5α－胆甾烷－8，14－二烯－3－酮，

4，4－二甲基－5α－胆甾烷－1，8，14－三烯－3β－醇，

4，4－二甲基－5α－胆甾烷－1，8，14－三烯－3－酮，

（E）－4－[（3β－羟基－4，4－二甲基－5α－胆甾烷－8，14－二烯－2－亚基）－甲基]苄腈；

（E）－N－[[4－[（3β－羟基－4，4－二甲基－5α－胆甾烷－8，14－二烯－2－亚基）－甲基]苯基]甲基]辛酰胺；

（E）－N－[[4－[（3β－羟基－4，4－二甲基－5α－胆甾烷－8，14－二烯－2－亚基）－甲基]苯基]甲基]－5－（4，4－二氟－5，7－二甲基－4－硼－3a，4a－二氮杂－s－indacen－3－基）戊酰胺；

2α－羟甲基－4，4－二甲基－5α－胆甾烷－8，14－二烯－3α－醇，

2α－辛基－4，4－二甲基－5α－胆甾烷－8，14－二烯－3β－醇，

以及

（E）－4－[（3－氧代－4，4－二甲基－5α－胆甾烷－8，14－二烯－2－亚基）－甲基]苄腈。

本发明的通式I化合物可类似于已知化合物的制备方法来制备。因此，式I化合物的合成可遵循众多甾醇和甾体文献中已经描述的已知合成路径。在合成中可使用以下书籍作为关键参考：L. F. Fieser & M. Fieser: Steroids: Reinhold Publishing Corporation, NY 1959；Rod's Chemistry of Carbon Compounds（编辑：S. Coffery）：Elsevier Publishing Company, 1971；特别是 Dictionary of Steroids（编辑：R. A. Hill; D. N. Kirk; H. L. J. Makin 和 G. M. Murphy: Chapman & Hall。最后一本书中的索引目录包

括了上至1990的原始论文。

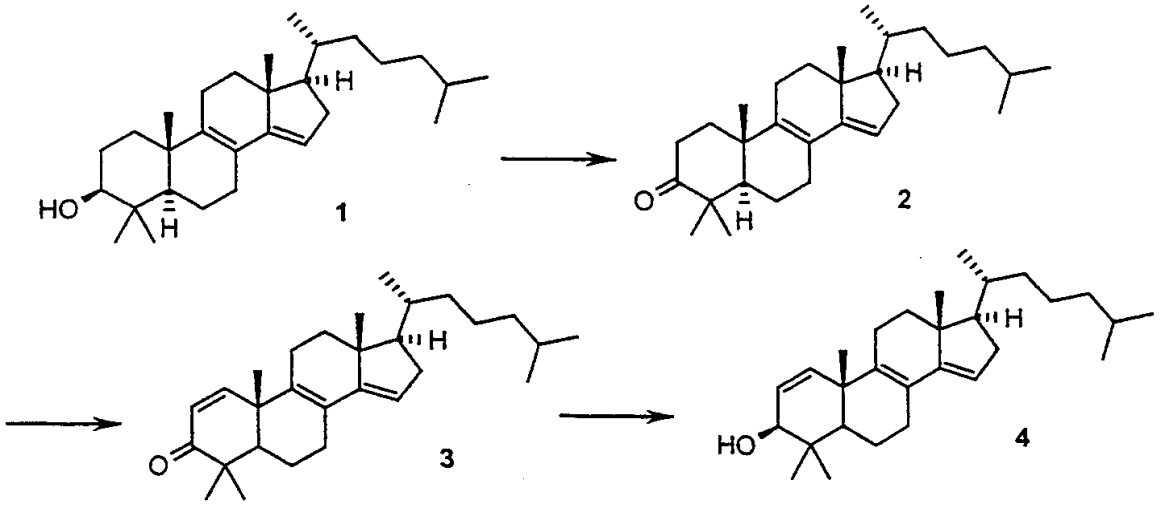
具体而言，本发明的化合物根据一些总的方法来合成：

用作起始物的甾醇可根据文献中的方法来合成：4，4－二甲基－5α－胆甾烷－8，14－二烯－3β－醇、4，4－二甲基－5α－胆甾－8－烯－3β－醇、4，4－二甲基－5α－胆甾－8（14）－烯－3β－醇（*Biochem. J.* 132 (1973), 439），4，4－二甲基－5α－胆甾烷－8，24－二烯－3β－醇、4，4－二甲基－5α－胆甾烷－8，14，24－三烯－3β－醇（*J. Am. Chem. Soc.* 111 (1989), 278），5α－胆甾烷－8，14－二烯－3β－醇（*J. Am. Chem. Soc.* 75 (1953), 4404），5α－胆甾－8－烯－3β－醇（*J. Org. Chem.* 46 (1981), 3421），以及5α－胆甾－8（14）－烯－3β－醇（*Biochem. J.* 144 (1974), 59）。

以下将详细描述4，4－二甲基－Δ－8，14－系列的合成。按照相同的方式由相应的起始物可合成带有或不带有4，4－二甲基的Δ－8、Δ－8（14）、Δ－8，14，24以及Δ－8，24－系列中的衍生物。

用不同的试剂氧化3β－醇，形成相应的3－酮（例如，*Tetrahedron Lett.* 1967, 3699）。4，4－二甲基－5α－胆甾烷－8，14－二烯－3β－醇（1）在四丙基过钌酸铵存在时用N－甲基－吗啉－N－氧化物处理，形成4，4－二甲基－5α－胆甾烷－8，14－二烯－3－酮（2）（例如，*Synthesis* 1994, 639）。

