

[19] 中华人民共和国国家知识产权局

[51] Int. Cl<sup>7</sup>

C07D495/04

A61K 31/505 A61P 15/08



# [12] 发明专利申请公开说明书

[21] 申请号 02817260.4

[43] 公开日 2004年12月1日

[11] 公开号 CN 1551884A

[22] 申请日 2002.8.29 [21] 申请号 02817260.4

[30] 优先权

[32] 2001.9.4 [33] EP [31] 01203327.0

[86] 国际申请 PCT/EP2002/009647 2002.8.29

[87] 国际公布 WO2003/020726 英 2003.3.13

[85] 进入国家阶段日期 2004.3.3

[71] 申请人 阿克佐诺贝尔公司

地址 荷兰阿纳姆

[72] 发明人 R·G·J·M·汉森

C·M·提姆斯

[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

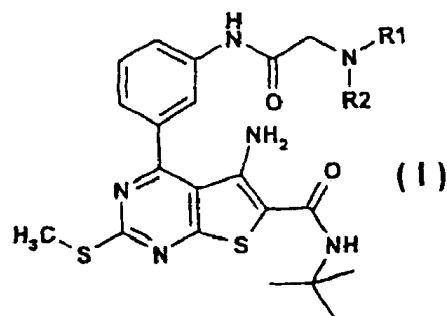
代理人 郭建新

权利要求书1页 说明书18页

[54] 发明名称 具有 LH 与 FSH 联合激动活性的噻吩并 [2,3-d] 嘧啶

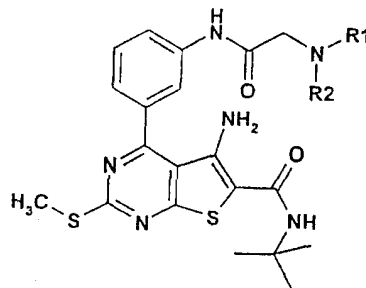
[57] 摘要

本发明涉及通式 I 的噻吩并 [2,3-d] 嘧啶衍生物或其药学上可接受的盐，其中 N(R1)R2 连接成(2-6C)杂环烷基环。本发明的化合物具有 LH 以及 FSH 受体活化活性，能够用在调节生育力的疗法中。



ISSN 1008-4274

## 1、通式 I 的噻吩并[2,3-d]嘧啶衍生物



(式 I)

或其药学上可接受的盐，其中 R1 和 R2 与它们所键合的氮原子一起构成具有 2-6 个碳原子的环，该环可选地含有一个或多个选自 N、O 和/或 S 的杂原子。

2、化合物，选自叔丁基 5-氨基-2-甲硫基-4-(3-(2-(氮杂环丁烷-1-基)-乙酰氨基)-苯基)-噻吩并[2,3-d]嘧啶-6-酰胺；叔丁基 5-氨基-2-甲硫基-4-(3-(2-(吗啉-4-基)-乙酰氨基)-苯基)-噻吩并[2,3-d]嘧啶-6-酰胺；叔丁基 5-氨基-2-甲硫基-4-(3-(2-(硫代吗啉-4-基)-乙酰氨基)-苯基)-噻吩并[2,3-d]嘧啶-6-酰胺；叔丁基 5-氨基-2-甲硫基-4-(3-(2-(哌啶-1-基)-乙酰氨基)-苯基)-噻吩并[2,3-d]嘧啶-6-酰胺；叔丁基 5-氨基-2-甲硫基-4-(3-(2-(吡咯烷-1-基)-乙酰氨基)-苯基)-噻吩并[2,3-d]嘧啶-6-酰胺和叔丁基 5-氨基-2-甲硫基-4-(3-(2-(哌嗪-1-基)-乙酰氨基)-苯基)-噻吩并[2,3-d]嘧啶-6-酰胺。

3、用于治疗的根据权利要求 1-2 的化合物。

4、药物组合物，包含根据权利要求 1-2 的噻吩并[2,3-d]嘧啶化合物或其药学上可接受的盐或溶剂化物以及药学上可接受的助剂。

5、根据权利要求 1-2 的噻吩并[2,3-d]嘧啶化合物或其药学上可接受的盐或溶剂化物在用于生育控制的药物制造中的用途。

6、治疗患者生育障碍的方法，该方法对需要的患者给以有效量的根据权利要求 1-2 的化合物。

## 具有 LH 与 FSH 联合激动活性的 噻吩并[2,3-d]嘧啶

本发明涉及具有糖蛋白激素激动活性的化合物，特别是具有促黄体激素(LH)和促卵泡激素(FSH)激动活性的化合物。本发明还涉及含有它们的药物组合物以及这些化合物在医疗中的用途，特别是用于生育控制。

促性腺激素在多种机体功能中起到重要功能，包括代谢、温度调节和生殖过程。垂体促性腺激素 FSH 和 LH 例如在刺激卵泡发育和成熟中扮演关键角色，LH 参与诱导排卵过程(Sharp, R. M. Clin. Endocrinol 33: 787-807, 1990; Dorrington and Armstrong, Recent Prog. Horm. Res 35: 301-342, 1979; Levy et al, Human Reproduction 15: 2258- 2265, 2000)。

目前，LH 在临床上与 FSH 联合用于刺激卵巢，也就是过度刺激卵巢，用于不孕不排卵妇女的体外受精(IVF)和诱导排卵(Insler, V., Int. J. Fertility 33: 85-97, 1988, Navot and Rosenwaks, J. Vitro Fert. Embryo Transfer 5: 3-13, 1988)，以及用于男性性腺机能减退症和男性不育。

促性腺激素作用于特殊的生殖腺细胞类型，引发卵巢和睾丸的分化和类固醇合成。这些垂体与胎盘激素的作用受特异性血浆膜受体的介导，这些血浆膜受体是一大家族 G-蛋白偶联受体的成员。它们由单一的多肽和七种跨膜结构域组成，能够与 Gs 蛋白发生相互作用，引起腺苷酸环化酶的活化。

用于治疗目的的促性腺激素能够从人尿来源分离，但是纯度低(Morse et al, Amer. J. Reproduct. Immunol. and Microbiology 17: 143, 1988)。作为替代选择，它们可以作为重组的促性腺激素被制备。除了这些蛋白质以外，促性腺激素受体能够被合成的小分子化

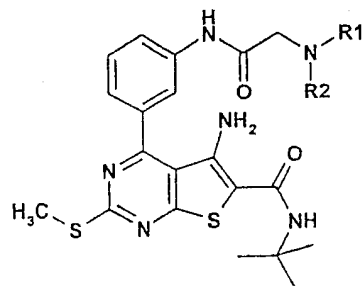
合物活化或灭活。WO 00/61586 已经描述了二环杂芳族化合物。体外和体内实验显示，它们可用作 LH 激动剂。

在正常的女性中，垂体 LH 和 FSH 的释放是以中期突然释放为特征的，它先于排卵。排卵是以三种不同的生理现象为特征的，也就是卵母细胞成熟、卵泡破裂和黄体化。LH 突然释放在体内诱导这些现象中的角色是毋庸置疑的，而 FSH 突然释放的角色不太清楚。不过，最近已经显示，FSH 在体外通过诱导丘细胞产生一种因子来诱导卵母细胞成熟，该因子明确地克服次黄嘌呤诱发的减数分裂抑制 (Lu et al, Mol. Cell. Endocrinol. 164: 191-196, 2000)。该因子被认为是一种减数分裂活化甾醇 (MAS)。

在排卵诱导中，可取的是以 LH 的效应为主。按照本发明，已经发现了当在用于增强生育力的方案中使用具有特别有利的性质的化合物。在这些化合物中，LH 活性伴有 FSH 活性。

因此，本发明提供除了 LH 活性以外还意外地具有 FSH 活性的小分子化合物。一般而言，这些化合物是噻吩并 [2,3-d] 嘧啶，其在嘧啶环的 4-位被苯基取代，该苯基又在间位被取代。

本发明涉及通式 I 的噻吩并 [2,3-d] 嘧啶衍生物



(式 I)

或其药学上可接受的盐，其中 N(R1)R2 连接成 (2-6C) 杂环烷基环。

最优选的化合物是叔丁基 5-氨基-2-甲硫基-4-(3-(2-(氮杂环丁烷-1-基)-乙酰氨基)-苯基)-噻吩并 [2,3-d] 嘧啶-6-酰胺；叔丁基 5-氨基-2-甲硫基-4-(3-(2-(吗啉-4-基)-乙酰氨基)-苯基)-噻吩并 [2,3-d] 嘧啶-6-酰胺；叔丁基 5-氨基-2-甲硫基-4-(3-(2-(硫代吗啉-4-基)-乙酰氨基)-苯基)-噻吩并 [2,3-d] 嘧啶-6-酰胺；叔丁基 5-氨基

基-2-甲硫基-4-(3-(2-(哌啶-1-基)-乙酰氨基)-苯基)-噻吩并[2,3-d]嘧啶-6-酰胺;叔丁基 5-氨基-2-甲硫基-4-(3-(2-(吡咯烷-1-基)-乙酰氨基)-苯基)-噻吩并[2,3-d]嘧啶-6-酰胺和叔丁基 5-氨基-2-甲硫基-4-(3-(2-(哌嗪-1-基)-乙酰氨基)-苯基)-噻吩并[2,3-d]嘧啶-6-酰胺。

式 I 定义中的术语连接成(2-6C)杂环烷基环意味着 R1 和 R2 与它们所键合的氮原子一起构成具有 2-6 个碳原子的环,该环可选地含有一个或多个选自 N、O 和/或 S 的杂原子。这类环的实例有氮杂环丁烷、吡咯烷、哌啶、哌嗪、吗啉和硫代吗啉。

已经发现,上述式 I 化合物显示激动性 LH 和 FSH 活性。在一项体外生物测定中,分别使用被人 LH 或 FSH 受体稳定转染的 CHO 细胞,发现 LH 受体的  $EC_{50}$  小于  $5 \cdot 10^{-8}M$ , 而 FSH 受体的  $EC_{50}$  小于  $10^{-5}M$ 。通常,FSH 活性是 LH 激动剂刺激活性的约 1%至约 10%。

本发明进一步涉及药物组合物,包含具有通式 I 的噻吩并[2,3-d]嘧啶衍生物或其盐。

因而,本发明的化合物能够用于治疗。本发明的进一方面涉及具有通式 I 的噻吩并[2,3-d]嘧啶化合物在药物制造中的用途,该药物用于生育控制,更优选地用于诱导排卵。本发明化合物用于活化 LH 和 FSH 受体。本发明的化合物因此能够用在治疗女性生育问题的方法中。

为了用于治疗用途,式 I 化合物的盐是其中抗衡离子是药学上可接受的那些。不过,式 I 的碱的酸加成盐例如也可以用于制备或纯化药学上可接受的化合物。所有的盐,无论药学上可接受与否,都包括在本发明的范围内。

酸加成盐的实例包括从无机酸和有机酸衍生的那些,无机酸是例如盐酸、磷酸、硫酸,优选盐酸,有机酸是例如枸橼酸、酒石酸、乙酸、乳酸、马来酸、丙二酸、富马酸、乙醇酸、琥珀酸等。

式 I 化合物或其药学上可接受的盐在本文中也称为活性成分,适合于它们的给药途径有肌肉注射、皮下注射、静脉内注射或腹膜内注射、口服和鼻内给药。优选地,所述化合物可以被口服给药。活性

成分或其药物组合物的精确给药剂量和计划必然依赖于所要实现的治疗效果（不育的治疗；避孕），并可以因特定化合物、给药途径和接受药物治疗的个体的年龄和状况而异。

一般而言，肠胃外给药要求比更依赖于吸收的其他给药方法更少的剂量。不过，人用剂量优选地含有 0.0001 - 25mg/kg 体重。所需的剂量可以作为一次剂量或按适当的间隔在当天内给药的多个子剂量。在女性受治疗者的情况下，剂量可以按适当的日期间隔在月经周期内给药，用于供养卵泡，或者作为单一剂量给药，用于诱导排卵。给药的剂量以及计划在女性与男性受治疗者之间可以有所差异。

在体外或离体（*ex vivo*）应用中，例如在 IVF 应用中，在培养基中使用本发明的化合物，浓度大约 0.01 - 5 $\mu$ g/ml。

本发明因而还涉及药物组合物，包含式 I 的噻吩并[2,3-d]嘧啶化合物以及药学上可接受的助剂，和可选的其他治疗剂。在与组合物其他成分相容并且对其受治疗者无害的意义上，助剂必须是“可接受的”。