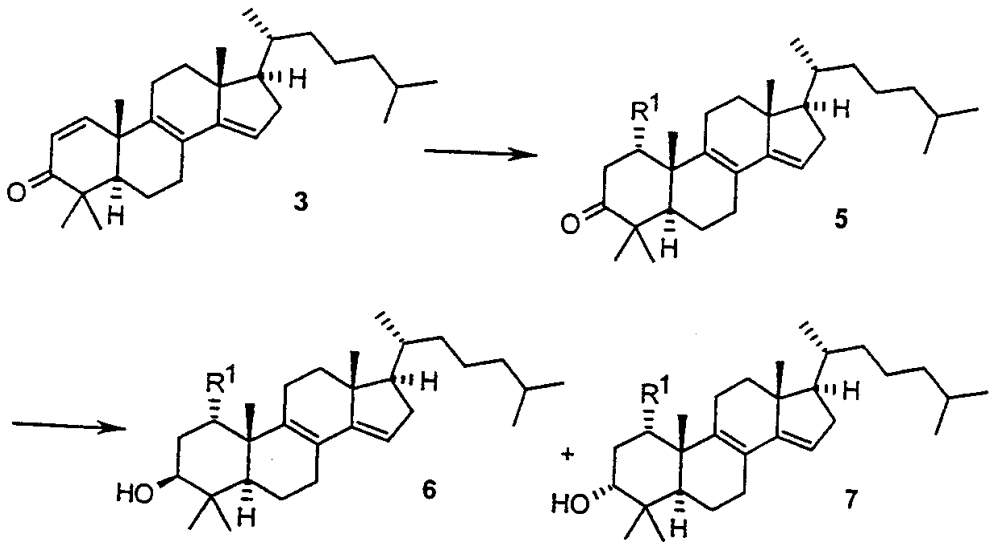
合成路线 1



在下一步中，在氯苯中，用苯基硒酸酐作为氧化剂，在氧化反应中引入Δ－1 双键（*J. Chem Soc. Chem. Commun.* 1978, 952），形成 4，4－二甲基－5α－胆甾烷－1，8，14－三烯－3－酮（3）。如果使用没有 4，4－二甲基的化合物，该反应也可进行。在这些化合物中，新的双键可以Δ1－双键的形式选择性地引入。3－酮基然后可在氯化铈存在时用硼氢化钠还原（Luche 还原反应，例如：*J. Am. Chem. Soc.* 100 (1978), 2226），形成 4，4－二甲基－5α－胆甾烷－1，8，14－三烯－3β－醇（4）。

通过在不饱和酮中添加铜酸酯，可在 1 位处引入烷基和芳基（Tetrahedron Lett. 35 (1994), 8591）。由烷基或芳基锂与碘化亚铜形成的铜酸酯与甾体烯酮反应，形成 1－取代衍生物。如果烯酮（3）用二烷基铜酸酯处理，则可得到式（5）的化合物（R^1＝烷基、芳基）。这些酮然后可根据已知的文献方法还原，形成两个非对映异构体醇（6）和（7）（R^1＝烷基、芳基），它们通过色谱法可容易分离。

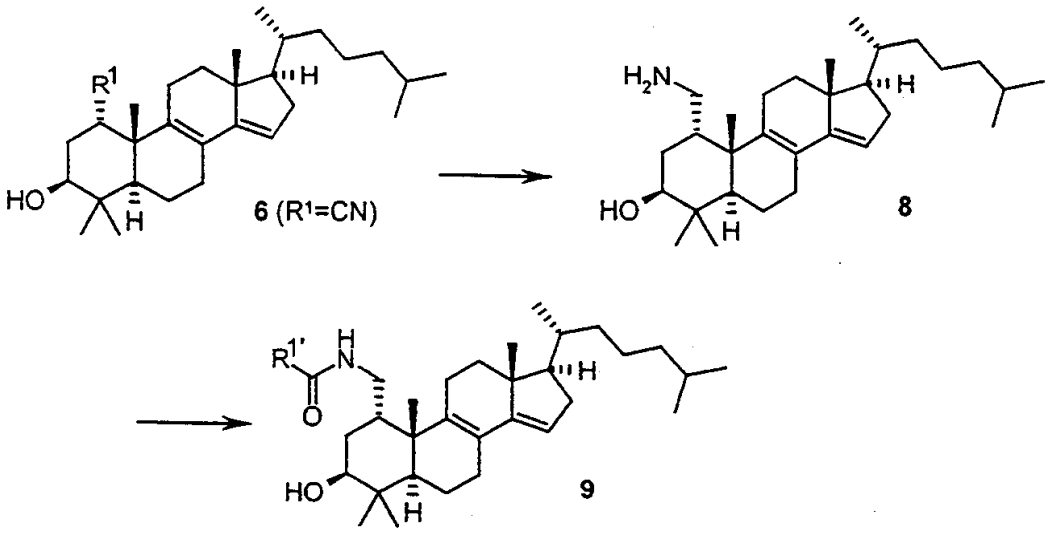
合成路线 2



按照类似的方法可引入氰基。在烯酮（3）中结合加成氰化物，形成所希望的 1α－氰基－4，4－二甲基－5α－胆甾烷－8，14－二烯－3－酮（5）（R^1=CN）。在该反应中可使用不同的试剂，例如二乙基氰化铝（*J. Org. Chem.* 59 (1994), 2766）以及一些碱金属和碱土金属（*Tetrahedron Lett.* 28 (1987), 4189; *Can. J. Chem.* 59 (1981), 1641）。氰基酮（5）（R^1=CN）也可用标准还原剂如硼氢化钠还原，形成两个非对映异构体醇（6）和（7）（R^1=CN），它们通过色谱法可容易分离。

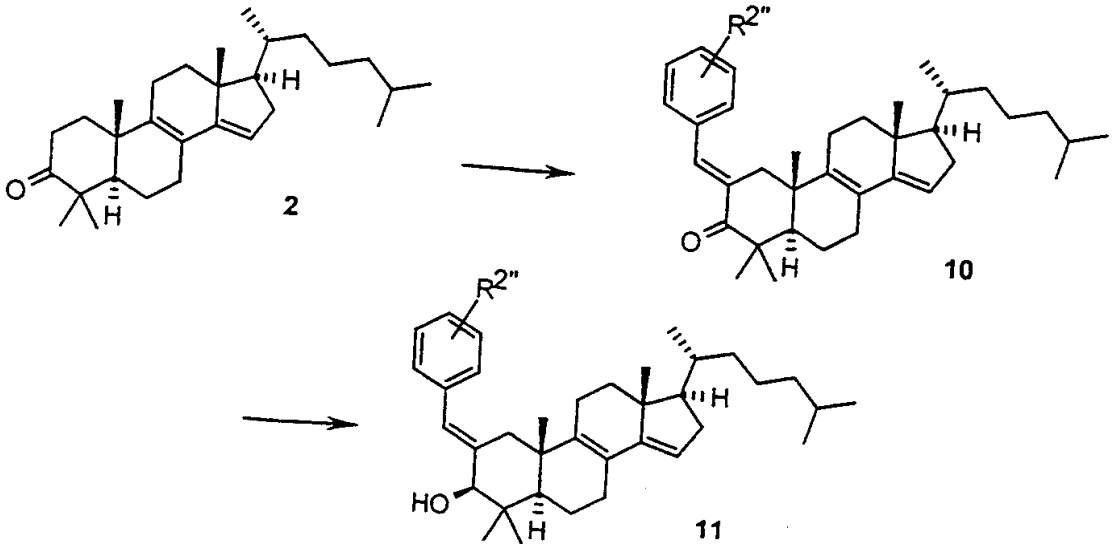
如果氰基醇（6）（R^1=CN，如上进行合成）用氢化铝锂处理，则可得到 1α－氨甲基－4，4－二甲基－5α－胆甾烷－8，14－二烯－3β－醇（8）。这个胺可用于进一步修饰。式（9）的酰胺（$R^{1'}$=烷基、芳基和荧光标记物）可通过所述胺与各种烷基或芳基羧酸的羟基琥珀酰亚胺基酯反应来合成。（在使用包含荧光标记物的羧酸羟基琥珀酰亚胺基酯时可参考：Nonradioactive labeling and detection of biomolecules, Kessler C.编辑, Springer Verlag, Berlin, 1992）。