药物组合物包括适合于口服、直肠、鼻、局部（包括透皮、颊和舌下）、阴道或肠胃外（包括皮下、肌内、静脉内和皮内）给药的那些。组合物可以通过药学领域熟知的任何方法加以制备，例如利用例如下述文献中公开的方法：Gennaro et al., *Remington's-Pharmaceutical Sciences* (18th ed., Mack Publishing company, 1990, 尤其参见 Part 8: *Pharmaceutical Preparations and Their Manufacture*)。

这类方法包括将活性成分与任何辅助剂结合的步骤。辅助剂也被称为附加成分，包括本领域常用的那些（Gennaro，出处同上），例如填充剂、粘合剂、稀释剂、崩解剂、润滑剂、着色剂、矫味剂和润湿剂。

适合于口服给药的药物组合物可以呈现为离散的剂量单元，例如丸剂、片剂或胶囊剂，或者粉剂或颗粒剂，或者溶液剂或混悬剂。活性成分还可以呈现为大丸剂或糊剂。所述组合物还可以被加工成栓剂或灌肠剂，用于直肠给药。

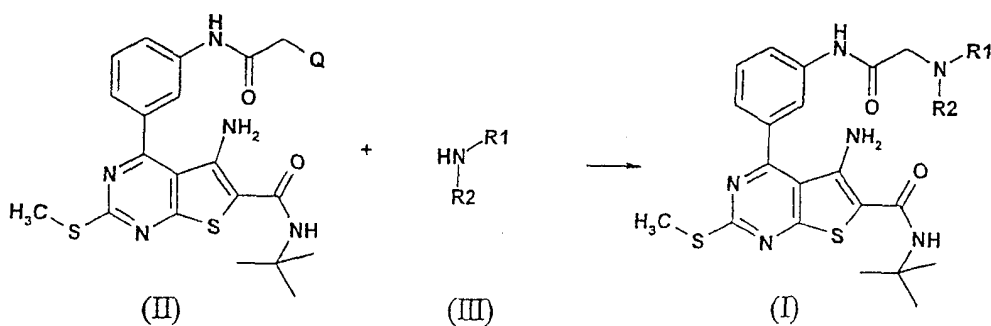
就肠胃外给药而言，适合的组合物包括水性和非水性无菌注射剂。组合物可以存在于单剂量或多剂量容器内，例如密封的小瓶和安瓿，并可以贮存在冷冻干燥（冻干）状况下，仅需在使用前加入无菌的液体载体，例如水。

适合于鼻吸入给药的组合物或制剂包括微细的粉剂或雾剂，它们可以借助计量剂量的加压气溶胶、雾化器或吹入器而生成。

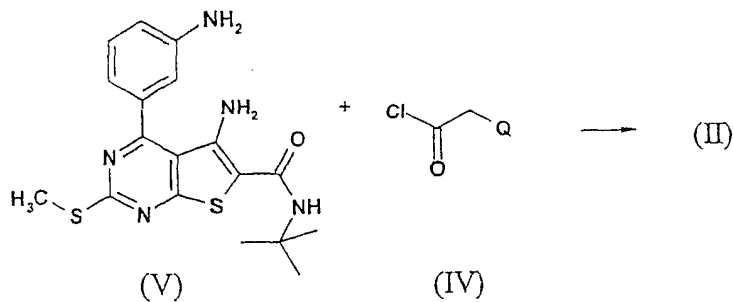
本发明的噻吩并[2,3-d]嘧啶化合物还可以以可植入药具的形式给药，所述药具由包有释放速率调节膜的活性材料核心组成。这类植入物被皮下或局部应用，将按大约恒定的速率释放活性成分达相当长的时间，例如数周至数年。这类可植入药具的制备方法是本领域已知的，例如欧洲专利 0,303,306 (AKZO N.V.) 所述。

因而，本发明的化合物能够用于与天然 LH 相同的临床目的，其优点是它们具有 FSH 活性，显示改变了的稳定性，并且能够被不同地给药。

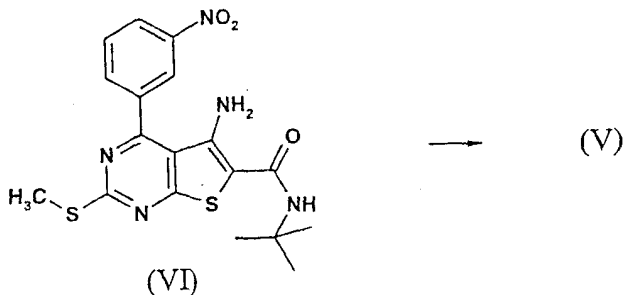
式(I)的本发明化合物一般可以这样制备：在适当的溶剂例如 N,N-二甲基甲酰胺或 THF 中，在室温下，在叔胺碱例如 N,N-二异丙基乙胺 (DIPEA) 存在下，用通式 (III) 的（环状）仲胺对其中 Q = Cl 或 Br 的卤化物 (II) 进行亲核取代。



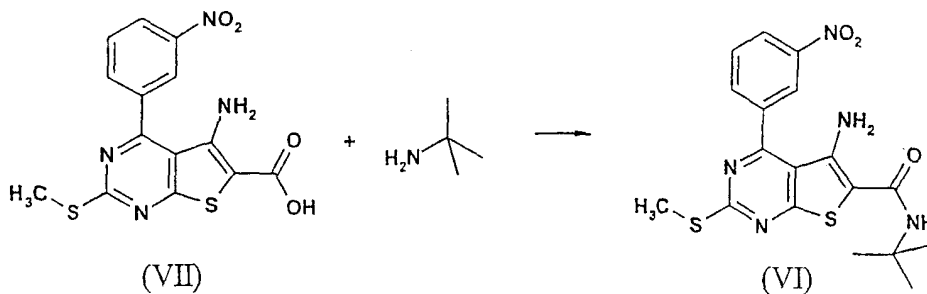
其中 Q = Cl 或 Br 的式 (II) 衍生物可以这样制备：在叔胺碱例如 N,N-二异丙基乙胺存在下，在适合的溶剂例如二氯甲烷或 THF 中，进行式 (V) 的间苯胺衍生物与其中 Q = Cl 或 Br 的 (IV) 型酰氯的区域选择性酰化。



式(V)化合物可以这样获得: 使用适当的还原剂, 例如氯化锡(II), 在质子溶剂例如乙醇中, 在盐酸的存在下, 在升高的温度下, 进行式(VI)衍生物中硝基官能的本领域已知的还原(J. Heilbron, J. Chem. Soc, 1279 (1940))。

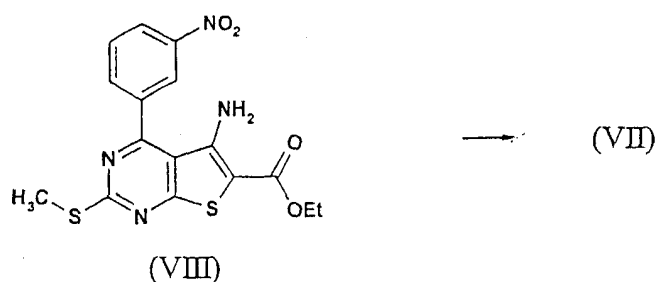


噻吩并嘧啶(VI)可以这样获得: 在偶联剂例如O-(苯并三唑-1-基)-N,N,N',N'-四甲基脲磺四氟硼酸盐(TBTU)或溴代三吡咯烷子基磷六氟磷酸盐(PyBrOP), 和叔胺碱例如N,N-二异丙基乙胺作用下, 进行羧酸(VII)与叔丁胺的缩合。

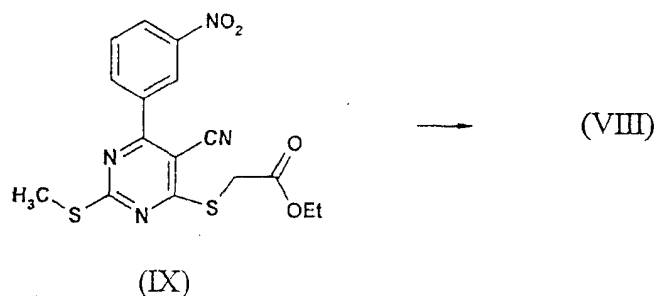


乙基酯(VIII)皂化成相应的羧酸(VII)是在碱例如氢氧化锂、氢氧化钾或氢氧化钠存在下, 在含水的二噁烷中, 在高温下(80°C至回流)

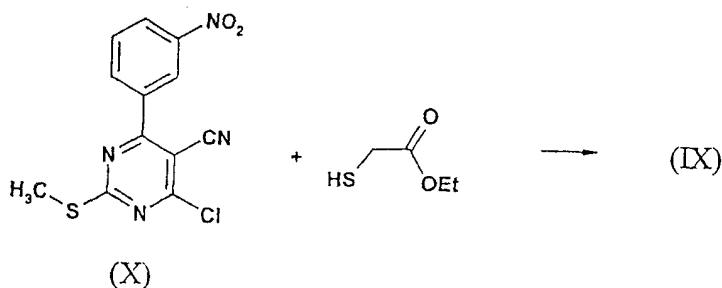
进行的。



二环(VIII)是这样生成的：在N,N-二异丙基乙胺的媒介下，进行氯化物(X)与巯基乙酸乙酯的取代，然后进行中间体硫醚(IX)的碱催化合环。这种类型的噻吩并[2,3-d]嘧啶环生成已经描述在 S. A. Abdel-Hady, M. A. Badawy, Y. A. Ibrahim, Sulfur Lett. 9, 101 (1989)和 S. Tumkevicius, Liebigs Ann., 1703 (1995)中。

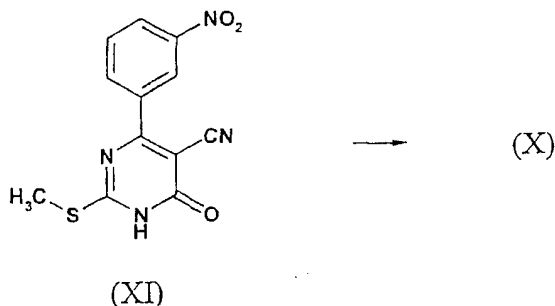


环化反应的合适条件是乙醇钠的乙醇溶液或N,N-二异丙基乙胺的甲苯/乙醇(1/1, v/v)溶液，在回流温度下。

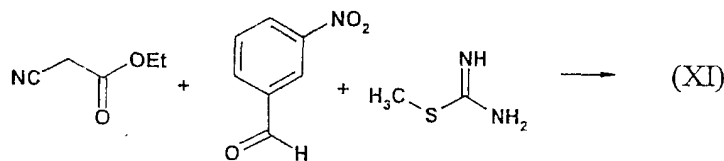


必需的氯代亚胺(X)可以遵照文献工艺合成，例如 A. A. Santilli, D. H. Kim and S. V. Wanser, J. Heterocycl. Chem. 8, 445, 1971 所述。按照该工艺，在高温下(80°C 至回流)，用 POCl<sub>3</sub> 处理内酰胺

(XI)，得到氯化物 (X)。向反应混合物加入适当的溶剂例如二噁烷，和/或加入  $\text{PCl}_5$  或 N,N-二甲基苯胺，可以缩短反应时间，提高氯化物 (X) 收率。



生成内酰胺 (XI) 的适当途径包括在乙醇中，在碱例如碳酸钾作用下，在高温 (60°C) 下，进行氰基乙酸乙酯与 3-硝基苯甲醛和 S-甲基异硫脲的多组分缩合。



有关的工艺已经公开在 S. Kambe, K. Saito and H. Kishi, *Synthesis*, 287 (1979); A. M. Abd-Elfattah, S. M. Hussain and A. M. El-Reedy, *Tetrahedron* **39**, 3197 (1983); S. M. Hussain, A. A. El-Barbary and S. A. Mansour, *J. Heterocycl. Chem.* **22**, 169 (1985) 中。

测定受体结合的方法以及测定促性腺激素生物活性的体外与体内测定法是公知的。一般而言，使被表达的受体与供试化合物接触，并测量结合或者功能响应的刺激或抑制。

为了测量功能响应，在适合的宿主细胞中表达所分离的编码 LH 或 FSH 受体基因，优选人受体的 DNA。这样一种细胞可以是中国仓鼠卵巢细胞，但是其他细胞也是适合的。优选地，细胞是哺乳动物来源的 (Jia

et al, Mol. Endocrin., 5: 759-776, 1991).