合成路线 3



2 位的取代基可例如通过 3—羟基丁醛反应和烷基化反应来引入。如果酮（2）在碱存在时用芳香醛处理，则可得到式（10）的 2—亚苄基取代的甾体。芳香环可以是取代的。随后在氯化铈存在下用硼氢化钠进行还原，选择性地形成相应的烯丙基 3β—醇（11）。

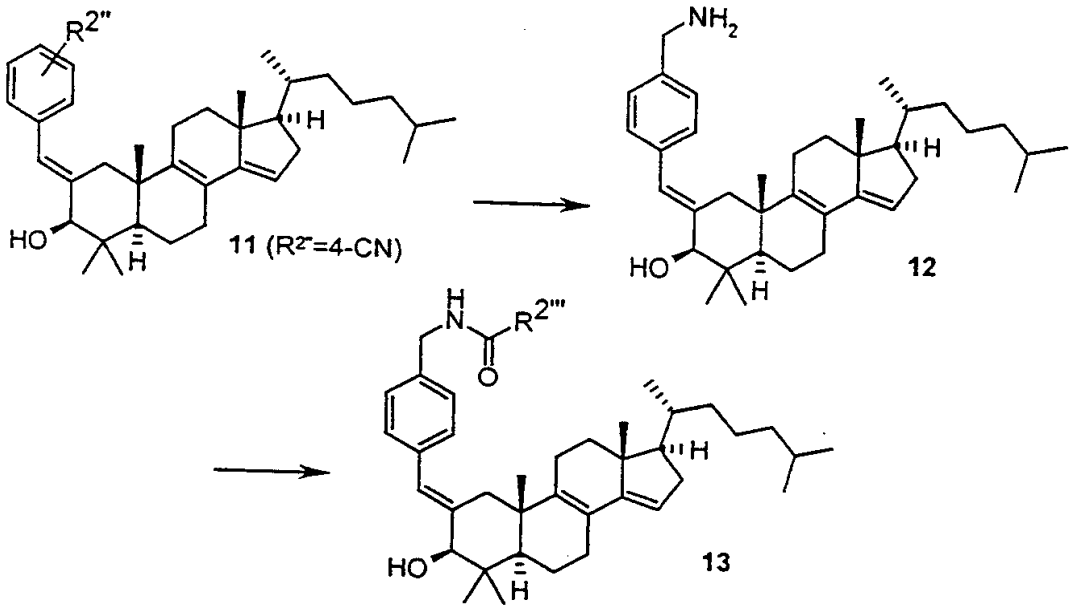
合成路线 4



可如上所示合成的氰基亚苄基取代的化合物（11）（$R^{2"}$=4—CN）

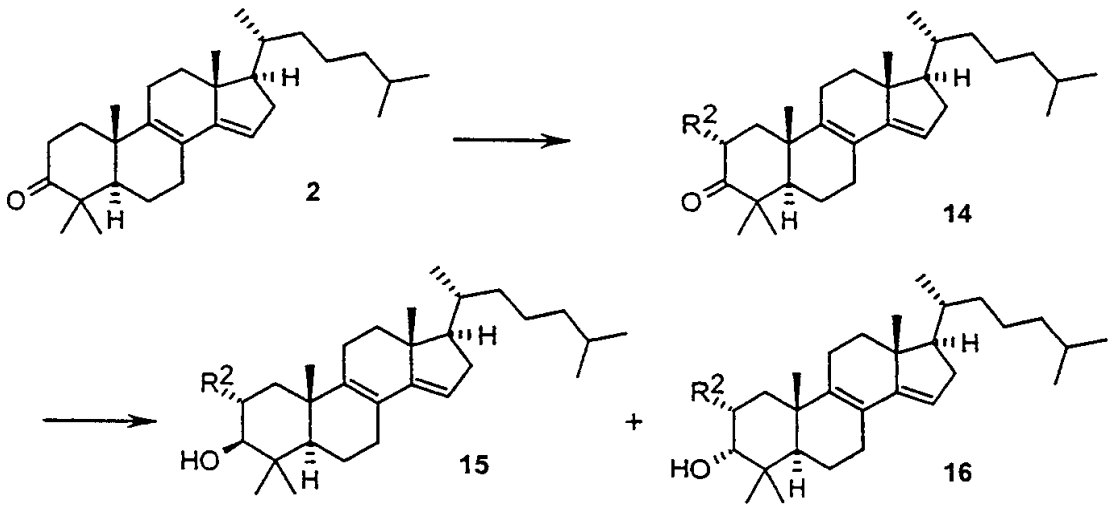
可用于进一步修饰。该氰基可用氢化铝锂还原为苄基胺（12），其可衍生成式（13）的相应酰胺（$R^{2'''}$＝烷基、芳基和荧光标记物）。为此目的，胺（12）用不同羧酸的羟基琥珀酰亚胺基酯衍生物处理。对于该反应，可使用包含荧光标记物的市售酯（参考实施例部分中的实施例 11）。包含荧光标记物的式（13）的酰胺可用作用于生物成像的分子探针。

合成路线 5



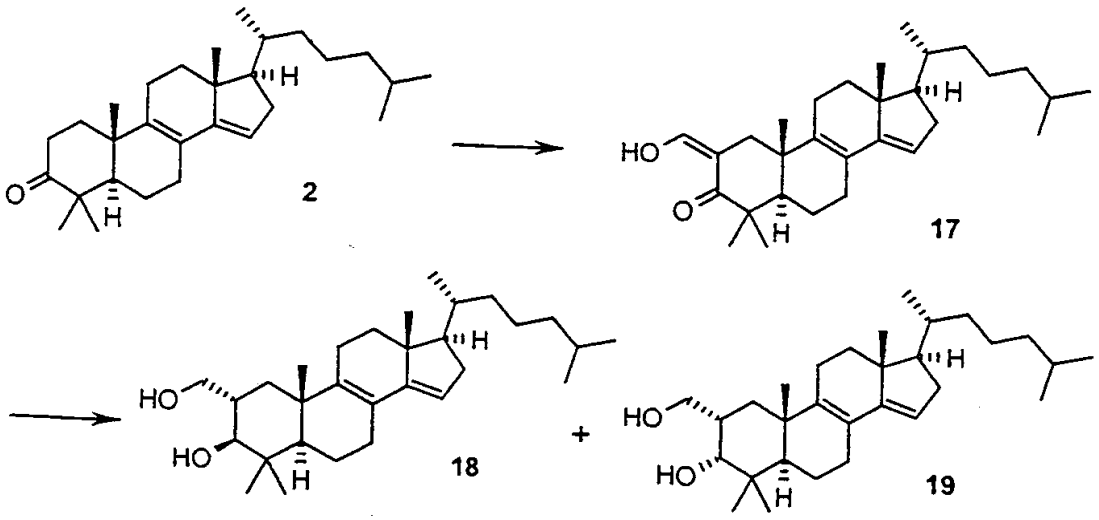
烷基－和烯基取代基可如下引入在 2 位上：使酮（2）脱质子化，然后使烯醇化物与烷基－和烯基卤反应。式（14）的 3－酮然后可用硼氢化钠还原，形成两个非对映异构体醇（15）和（16），它们通过色谱法可容易分离。

合成路线 6



2 位的羟甲基取代基例如可通过脱质子化的 3—酮与烷基甲酸酯的缩合反应来引入，形成烯醇（17）。其用不同的还原剂如硼氢化钠还原，形成两个非对映异构体醇（18）和（19）。

合成路线 7



这些醇在柱色谱上可容易地分离。通过如上所述的烷基化反应（见合成路线 6），可例如引入更长链的羟烷基取代基。

本发明的再一个目的是提供包含一种或多种通式I化合物作为活性物质的药物组合物。这些药物组合物可进一步包含药物学上可接受的、本领域技术人员已知的赋形剂，如载体、稀释剂、吸收促进剂、防腐剂、缓冲剂、渗透压调节剂、片剂崩解剂以及通常用于本领域中的其他成分。固体载体的例子是碳酸镁、硬脂酸镁、葡萄糖、乳糖、蔗糖、滑石、明胶、果胶、黄蓍胶、甲基纤维素、羧甲基纤维素钠、低熔点蜡以及可可脂。

液体组合物包括无菌溶液、混悬液和乳液。此等液体组合物可适用于注射或者用于活体外及体外受精。液体组合物可包含本领域通常使用的其他成分，其中一些如上所述。另外，可以药贴的形式提供用于经皮给药本发明化合物的组合物，并以液体或粉末鼻腔喷雾剂的形式提供用于鼻腔给药的组合物。

本发明化合物的使用剂量可由医师确定，而且取决于多种因素，如所使用的具体化合物、给药途径、以及使用目的。通常情况下，本发明的组合物是如下制备的：使活性化合物与液体或固体辅助成分充分混合，然后如果需要的话，将产品成型为所希望的剂型。

本发明涉及通式I的化合物在制备调节减数分裂的药物中的用于。本发明的化合物影响卵母细胞以及雄生殖细胞中的减数分裂。能够影响减数分裂的前景是多方面的。根据本发明的优选实施方案，通式I的化合物可用于刺激减数分裂。根据本发明的另一个优选实施方案，通式I的化合物可用于刺激人的减数分裂。因此，通式I的化合物可用作新型生育力调节剂，而不会有目前所用避孕药物对体细胞的常见副作用，目前的避孕药物是基于雌激素和/或孕激素。

因此，本发明涉及通式I化合物在缓解雌性和雄性、特别是哺乳动物、尤其是人的不育症中的应用。通过给药于由于自身产生减数分裂活化物质不足而不能形成成熟卵母细胞的雌性，包括妇女，通式I的减

数分裂诱导物质可用于治疗他们中的不育症。

通式 I 的化合物还可用于人工受精程序，例如体外受精或者胞质内精子注射。当进行体外受精时，如果在培养卵母细胞的培养基中添加本发明的化合物，可达到更好的结果。当自身减数分裂活化物质产生不足而使包括男性的雄性发生不育，并由此缺少成熟的精子细胞时，给药本发明的化合物可缓解该问题。

在本发明的再一个方面中，通式 I 的化合物可用作雌性和雄性、特别是哺乳动物、尤其是人的避孕药物。在雌性中用作避孕药物时，可给药减数分裂诱导物质，以便在卵母细胞仍处于生长的卵泡中时，在发生促性腺激素的排卵高峰之前，在卵母细胞中早熟性地诱导减数分裂重新开始。在妇女中，例如在前一次月经停止后一周诱导减数分裂的重新开始。当排卵时，所产生的过度成熟的卵母细胞最没有可能被受精。正常月经周期不会被影响。在此方面，重要的是注意，减数分裂诱导物质的存在不影响经培养的人粒膜细胞（卵泡的体细胞）中孕酮的生物合成，然而目前用作激素避孕药的雌激素和孕激素却会对孕酮的生物合成产生负面影响。

作为上述方法的替代法，给药可抑制减数分裂的本发明化合物，也可在雌性中实现避孕，使得没有成熟卵母细胞产生。类似地，给药可抑制减数分裂的本发明化合物，可在雄性中实现避孕，使得没有成熟精子细胞形成。

在另一个方面中，本发明涉及通式 I 化合物作为工具物质或者作为用于合成生物成像用工具物质的起始物的应用，所述工具物质是用于鉴别所述物质的作用模式。例如，包含荧光标记物的减数分裂活化甾醇可用于使活性物质于其中发挥生物功能的生长细胞的腔显影。该信息可有助于鉴别所述物质的作用模式。

在另一个方面，本发明涉及调节减数分裂的方法，其包括向需要

此等调节作用的受体给药有效量的一种或多种通式 I 化合物。

在又一个方面，本发明涉及调节哺乳动物生殖细胞中的减数分裂的方法，其包括向需要此等调节作用的生殖细胞活体外或体外给药有效量的一种或多种通式 I 化合物。生殖细胞可以是卵母细胞或者是雄性生殖细胞。

包含本发明化合物的组合物的给药途径可以是有效地将活性化合物转运至作用部位处的任何一种途径。

因此，在将本发明的化合物给药于哺乳动物时，其通常是以包含至少一种本发明的化合物以及药物学上可接受的载体的药物组合物的形式提供。在口服使用时，此等组合物优选为胶囊或片剂。

由以上描述可以理解到，所需要的给药方案将取决于待治疗的病症。因此，在用于治疗不育时，可只给药一次，或者在有限的时间内给药，例如直至实现怀孕。

在用作避孕药时，本发明的化合物可连续或者周期性地给药。在用作雌性的避孕药而且不是连续给药时，相对于排卵的给药时间是重要的。

将通过以下实施例进一步描述本发明。

实施例 1：4，4－二甲基－5α－胆甾烷－1，8，14－三烯－3－酮

a) 4，4－二甲基－5α－胆甾烷－8，14－二烯－3－酮

在 6.40 g 的 4，4－二甲基－5α－胆甾烷－8，14－二烯－3β－醇和 4.03 g 的 N－甲基－吗啉－N－氧化物于 32 ml 二氯甲烷中的溶液内添加几个颗粒的分子筛，然后搅拌混合物 5 分钟。在室温下添加 408 mg 的四丙基过钌酸铵，并搅拌所得的黑色反应混合物 1 小时。在 celite 上过滤后，蒸发溶剂，残留物用己烷和乙酸乙酯的混合物进行色谱分离，得到 5.60 g 白色固体状的 4，4－二甲基－5α－胆甾烷－8，14－二烯