构建重组的 LH 或 FSH 表达细胞系的方法是本领域熟知的 (Sambrook et al., Molecular Cloning: a Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, latest edition)。受体的表达是借助编码所需蛋白质的 DNA 的表达来实现的。位点定向诱变、连接另外的序列、PCR 和构建适合的表达系统的技术迄今都是本领域熟知的。编码所需蛋白质的部分或全部 DNA 可以利用标准的固相技术以合成方式构建, 优选地包括限制位点以有利于连接。可以向 DNA 编码序列提供适合于所包括的编码序列的转录和翻译的控制元件。众所周知, 表达系统是现成的, 它们与多种宿主是相容的, 包括原核生物宿主如细菌, 和真核生物宿主如酵母、植物细胞、昆虫细胞、哺乳动物细胞、鸟类细胞等。

然后使表达受体的细胞与供试化合物接触, 观察结合或者功能响应的刺激或抑制。

作为替代选择, 可以使用分离的含有所表达的受体的细胞膜来测量化合物的结合。

为测量结合, 可以使用放射性或荧光标记的化合物。作为参照化合物, 可以使用人重组 LH 或 FSH。在替代方式中, 还可以进行竞争结合测定。

另一种测定法涉及通过测定受体介导的 cAMP 蓄积的刺激来筛选 LH 或 FSH 受体激动剂化合物。因而, 这样一种方法包括受体在宿主细胞表面上的表达和使该细胞暴露于供试化合物。然后测量 cAMP 的量。cAMP 的水平将有减少或增加, 这依赖于供试化合物在与受体结合后的抑制或刺激效应。

除了直接测量所暴露的细胞中的例如 cAMP 水平以外, 还可以使用这样的细胞, 其除了用编码受体的 DNA 转染以外, 还用编码报道基因的第二 DNA 转染, 该报道基因的表达响应于 cAMP 的水平。这类报道基因可能是 cAMP 可诱导的, 或者可能以这样一种方式构建, 使它们连接于新颖的 cAMP 响应性元件。一般而言, 报道基因的表达可以受到任何

对 cAMP 水平的变化做出反应的响应元件的控制。适合的报道基因例如有 LacZ、碱性磷酸酶、虫荧光素酶和绿荧光蛋白。这类转活化 (transactivation) 测定法的原理是本领域熟知的, 例如描述在 Stratowa, Ch, Himmler, A and Czernilofsky, A. P., Curr. Opin. Biotechnol. 6: 574(1995) 中。

就选择对 LH 或 FSH 受体有活性的化合物而言, 在  $10^{-5}$ M 下测试必须导致活性在使用 LH 或 FSH 作为参照时最大活性的 20% 以上。另一条标准可以是  $EC_{50}$  值, 它必须  $<10^{-5}$ M, 优选  $<10^{-7}$ M。

技术人员将认识到, 可取的  $EC_{50}$  值依赖于所测试的化合物。例如,  $EC_{50}$  小于  $10^{-5}$ M 的化合物一般被视为药物选择的候选者。优选地, 该数值低于  $10^{-7}$ M。不过, 具有更高  $EC_{50}$  但是就特定受体而言有选择性的化合物甚至可以是更好的候选者。

筛选 LH 受体激动性化合物还可以利用小鼠莱迪希氏细胞生物测定法进行 (Van Damme, M., Robersen, D. and Diczfalusy, E. Acta Endocrinol. 77: 655-671(1974). Mannaerts, B., Kloosterboer, H. and Schuurs, A., Neuroendocrinology of reproduction. R. Rolland et al. Eds., Elsevier Science Publishers B. V., 49-58(1987))。该测定法中, 可以在从雄性小鼠分离的莱迪希氏细胞中测量对 LH 受体介导的睾酮产生的刺激。

还可以在离体模型中, 使用培养的小鼠卵泡, 按照 Nayudu, P. 和 Osborn, S. 所述 (J. Reproduction and Fertility 95: 349-362(1992)) 测定化合物的 FSH 激动活性。因此, 分离小鼠卵泡, 并在 FSH 激动性化合物的存在下培养, 以诱导卵泡生长。卵泡的直径和培养基中的雌二醇是卵泡生长的指标。

为了测量化合物的 LH 体内活性, 可以研究未成熟小鼠的排卵诱导。在该测定法中, 将未成熟的雌性小鼠与尿 FSH 进行抗原接触, 大约 48 小时后用 LH 激动性化合物处理。在 LH 激动剂处理后杀死动物, 在显微镜下评估输卵管中的卵子数量。

为了测量化合物的 FSH 体内活性, 在 0、8、24 和 32 小时将未成

熟的雌性大鼠用 FSH 激动性化合物处理，诱导卵泡生长。在实验开始后 52 小时，向动物注射 hCG 以诱导排卵。在实验开始后 72 小时杀死动物，在显微镜下评估输卵管中的卵子数量。另外，测定卵巢的重量。

本发明的化合物在临床上可用于现已使用 LH 或 hCG 的那些情形。这些情形包括性腺机能减退的男性或女性受治疗者中的 LH 替代、中期给药诱导排卵(排卵诱导(OI))或者黄体的受控过度刺激(COH)或刺激。

下列实施例举例说明本发明，决不应当被解释为限制发明的范围。

### 实施例

#### 实施例 1

叔丁基 5-氨基-2-甲硫基-4-(3-(2-(氮杂环丁烷-1-基)-乙酰氨基)-苯基)-噁吩并[2,3-d]嘧啶-6-酰胺

#### (a). 5-氟基-4-(3-硝基苯基)-2-甲硫基-6-氧代嘧啶

将 S-甲基异硫脲硫酸盐(69.0g)、3-硝基苯甲醛(75.0g)、氟基乙酸乙酯(56.0ml)与碳酸钾(72.5g)在绝对 EtOH (1500ml)中的混合物在 60°C 下搅拌 16 小时。将反应混合物在冰浴中冷却至 0°C。滤出所得沉淀，用绝对 EtOH 洗涤，溶于热水(100°C)。将溶液冷却至室温，用 2N HCl 酸化至 pH 2，并在冰浴中冷却至 0°C。滤出所得沉淀，用冰水洗涤。用 1,4-二噁烷共蒸发除去沉淀中残留的水。