－3－酮。

^{1}H-NMR ($CDCl_3$): δ =0.83 (s, 3H, H-18); 0.87 (2x d, J=7 Hz, 6H, H-26/27); 0.94 (d, J=7 Hz, 3H, H-21); 1.07 (s, 3H); 1.12 (2x s, 6H); 2.55 (m, 2H); 5.41 (s, 1H, H-15)

b) 4，4－二甲基－5α－胆甾烷－1，8，14－三烯－3－酮

于室温下将 1.75 g 的苯基硒酸酐添加在 2.00 g 的 4，4－二甲基－5α－胆甾烷－8，14－二烯－3－酮于 30 ml 氯苯中的溶液内。将反应混合物温热至 100℃共 2 小时。冷却并蒸发溶剂后，残留物用己烷和乙酸乙酯的混合物进行色谱分离，得到 0.85 g 油状的 4，4－二甲基－5α－胆甾烷－1，8，14－三烯－3－酮。

^{1}H-NMR ($CDCl_3$): δ =0.84 (s, 3H, H-18), 0.87 (2x d, J=7 Hz, 6H, H-26/27), 0.96 (d, J=7 Hz, 3H, H-21), 1.11 (s, 3H), 1.18 (s, 3H), 1.25 (s, 3H), 5.45 (s, 1H, H-15), 5.95 (d, J=10 Hz, 1H, H-2), 7.33 (d, J=10 Hz, 1H, H-1)

实施例 2：4，4－二甲基－5α－胆甾烷－1，8，14－三烯－3β－醇

在室温下将 14 mg 的硼氢化钠添加在 73 mg 的 4，4－二甲基－5α－胆甾烷－1，8，14－三烯－3－酮和 67 mg 七水氯化铈在甲醇中的悬浮液内。混合物搅拌 4 小时，倾倒在水中，然后用乙醚萃取。分离有机层，用盐水洗涤，在无水硫酸钠上干燥，然后过滤。蒸发溶剂后，残留物用己烷和乙醚的混合物进行色谱分离，得到 43 mg 白色固体状的 4，4－二甲基－5α－胆甾烷－1，8，14－三烯－3β－醇。

^{1}H-NMR ($CDCl_3$): δ =0.82 (s, 3H), 0.85 (s, 3H), 0.87 (2x d, J=7 Hz, 6H, H-26/27), 0.96 (d, J=7 Hz, 3H, H-21), 1.02 (s, 3H), 1.10 (s, 3H), 3.89 (m, 1H, H-3), 5.37 (s, 1H, H-15), 5.50 (dd, J=10 Hz, 1 Hz, 1H, H-1), 5.90 (d, J=10 Hz, 2Hz, 1H, H-2)

实施例 3：5α－胆甾烷－1，8，14－三烯－3β－醇

a) 5α－胆甾烷－8，14－二烯－3β－醇

如实施例 1a 所述，2.40 g 的 5α－胆甾烷－8，14－二烯－3β－醇用 1.11 g 的 N－甲基－吗啉－N－氧化物和 111 mg 四丙基过钌酸铵在 13 ml 二氯甲烷中处理。色谱分离后，得到白色固体状的 5α－胆甾烷－8，14－二烯－3－酮 1.81 g。

^{1}H-NMR ($CDCl_3$): δ =0.82 (s, 3H, H-18), 0.87 (2x d, J=7 Hz, 6H, H-26/27), 0.94 (d, J=7Hz, 3H, H-21), 1.18 (s, 3H, H-19), 5.39 (s, 1H, H-15)

b) 5α－胆甾烷－1，8，14－三烯－3－酮

如实施例 1b 所述，1.81 g 的 5α－胆甾烷－8，14－二烯－3－酮用 1.67 g 的苯基硒酸酐在 29 ml 氯苯中处理。色谱分离后，得到 0.53 g 油状的 5α－胆甾烷－1，8，14－三烯－3－酮。

^{1}H-NMR ($CDCl_3$): δ =0.84 (s, 3H, H-18), 0.86 (2x d, J=7 Hz, 6H, H-26/27), 0.96 (d, J=7 Hz, 3H, H-21), 1.20 (s, 3H, H-19), 5.43 (s, 1H, H-15), 5.91 (d, J=10 Hz, 1H, H-2), 7.42 (d, J=10 Hz, 1H, H-1)

c) 5α－胆甾烷－1，8，14－三烯－3β－醇

如实施例 2 所述，150 mg 的 5α－胆甾烷－1，8，14－三烯－3－酮用 15 mg 的硼氢化钠和 147 mg 的七水氯化铈处理。色谱分离后得到白色固体状的 5α－胆甾烷－1，8，14－三烯－3β－醇 47 mg。

^{1}H-NMR ($CDCl_3$): δ =0.82 (s, 3H, H-18), 0.87 (2x d, J=7 Hz, 6H, H-26/27), 0.95 (d, J=7 Hz, 3H, H-21), 1.07 (s, 3H, H-19), 4.33 (m, 1H, H-3), 5.37 (s, 1H, H-15), 5.56 (dd, J=10 Hz, 1 Hz, 1H, H-1), 6.09 (d, J=10 Hz, 1H, H-2)

实施例 4：1α－氰基－4，4－二甲基－5α－胆甾烷－8，14－二烯－3－酮

在 0℃下将 1.47 ml 的二乙基氰化铝溶液（1 M，在甲苯中）添加在 4，4－二甲基－5α－胆甾烷－1，8，14－三烯－3－酮于 5 ml 四氢呋喃中的溶液内。反应混合物温热至室温，然后搅拌 1 小时。在 0℃下添加 2.45 ml 的氢氧化钠溶液（1 M）后，用水稀释所得混合物，然后用乙醚萃取。分离有机层，用盐水洗涤，在无水硫酸钠上干燥，然后过滤。蒸发溶剂后，残留物用己烷和乙酸乙酯的混合物进行色谱分离，得到白色固体状的 1α－氰基－4，4－二甲基－5α－胆甾烷－8，14－二烯－3－酮 110 mg。

^{1}H-NMR ($CDCl_3$): δ =0.86 (2x d, J=7 Hz, 6H, H-26/27), 0.89 (s, 3H), 0.94 (d, J=7 Hz, 3H, H-21), 1.12 (s, 3H), 1.15 (s, 3H), 1.20 (s, 3H), 2.86 (m, 1H, H-2), 3.29 (dd, J=7Hz, 5 Hz, 1H, H-1), 5.49 (ps, 1H, H-15)