收率：54.0mg。

MS-ESI:  $[M+H]^+ = 289.0$

TLC:  $R_f = 0.3$ , 硅胶, DCM/MeOH = 9/1 (v/v)。

#### (b). 6-氯-5-氟基-4-(3-硝基苯基)-2-甲硫基-嘧啶

向搅拌着的 5-氟基-4-(3-硝基苯基)-2-甲硫基-6-氧代嘧啶(实施例 1(a), 25.0g)在无水 1,4-二噁烷(300ml)中的溶液加入 POCl<sub>3</sub> (100ml)。在 90°C 下 3 小时后，将混合物冷却至室温，在减压下浓缩。将残余物溶于 1,4-二噁烷(100ml)，将所得溶液冷却至 0°C。小心地加入冰水。滤出所得沉淀，用水洗涤。用 1,4-二噁烷共蒸发除去沉淀中残留的水。

收率：26.0g

MS-ESI:  $[M+H]^+ = 307.0$

TLC:  $R_f = 0.5$ , 硅胶, 庚烷/EtOAc = 3/2 (v/v)。

(c). 乙基 5-氟基-4-(3-硝基苯基)-2-甲硫基-6-(乙氧羰基甲硫基)-嘧啶

向搅拌着的 2-巯基乙酸乙酯(9.3ml)与 6-氯-5-氟基-4-(3-硝基苯基)-2-甲硫基-嘧啶(实施例 1(b), 26.0g)在 EtOH (250ml)与 DCM (250ml)混合物中的溶液加入 DIPEA (15.7ml)。在室温下 1 小时后, 向混合物加入 0.1N HCl 水溶液(500ml), 然后用 DCM 萃取(3 x 500ml), 干燥( $MgSO_4$ ), 在减压下浓缩。

收率: 28.0g

MS-ESI:  $[M+H]^+ = 390.4$

TLC:  $R_f = 0.5$ , 硅胶, 庚烷/EtOAc = 3/2 (v/v)。

(d). 5-氟基-4-(3-硝基苯基)-2-甲硫基-噻吩并[2,3-d]嘧啶-6-羧酸乙酯

将乙基 5-氟基-4-(3-硝基苯基)-2-甲硫基-6-(乙氧羰基甲硫基)-嘧啶(实施例 1(c), 28.0g)与 DIPEA (30ml)在甲苯(150ml)与 EtOH (150ml)混合物中的混合物在回流温度(100°C)下搅拌 16 小时。然后将混合物冷却至室温, 在减压下浓缩。用甲苯共蒸发除去残留的 DIPEA。

收率: 28.0g

MS-ESI:  $[M+H]^+ = 391.2$

TLC:  $R_f = 0.6$ , 硅胶, 庚烷/EtOAc = 3/2 (v/v)。

(e). 5-氟基-4-(3-氨基苯基)-2-甲硫基-噻吩并[2,3-d]嘧啶-6-羧酸乙酯

向 5-氟基-4-(3-硝基苯基)-2-甲硫基-噻吩并[2,3-d]嘧啶-6-羧酸乙酯(实施例 1(d), 28.0g)、浓盐酸(15ml)与氯化锡(II) (41.0g)在 1,4-二噁烷(400ml)中的混合物加入 EtOH (400ml)。将混合物在 90°C 下搅拌 16 小时。然后将混合物冷却至室温, 在减压下浓缩。将残余物悬浮在 EtOAc (1000ml)中。加入 4N NaOH 水溶液至 pH 10 - 11。

将混合物剧烈搅拌，分离有机层，干燥(MgSO<sub>4</sub>)，在减压下浓缩。

收率：21.0g

MS-ESI: [M+H]<sup>+</sup> = 361.0

TLC: R<sub>f</sub> = 0.6, 硅胶, 庚烷/EtOAc = 3/2 (v/v)。

(f). 5-氨基-4-(3-氨基苯基)-2-甲硫基-噻吩并[2,3-d]嘧啶-6-羧酸

向 5-氨基-4-(3-氨基苯基)-2-甲硫基-噻吩并[2,3-d]嘧啶-6-羧酸乙酯(实施例 1(e), 21.0g)在 1,4-二噁烷(300ml)与水(100ml)混合物中的溶液加入氢氧化钾(32.4g)。在 90°C 下 16 小时后,将混合物冷却至 10°C,在剧烈搅拌下加入 2N 枸橼酸水溶液(300ml)。滤出所得沉淀,用水(180ml)洗涤,在真空中干燥。

收率：14.0g

MS-ESI: [M+H]<sup>+</sup> = 333.0

TLC: R<sub>f</sub> = 0.5, 硅胶, DCM/MeOH = 9/1 (v/v)。

(g). 叔丁基 5-氨基-4-(3-氨基苯基)-2-甲硫基-噻吩并[2,3-d]嘧啶-6-酰胺

向 5-氨基-4-(3-氨基苯基)-2-甲硫基-噻吩并[2,3-d]嘧啶-6-羧酸(实施例 1(f), 14.0g)、DIPEA (17.4ml)与叔丁胺(7.3g)在 DCM/DMF (1/1, v/v, 250ml)中的溶液加入 TBTU (16.1g)。在室温下 3 小时后,将混合物用饱和 NaHCO<sub>3</sub> 水溶液(3 x 100ml)、0.1N HCl 水溶液(100ml)和水(100ml)洗涤。在减压下浓缩有机层。粗产物经过热的绝对 EtOH (300ml)结晶纯化。

收率：10.5g

MS-ESI: [M+H]<sup>+</sup> = 388.2

HPLC: R<sub>t</sub> = 30.72min, Luna C-18(2), 5μm, 250 x 2.0mm, 检测 UV = 210nm, 炉温=40°C, 流速= 0.25ml/min, 洗脱剂: 水/ACN/MeOH = 90/9.5/0.5 至 0/95/5, 运转时间= 50min.

(h). 叔丁基 5-氨基-2-甲硫基-4-(3-(2-溴乙酰氨基)-苯基)-噻吩并[2,3-d]嘧啶-6-酰胺

向叔丁基 5-氨基-2-甲硫基-4-(3-氨基苯基)-噻吩并[2,3-d]-嘧啶-6-酰胺(实施例 1(g), 1.08g)与 DIPEA (2.43ml)在无水 DCM (20ml)中的溶液加入溴乙酰氯(615mg)。在室温下 3 小时后,将混合物用 DCM 稀释,用饱和 NaHCO<sub>3</sub>水溶液洗涤,干燥(MgSO<sub>4</sub>),在减压下浓缩。粗产物经过硅胶色谱法纯化,使用庚烷/EtOAc = 3/2 (v/v)作为洗脱剂。

收率: 910mg

MS-ESI: [M+H]<sup>+</sup> = 510.2

TLC: R<sub>f</sub> = 0.3, 硅胶, 庚烷/EtOAc = 3/2 (v/v)。

(i). 叔丁基 5-氨基-2-甲硫基-4-(3-(2-(氮杂环丁烷-1-基)-乙酰氨基)-苯基)-噻吩并[2,3-d]嘧啶-6-酰胺

向盐酸氮杂环丁烷(120mg)与 N,N-二异丙基乙胺(0.25ml)在 DCM (5ml)中的溶液加入叔丁基 5-氨基-4-(3-(2-溴乙酰氨基)-苯基)-2-甲硫基-噻吩并[2,3-d]嘧啶-6-酰胺(实施例 1(h), 91mg)。在室温下 16 小时后,将混合物用饱和 NaHCO<sub>3</sub>水溶液洗涤,干燥(MgSO<sub>4</sub>),在减压下浓缩。粗产物经过 HPLC 纯化,使用 Luna C-18 柱,采用如下梯度: 0.1% TFA 水溶液 + 10% ACN 水溶液/ACN = 90/10 至 10/90, 时间 30min。然后将标题化合物从水与 0.1% TFA 水溶液中冷冻干燥。

收率: 56mg (TFA-盐)

MS-ESI: [M+H]<sup>+</sup> = 485.2

HPLC: R<sub>t</sub> = 13.45min, 柱子 Luna C-18(2), 3μm, 100\* 2.0mm, 检测 UV = 210nm, 炉温=40°C, 流速= 0.25ml/min, 洗脱剂: 磷酸盐缓冲液 50mM pH 2.1/水/ACN = 10/70/20 至 10/10/80 (v/v), 运转时间= 20min.

## 实施例 2

叔丁基 5-氨基-2-甲硫基-4-(3-(2-(吗啉-4-基)-乙酰氨基)-苯基)-噻吩并[2,3-d]嘧啶-6-酰胺

向叔丁基 5-氨基-4-(3-(2-溴乙酰氨基)-苯基)-2-甲硫基-噻吩并[2,3-d]嘧啶-6-酰胺(实施例 1(h), 1.0g)在 THF (50ml)中的溶液加入吗啉(5.0ml)。在室温下 16 小时后,在减压下浓缩混合物。残余

物经过硅胶柱色谱法纯化, 使用 DCM/MeOH = 9/1 作为洗脱剂。粗产物经过 HPLC 进一步纯化, 使用 Luna C-18 柱, 采用如下梯度: 0.1% TFA 水溶液/水/ACN = 3/97/0 至 3/7/90, 时间 30min。然后将纯的标题化合物从 0.1% TFA 水溶液与水的混合物中冷冻干燥。

收率: 215mg (TFA-盐)

MS-ESI:  $[M+H]^+ = 515.2$

HPLC:  $R_t = 20.62\text{min}$ , 柱子 Luna C-18(2),  $5\mu\text{m}$ ,  $150^* 2\text{mm}$ , 检测 UV = 210nm, 炉温=40°C, 流速= 0.25ml/min, 洗脱剂: 磷酸盐缓冲液 50mM pH 2.1/水/ACN/MeOH = 10/72/17/1 至 10/18/68/4 (v/v), 运转时间= 40min.

### 实施例 3

叔丁基 5-氨基-2-甲硫基-4-(3-(2-(硫代吗啉-4-基)-乙酰氨基)-苯基)-噻吩并[2,3-d]嘧啶-6-酰胺

向叔丁基 5-氨基-2-甲硫基-4-(3-(2-溴乙酰氨基)-苯基)-噻吩并[2,3-d]嘧啶-6-酰胺(实施例 1(h), 1.09g)在 DCM (50ml) 中的溶液加入硫代吗啉(2.16ml)。在室温下 16 小时后, 将混合物用 DCM 稀释, 用饱和 NaHCO<sub>3</sub> 水溶液洗涤, 干燥(MgSO<sub>4</sub>), 在减压下浓缩。粗产物经过 HPLC 纯化, 使用 Luna C-18 柱, 采用如下梯度: 0.1% TFA 水溶液 + 10% ACN 水溶液/ACN = 100/0 至 10/90, 时间 30min。然后将纯的标题化合物从用 1N HCl 水溶液酸化的水中冷冻干燥。

收率: 816mg

MS-ESI:  $[M+H]^+ = 531.2$

HPLC:  $R_t = 14.72\text{min}$ , 柱子 Luna C-18(2),  $3\mu\text{m}$ ,  $100^* 2\text{mm}$ , 检测 UV = 210nm + 254nm, 炉温=40°C, 流速= 0.25ml/min, 洗脱剂: 磷酸盐缓冲液 50mM pH 2.1/水/ACN/MeOH = 10/72/17/1 至 10/18/68/4 (v/v), 运转时间= 20min.

### 实施例 4

叔丁基 5-氨基-2-甲硫基-4-(3-(2-(哌啶-1-基)-乙酰氨基)-苯基)-噻吩并[2,3-d]嘧啶-6-酰胺

向叔丁基 5-氨基-4-(3-(2-溴乙酰氨基)-苯基)-2-甲硫基-噻吩并[2,3-d]嘧啶-6-酰胺(实施例 1(h), 1.0g)在  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  (50ml) 中的溶液加入吡啶(3.0ml)。在室温下 16 小时后, 在减压下浓缩混合物。残余物经过硅胶柱色谱法纯化, 使用  $\text{DCM}/\text{MeOH} = 9/1$  作为洗脱剂。粗产物进一步经过 HPLC 纯化, 使用 Luna C-18 柱, 采用如下梯度: 0.1% TFA 水溶液/ACN = 100/0 至 10/90, 时间 30min。然后将纯的标题化合物从 0.1% TFA 水溶液与水的混合物中冷冻干燥。

收率: 851mg (TFA-盐)

MS-ESI:  $[\text{M}+\text{H}]^+ = 513.2$

HPLC:  $R_t = 37.3\text{min}$ , 柱子 Luna C-18(2),  $5\mu\text{m}$ ,  $150^* 2\text{mm}$ , 检测 UV = 210nm, 炉温=40°C, 流速= 0.25ml/min, 洗脱剂: 磷酸盐缓冲液 50mM pH 2.1/水/ACN = 20/60/20 至 20/0/80 (v/v), 运转时间 = 40min.