实施例 5：1α－氰基－4，4－二甲基－5α－胆甾烷－8，14－二烯－3β－醇和 1α－氰基－4，4－二甲基－5α－胆甾烷－8，14－二烯－3α－醇

如实施例 5 所述，95 mg 的 1α－氰基－4，4－二甲基－5α－胆甾烷－8，14－二烯－3－酮用 33 mg 的硼氢化钠处理，得到 30 mg 的 1α－氰基－4，4－二甲基－5α－胆甾烷－8，14－二烯－3α－醇和 25 mg 的 1α－氰基－4，4－二甲基－5α－胆甾烷－8，14－二烯－3β－醇。

1α－氰基－4，4－二甲基－5α－胆甾烷－8，14－二烯－3β－醇

^{1}H-NMR ($CDCl_3$): δ =0.83 (s, 3H), 0.87 (2x d, J=7 Hz, 6H, H-26/27),

0.94 (d, J=7 Hz, 3H, H-21), 1.09 (s, 3H), 1.17 (s, 3H), 3.08 (m, 1H, H-1), 3.72 (bm, 1H, H-3), 5.43 (ps, 1H, H-15)

1α－氰基－4，4－二甲基－5α－胆甾烷－8，14－二烯－3α－醇

^{1}H-NMR ($CDCl_3$): δ =0.87 (2x d, J=7 Hz, 6H, H-26/27), 0.91 (s, 3H), 0.93 (d, J=7 Hz, 3H, H-21), 1.08 (s, 3H), 1.15 (s, 3H), 1.28 (s, 3H), 2.92 (m, 1H, H-1), 3.57 (ps, 1H, H-3), 5.44 (ps, 1H, H-15)

实施例 6：（E）－4－[（3－氧代－4，4－二甲基－5α－胆甾烷－8，14－二烯－2－亚基）－甲基]苄腈

将 64 mg 的 4－氰基苯甲醛和 27 mg 的氢氧化钾在 2 ml 乙醇中的悬浮液滴加在 4，4－二甲基－胆甾烷－8，14－二烯－3－酮于 4 ml 乙醇中的悬浮液内。反应混合物搅拌 20 小时，用水稀释，然后用二氯甲烷萃取。分离有机层，用盐水洗涤，在无水硫酸钠上干燥，然后过滤。蒸发溶剂后，残留物用己烷和乙酸乙酯的混合物进行色谱分离，得到 168 mg 白色固体状的（E）－4－[（3－氧代－4，4－二甲基－5α－胆甾烷－8，14－二烯－2－亚基）－甲基]苄腈。

^{1}H-NMR ($CDCl_3$): δ =0.83 (s, 3H), 0.87 (2x d, J=7 Hz, 6H, H-26/27), 0.93 (d, J=7 Hz, 3H, H-21), 0.98 (s, 3H), 1.16 (s, 3H), 1.23 (s, 3H), 2.58 (d, J=17 Hz, 1H, H-1), 3.10 (d, J=17 Hz, 1H, H-1), 5.47 (ps, 1H, H-15), 7.42 (s, 1H, H-2'), 7.53 (d, J=8 Hz, 2H, 芳香), 7.68 (d, J=8 Hz, 2H, 芳香)

实施例 7：（E）－4－[（3β－羟基－4，4－二甲基－5α－胆甾烷－8，14－二烯－2－亚基）－甲基]苄腈

如实施例 2 所述，156 mg 的（E）－4－[（3－氧代－4，4－二甲基－5α－胆甾烷－8，14－二烯－2－亚基）－甲基]苄腈在 111 mg 七

水氯化铈存在下用 12 mg 的硼氢化钠处理，形成 93 mg 白色固体状的（E）－4－[（3β－羟基－4，4－二甲基－5α－胆甾烷－8，14－二烯－2－亚基）－甲基]苄腈。

^{1}H-NMR ($CDCl_3$): δ =0.75 (s, 3H), 0.80 (s, 3H). 0.85 (s, 3H), 0.87 (2x d, J=7 Hz, 6H, H-26/27), 0.92 (d, J=7 Hz, 3H, H-21), 1.18 (s, 3H), 3.02 (d, J=17 Hz, 1H, H-1), 3.94 (m, 1H, H-3), 5.40 (ps, 1H, H-15), 6.78 (s, 1H, H-2'), 7.37 (d, J=8 Hz, 2H, 芳香), 7.64(d, J=8 Hz, 2H, 芳香)

实施例 8：（E）－N－[[4－[（3β－羟基－4，4－二甲基－5α－胆甾烷－8，14－二烯－2－亚基）－甲基]苯基]甲基]辛酰胺

a) （E）－2－（4－氨基甲基－苯基）－亚甲基－4，4－二甲基－5α－胆甾烷－8，14－二烯－3β－醇

使 27 mg 的氢化铝锂和 74 mg 的（E）－4－[（3β－羟基－4，4－二甲基－5α－胆甾烷－8，14－二烯－2－亚基）－甲基]苄腈在 6 ml 的四氢呋喃中回流 4 小时。冷却后，如实施例 3b 所述处理反应混合物。用乙酸乙酯结晶，得到 26 mg 白色固体状的（E）－2－（4－氨基甲基－苯基）－亚甲基－4，4－二甲基－5α－胆甾烷－8，14－二烯－3β－醇。

^{1}H-NMR ($CDCl_3$): δ =0.77 (s, 3H), 0.82 (s, 3H), 0.86 (2x d, J=7 Hz, 6H, H-26/27), 0.89 (s, 3H), 0.92 (d, J=7 Hz, 3H, H-21), 1.18 (s, 3H), 3.15 (d, J=17 Hz, 1H, H-1), 3.86 (s, 2H, Ar-CH_2-N), 3.92 (ps, 1H, H-3), 5.38 (ps, 1H, H-15), 6.72 (s, 1H, H-2'), 7.26 (m, 4H, 芳香)

b)（E）－N－[[4－[（3β－羟基－4，4－二甲基－5α－胆甾烷－8，14－二烯－2－亚基）－甲基]苯基]甲基]辛酰胺

将 8.6 mg 的 N－羟基琥珀酰亚胺基辛酸酯在 1 ml 二甲基甲酰胺中

的溶液于室温下添加至 21 mg（E）－2－（4－氨基甲基－苯基）－亚甲基－4，4－二甲基－5α－胆甾烷－8，14－二烯－3β－醇在 4 ml 二甲基甲酰胺中的溶液内。反应混合物搅拌 20 小时，用水稀释，然后用乙酸乙酯萃取。

分离有机层，用水洗涤，在无水硫酸钠上干燥，然后过滤。蒸发溶剂后得到 21 mg 白色固体状的（E）－N－[[4－[（3β－羟基－4，4－二甲基－5α－胆甾烷－8，14－二烯－2－亚基）－甲基]苯基]甲基]辛酰胺。