#### 实施例 5

叔丁基 5-氨基-2-甲硫基-4-(3-(2-(吡咯烷-1-基)-乙酰氨基)-苯基)-噻吩并[2,3-d]嘧啶-6-酰胺

向叔丁基 5-氨基-4-(3-(2-溴乙酰氨基)-苯基)-2-甲硫基-噻吩并[2,3-d]嘧啶-6-酰胺(实施例 1(h), 1.0g)在  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  (50ml) 中的溶液加入吡咯烷(3.0ml)。在室温下 16 小时后, 在减压下浓缩混合物。残余物经过硅胶柱色谱法纯化, 使用  $\text{DCM}/\text{MeOH} = 9/1$  作为洗脱剂。粗产物进一步经过 HPLC 纯化, 使用 Luna C-18 柱, 采用如下梯度: 0.1% TFA 水溶液/ACN = 100/0 至 10/90, 时间 30min。然后将纯的标题化合物从 0.1% TFA 水溶液与水的混合物中冷冻干燥。

收率: 616mg (TFA-盐)

MS-ESI:  $[\text{M}+\text{H}]^+ = 499.2$

HPLC:  $R_t = 37.5\text{min}$ , 柱子 Luna C-18(2),  $5\mu\text{m}$ ,  $150^* 2\text{mm}$ , 检测 UV = 210nm, 炉温=40°C, 流速= 0.25ml/min, 洗脱剂: 磷酸盐缓冲液 50mM pH 2.1/水/ACN = 20/60/20 至 20/0/80 (v/v), 运转时间 = 40min.

### 实施例 6

叔丁基 5-氨基-2-甲硫基-4-(3-(2-(哌啶-1-基)-乙酰氨基)-苯基)-噻吩并[2,3-d]嘧啶-6-酰胺

向叔丁基 5-氨基-4-(3-(2-溴乙酰氨基)-苯基)-2-甲硫基-噻吩并[2,3-d]嘧啶-6-酰胺(实施例 1(h), 1.0g)在  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  (50ml) 中的溶液加入哌嗪(2.5g)。在室温下 16 小时后, 在减压下浓缩混合物。残余物经过硅胶柱色谱法纯化, 使用  $\text{DCM}/\text{MeOH} = 7/1$  作为洗脱剂。粗产物进一步经过 HPLC 纯化, 使用 Luna C-18 柱, 采用如下梯度: 0.1% TFA 水溶液/ACN = 100/0 至 10/90, 时间 30min。然后将纯的标题化合物从 0.1% TFA 水溶液与水的混合物中冷冻干燥。

收率: 766mg (双 TFA-盐)

MS-ESI:  $[\text{M}+\text{H}]^+ = 514.4$

HPLC:  $R_t = 33.7\text{min}$ , 柱子 Luna C-18(2),  $5\mu\text{m}$ ,  $150^* 2\text{mm}$ , 检测 UV = 210nm, 炉温=40°C, 流速= 0.25ml/min, 洗脱剂: 磷酸盐缓冲液 50mM pH 2.1/水/ACN = 20/60/20 至 20/0/80 (v/v), 运转时间 = 40min.

### 实施例 7

CHO-LH 和 CHO-FSH 体外生物活性

在中国仓鼠卵巢(CHO)细胞中测试化合物的 LH 激动活性, 该细胞被人受体稳定转染, 并且被指导虫荧光素酶报道基因表达的 cAMP 响应性元件(CRE)/启动子共同转染。配体与 Gs-偶联 LH 受体的结合将导致 cAMP 的增加, 这又诱导荧光素酶报道基因构建体的转活化增加。利用荧光计数器量化荧光素酶的信号。计算供试化合物的  $\text{EC}_{50}$  值(供试化合物导致最大值一半(50%)刺激的浓度)。为此, 使用软件程序 GraphPad PRISM, 3.0 版(GraphPad software Inc., San Diego)。

按相似的方式, 在 CHO 细胞中测试化合物的 FSH 激动活性, 该细胞被荧光素酶报道基因和人 FSH 受体转染。结果如表 1 所示。

体内生物活性

为了测量 LH/FSH 受体激动性化合物的体内活性, 研究了未成熟小

鼠的排卵诱导。在该测定法中，将未成熟的雌性小鼠用尿 FSH 进行抗原接触(Humegon 12.5IU/动物)。大约 48 小时后，将动物用 LH/FSH 激动性化合物处理，剂量水平为 50mg/kg。在 LH/FSH 激动剂处理后 24 小时杀死动物，在显微镜下评估输卵管中的卵子数量。结果如表 1 所示。

表 1

实 施 例	名称	EC50	EC50	测试 的 动物数 量	卵子的 平均数 (50mg/kg p. o.)
		CHO LHR (M)	CHO FSHR (M)		
1	叔丁基 5-氨基-2-甲硫基-4-(3-(2-(氮杂环丁烷-1-基)-乙酰氨基)-苯基)-噻吩并[2,3-d]嘧啶-6-酰胺	3.86 E-09	4.62 E-07	15	1.6
2	叔丁基 5-氨基-2-甲硫基-4-(3-(2-(吗啉-4-基)-乙酰氨基)-苯基)-噻吩并[2,3-d]嘧啶-6-酰胺	2.24 E-09	4.20 E-08	10	9.3
3	叔丁基 5-氨基-2-甲硫基-4-(3-(2-(硫代吗啉-4-基)-乙酰氨基)-苯基)-噻吩并[2,3-d]嘧啶-6-酰胺	8.03 E-09	1.04 E-06	10	19.8
4	叔丁基 5-氨基-2-甲硫基-4-(3-(2-(哌啶-1-基)-乙酰氨基)-苯基)-噻吩并[2,3-d]嘧啶-6-酰胺	6.63 E-09	2.01 E-07		
5	叔丁基 5-氨基-2-甲硫基-4-(3-(2-(吡咯烷-1-基)-乙酰氨基)-苯基)-噻吩并[2,3-d]嘧啶-6-酰胺	6.68 E-09	4.80 E-07		
6	叔丁基 5-氨基-2-甲硫基-4-(3-(2-(哌嗪-1-基)-乙酰氨基)-苯基)-噻吩并[2,3-d]嘧啶-6-酰胺	3.17 E-09	1.50 E-07		