^{1}H-NMR ($CDCl_3$): δ =0.77 (s, 3H), 0.82 (s, 3H), 0.86 (2x d, J=7 Hz, 6H, H-26/27), 0.89 (s, 3H), 0.92 (d, J=7 Hz, 3H, H-21), 1.18 (s, 3H), 3.12 (d, J=17 Hz, 1H, H-1), 3.92 (ps, 1H, H-3), 4.44 (d, J=5 Hz, 2H, Ar-CH_2-N), 5.37 (ps, 1H, H-15), 5.76 (t, J=5 Hz, 1H, NH), 6.72 (s, 1H, H-2'), 7.24 (m, 4H, 芳香)

实施例 9：（E）－N－[[4－[（3β－羟基－4，4－二甲基－5α－胆甾烷－8，14－二烯－2－亚基）－甲基]苯基]甲基]－5－（4，4－二氟－5，7－二甲基－4－硼－3a，4a－二氮杂－s－indacen－3－基）戊酰胺

5.0 mg 的 5－（4，4－二氟－5，7－二甲基－4－硼－3a，4a－二氮杂－s－indacen－3－基）戊酸琥珀酰亚胺基酯在 0.5 ml 二甲基甲酰胺中的溶液于室温下添加至 8.9 g 的（E）－2－（4－氨基甲基－苯基）－亚甲基－4，4－二甲基－5α－胆甾烷－8，14－二烯－3β－醇在 2 ml 二甲基甲酰胺中的溶液内。反应混合物搅拌 44 小时，用水稀释，然后用乙酸乙酯萃取。分离有机层，用水洗涤，在无水硫酸钠上干燥，然后过滤。蒸发溶剂后，残留物用己烷和乙酸乙酯的混合物进行色谱分离，得到 6.5 mg 的（E）－N－[[4－[（3β－羟基－4，4－二甲基－5α－胆甾烷－8，14－二烯－2－亚基）－甲基]苯基]甲基]－5－（4，4

－二氟－5，7－二甲基－4－硼－3a，4a－二氮杂－s－indacen－3－基）戊酰胺。

^{1}H-NMR ($CDCl_3$): δ =0.77 (s, 3H), 0.82 (s, 3H), 0.86 (2x d, J=7 Hz, 6H, H-26/27), 0.89 (s, 3H), 0.92 (d, J=7 Hz, 3H, H-21), 1.19 (s, 3H), 2.25 (s, 3H, Ar-Me), 2.55 (s, 3H, Ar-Me), 3.12 (d, J=17 Hz, 1H, H-1), 3.92 (ps, 1H, H-3), 4.44 (d, J=5 Hz, 2H, Ar-CH_2-N), 5.37 (ps, 1H, H-15), 5.87 (m, 1H, NH), 6.09 (s, 1H, 芳香), 6.30 (d, J=5 Hz, 1H, 芳香), 6.70 (s, 1H, H-2'), 6.90 (d, J=5 Hz, 1H, 芳香), 7.24 (m, 4H, 芳香)

实施例 10：2α－烯丙基－4，4－二甲基－5α－胆甾烷－8，14－二烯－3β－醇

a) 2α－烯丙基－4，4－二甲基－5α－胆甾烷－8，14－二烯－3－酮

在－70℃下将 200 mg 的 4，4－二甲基－5α－胆甾烷－8，14－二烯－3－酮在 3 ml 的 THF 中的溶液滴加在新制的二异丙基酰胺锂溶液（5.8 ml，1 M）中。溶液搅拌 1 小时，然后添加 0.07 ml 的 3－碘－丙烯。在 0℃下再搅拌 1 小时后，将反应混合物倾倒在饱和氯化铵溶液中，并用乙酸乙酯萃取。分离有机层，用盐水洗涤，在无水硫酸钠上干燥，然后过滤。蒸发溶剂后，残留物用己烷和乙酸乙酯的混合物进行色谱分离，得到 160 mg 白色固体状的 2α－烯丙基－4，4－二甲基－5α－胆甾烷－8，14－二烯－3－酮。

^{1}H-NMR ($CDCl_3$): δ =0.82 (s, 3H), 0.87 (2x d, J=7 Hz, 6H, H-26/27), 0.93 (d, J=7 Hz, 3H, H-21), 1.10 (2x s, 6H), 1.30 (s, 3H), 2.60 (m, 1H, 烯丙基), 2.77 (m, 1H, 烯丙基), 5.05 (m, 2H, 烯丙基), 5.38 (ps, 1H, H-15), 5.80 (m, 1H, 烯丙基)

b) 2α－烯丙基－4，4－二甲基－5α－胆甾烷－8，14－二烯－3β－醇

如实施例 5 所述，160 mg 的 2α－烯丙基－4，4－二甲基－5α－胆甾烷－8，14－二烯－3－酮用 55 mg 的硼氢化钠处理，得到 15 mg 的 2α－烯丙基－4，4－二甲基－5α－胆甾烷－8，14－二烯－3α－醇和 80 mg 的 2α－烯丙基－4，4－二甲基－5α－胆甾烷－8，14－二烯－3β－醇

2α－烯丙基－4，4－二甲基－5α－胆甾烷－8，14－二烯－3β－醇

^{1}H-NMR ($CDCl_3$): δ =0.81 (s, 3H), 0.85 (s, 3H), 0.87 (2x d, J=7 Hz, 6H, H-26/27), 0.94 (d, J=7 Hz, 3H, H-21), 1.03 (s, 3H), 1.05 (s, 3H), 2.50 (m, 1H), 2.95 (d, J=11 Hz, 1H, H-3), 5.06 (m, 2H, 烯丙基), 5.37 (ps, 1H, H-15), 5.89 (m, 1H, 烯丙基)

2α－烯丙基－4，4－二甲基－5α－胆甾烷－8，14－二烯－3α－醇

^{1}H-NMR ($CDCl_3$): δ =0.82 (s, 3H), 0.87 (2x d, J=7 Hz, 6H, H-26/27), 0.90 (s, 3H), 0.94 (d, J=7 Hz, 3H, H-21), 1.00 (s, 3H), 1.05 (s, 3H), 3.36 (ps, 1H, H-3), 5.05 (m, 2H, 烯丙基), 5.35 (ps, 1H, H-15), 5.85 (m, 1H, 烯丙基)

实施例 11：在卵母细胞实验中测试减数分裂活化物质

动物

由未成熟的体重为 13－16 克的雌性小鼠（C57B1/6J×DBA/2J F1-杂交，Bomholtgaard, Denmark）得到卵母细胞，所述小鼠在受控的光照和温度下饲养。小鼠接受腹膜内注射 0.2 ml 的促性腺激素（Gonal F, Serono, Solna, Sweden，包含 20 IU FSH，或者，Puregon,Organon, Swords, Ireland，包含 20 IU FSH），48 小时后通过颈错位将动物杀死。

卵母细胞的收集和培养

剥离出卵巢，使用一对 27 号针手工破坏卵泡，在立体显微镜下于 Hx－培养基（见下）中分离卵母细胞。球形的裸卵母细胞（NO）显示出完整的生发泡（GV），将其放置在α－最小基本培养基（α－MEM，不含核糖核苷，Gibco BRL，目录号 22561）中，该培养基中添加有 3 mM 的次黄嘌呤（Sigma，目录号 H-9377）、8 mg/ml 的人血清白蛋白（HAS, State Serum Institute, Denmark）、0.23 mM 的 pyrubate（Sigma，目录号 S－8636）、2 mM 的谷氨酰胺（Flow 目录号 16－801）、100 IU/ml 的青霉素和 100μg/ml 的链霉素（Flow，目录号 16－700）。该培养基称为 Hx－培养基。卵母细胞在 Hx－培养基中淋洗 3 次，然后在 4 孔培养板（Nuncion, Denmark）中培养，在各孔中包含 0.4 ml 的 Hx－培养基和 35－45 个卵母细胞。对照（在没有添加测试化合物的 Hx－培养基中培养的卵母细胞 35－45 个）用测试培养基同时进行，该测试培养基具有不同浓度的待测化合物。

在 37℃、100%湿度、5%CO_2 空气的条件下进行培养。培养时间为 22－24 小时。

卵母细胞的检查

在培养期结束后，使用立体显微镜或者具有微分干涉相差设备的倒置显微镜计数具有生发泡（GV）或生发泡碎片（GVB）的卵母细胞以及具有极体（PB）的卵母细胞的数量。在测试培养基中计算总卵母细胞数量中具有 GVB 的卵母细胞百分比以及总卵母细胞数量中具有 PB 的卵母细胞的百分比，并与对照培养基相比。

实施例 12：在卵母细胞实验中测试减数分裂抑制物质

使用如实施例 11 中描述的相同方法（见上），由经过 FSH 处理的

未成熟的雌性小鼠中得到生发泡（GV）卵母细胞。裸露的卵母细胞（NO）在 Hx－培养基中淋洗 3 次。以前已表明 4，4－二甲基－5α－胆甾烷－8，14，24－三烯－3β－醇（FF－MAS）可在体外诱导 NO 中的减数分裂（Byskov, A. G.等人，Nature 374 (1995) 559-562）。于 4 孔培养板（Nunclon, Denmark）中 NO 在 Hx－培养基中培养，该培养基中添加有 5μM 的 FF－MAS，并与不同浓度的测试化合物共同培养，各孔包含 0.4 ml 的 Hx－培养基和 35－45 个卵母细胞。一个正对照（在包含 FF－MAS 的 Hx-培养基中培养的 35－45 个卵母细胞，其中不添加测试化合物）总是用测试培养基同时进行，该测试培养基中添加有不同浓度的待测试化合物。另外，与正对照同时进行一个负对照（仅在 Hx-培养基中培养的 35－45 个卵母细胞）。

卵母细胞的检查

在培养期结束后，使用立体显微镜或者具有微分干涉相差设备的倒置显微镜计数具有生发泡（GV）或生发泡碎片（GVB）的卵母细胞以及具有极体（PB）的卵母细胞的数量。在测试培养基中计算总卵母细胞数量中具有 GVB 的卵母细胞百分比以及总卵母细胞数量中具有 PB 的卵母细胞的百分比，并与对照培养基相比。

实施例 13：在“体外受精实验”中测试减数分裂活化物质

由未成熟的（C57BL/6xDBA/2）F1 小鼠（21－24 天龄）的卵泡中得到裸露的卵母细胞（NkO）和堆积（cumulus）封闭的卵母细胞（CEO），所述小鼠已在收集卵母细胞前 48 小时 i.p.接受 10 IU Pregnant Mare 血清促性腺激素（FSH 活性）。

汇集卵母细胞（NkO 和 CEO），并在改良的α－MEM 培养基中培养约 20 小时，所述培养基包含 3 mM 的次黄嘌呤（Hx－培养基）和 1 mg

肽球蛋白/ml 培养基。使用两组卵母细胞：（a）对照卵母细胞，在无 Hx－培养基中培养（正对照组），以及（b）在包含测试化合物的 Hx-培养基中培养的卵母细胞。约 20 小时后，表现出生发泡碎片（GVB）的卵母细胞在无 Hx-培养基中简单洗涤，然后转移至预先准备好的受精盘中，该受精盘包括由雄性小鼠的附睾尾（cauda epididymis）得到的能动的精子制剂。所述盘在特定的气体条件（5%CO_2）和 37℃下于改良的α－MEM IVF－培养基中培养。受精后 20－22 小时检查卵母细胞，以检查受精情况并记录 2－细胞胚胎的数量。用已分离为 2－细胞胚胎的卵母细胞相对于总受精数量来测定受精百分比（＝受精率）。用总共 50－200 个 GVB/PB 卵母细胞进行各 IVF－实验。计算包含测试化合物的组中以及对照组中受精率的比例，由此计算刺激系数。

表 1：在裸露的鼠卵母细胞中减数分裂的活化

化合物	卵母细胞（n）			活化作用(%)
	GV	GVB	PB	GVB＋PB
对照（Hx）	39	0	1	2.6
10μM FF－MA	5	29	4	86.8
10μM 4，4－二甲基－5α－胆甾烷－1，8，14－三烯－3β－醇	9	18	5	71.9

Hx＝次黄嘌呤

GV＝生发泡

GVB＝生发泡碎片

PB＝极体

n＝卵母细胞数量

表 2：在裸露的鼠卵母细胞中减数分裂的相对抑制作用

化合物	卵母细胞（n）			抑制作用
	GV	GVB	PB	(%)
对照（Hx）	34	2	0	100
5μM FF－MA	6	28	0	0
5μM FF－MA ＋ 40μM 1α－氰基－4，4－二甲基－5α－胆甾烷－8，14－二烯－3－酮	38	0	0	107

Hx＝次黄嘌呤，GV＝生发泡

GVB＝生发泡碎片，PB＝极体

n＝卵母细胞数量

表 3：在裸露的鼠卵母细胞中减数分裂的相对抑制作用

化合物	卵母细胞（n）			抑制作用
	GV	GVB	PB	(%)
对照（Hx）	34	2	0	100
5μM FF－MA	6	28	0	0
5μM FF－MA ＋ 10μM（E）－N－[[4－[（3β－羟基－4，4－二甲基－5α－胆甾烷－8，14－二烯－2－亚基）－甲基]苯基]甲基]辛酰胺	25	13	0	63

Hx＝次黄嘌呤，GV＝生发泡

GVB＝生发泡碎片，PB＝极体

n＝卵母细胞数量