

(12) 按照专利合作条约所公布的国际申请

(19) 世界知识产权组织
国际局

(43) 国际公布日
2017 年 7 月 6 日 (06.07.2017)



(10) 国际公布号
WO 2017/113101 A1

(51) 国际专利分类号:

C12N 15/113 (2010.01) *A61P 15/00* (2006.01)
A61K 31/7105 (2006.01) *A61P 35/04* (2006.01)
A61K 39/395 (2006.01)

(21) 国际申请号: PCT/CN2015/099464

(22) 国际申请日: 2015 年 12 月 29 日 (29.12.2015)

(25) 申请语言: 中文

(26) 公布语言: 中文

(71) 申请人: 深圳先进技术研究院 (SHENZHEN INSTITUTES OF ADVANCED TECHNOLOGY) [CN/CN]; 中国广东省深圳市南山区西丽大学城学苑大道 1068 号, Guangdong 518055 (CN)。

(72) 发明人: 张键 (ZHANG, Jian); 中国广东省深圳市南山区西丽大学城学苑大道 1068 号, Guangdong 518055 (CN)。 任培根 (REN, Peigen); 中国广东省深圳市南山区西丽大学城学苑大道 1068 号, Guangdong 518055 (CN)。 黄晨 (HUANG, Chen); 中国广东省深圳市南山区西丽大学城学苑大道 1068 号, Guangdong 518055 (CN)。 王苗苗 (WANG, Miaomiao); 中国广东省深圳市南山区西丽大学城学苑大道 1068 号, Guangdong 518055 (CN)。

(74) 代理人: 北京三友知识产权代理有限公司 (BEIJING SANYOU INTELLECTUAL PROPERTY

AGENCY LTD.); 中国北京市金融街 35 号国际企业大厦 A 座 16 层, Beijing 100033 (CN)。

(81) 指定国 (除另有指明, 要求每一种可提供的国家保护): AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BN, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IR, IS, JP, KE, KG, KN, KP, KR, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PA, PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW, SA, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW。

(84) 指定国 (除另有指明, 要求每一种可提供的地区保护): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SD, SL, ST, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), 欧亚 (AM, AZ, BY, KG, KZ, RU, TJ, TM), 欧洲 (AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, RS, SE, SI, SK, SM, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, KM, ML, MR, NE, SN, TD, TG)。

本国际公布:

- 包括国际检索报告 (条约第 21 条(3))。
- 包括说明书序列表部分 (细则 5.2(a))。

(54) Title: TARGET CMKLR1 FOR FEMALE REPRODUCTIVE SYSTEM DISEASES, ANTAGONISTS THEREOF, AND RELATED APPLICATION

(54) 发明名称: 雌性生殖疾病靶点 CMKLR1 及其拮抗剂与相关应用

(57) Abstract: Provided are a novel target CMKLR1 for female reproductive system diseases, and an application of CMKLR1 antagonists to preparation of drugs for preventing and/or treating female reproductive system diseases. Also provided is a pharmaceutical composition for preventing and/or treating female reproductive system diseases, comprising a CMKLR1-specific antagonist. Also provided is a method for preventing and/or treating female reproductive system diseases by using CMKLR1-specific antagonists.

(57) 摘要: 提供了雌性生殖疾病新型靶点 CMKLR1, 以及针对 CMKLR1 的拮抗剂在制备用于预防和/或治疗雌性生殖疾病的药物中的应用。还提供了一种预防和/或治疗雌性生殖疾病的药物组合物, 其包含针对 CMKLR1 的拮抗剂。还提供了一种利用针对 CMKLR1 的拮抗剂预防和/或治疗雌性生殖疾病的方法。



WO 2017/113101 A1

雌性生殖疾病靶点 CMKLR1 及其拮抗剂与相关应用

技术领域

本发明是关于与雌性生殖疾病相关的新型靶点，具体而言，本发明是关于雌性生殖疾病靶点 CMKLR1 及其拮抗剂与相关应用。

背景技术

国家统计局发布第六次全国人口普查主要数据公报数据显示，全国总人口为 1,339,724,852 人。与 2000 年第五次全国人口普查相比，十年增加 7390 万人，增长 5.84%，年平均增长 0.57%，比 1990 年到 2000 年的年平均增长率 1.07% 下降 0.5 个百分点。数据表明，我国人口增长处于低生育水平阶段。2015 年 10 月，中国共产党第十八届中央委员会第五次全体会议公报指出：促进人口均衡发展，坚持计划生育的基本国策，完善人口发展战略，全面实施一对夫妇可生育两个孩子政策，积极开展应对人口老龄化行动。

然而近些年来，快节奏的工作和生活方式，高消费的压力，方方面面都挑战着婚育年龄的女性。因此，女性的健康，尤其是女性的生殖健康是不容忽视的社会问题。

(1) 多囊卵巢综合征 (polycystic ovary syndrome, PCOS)

多囊卵巢综合征是育龄妇女常见的内分泌紊乱性疾病，发病率占育龄期妇女的 6~10%，其主要表现为月经稀发或闭经、不孕、卵巢多囊性变、肥胖、多毛、高雄激素血症等。对于 PCOS 患者的治疗，包括手术治疗、药物治疗和辅助生育技术。

PCOS 的手术治疗可以减少卵巢中部分颗粒细胞，卵巢间质产生雄激素减少，从而使循环中的雄激素水平降低，进而 GnRH 降低，引起血清雄激素浓度进一步降低，这也说明卵巢间质亦受垂体-卵巢轴调控。PCOS 的手术治疗主要包括双侧卵巢楔形切除术(BOWR)，腹腔镜下卵巢电灼或激光打孔治疗(Laparoscopic ovariandrilling, LOD) 和经阴道水腹腔镜 (Transvaginalhydroparoscopic, THL)。

PCOS 的药物治疗目前已取代手术治疗作为一线治疗方法，治疗的目的主要与病人的生育要求相关，如采用降低高雄激素血症的药物治疗，促排卵药物治疗，或胰岛素增敏剂(insulin-sensitizing drugs, ISD)治疗等。

另外，也有对 PCOS 患者采用辅助生育技术，尤其是对于应用 6 个月以上标准的

促排卵周期治疗后有排卵但仍未妊娠的 PCOS 患者,或多种药物促排卵治疗及辅助治疗无排卵并急待妊娠的患者,可以选择胚胎移植的辅助生育技术,包括体外受精技术(In vitro fertilization, IVF)和卵母细胞体外成熟技术(In vitro maturation, IVM)。

然而以上治疗方法均有优缺点,关键是迄今为止,PCOS 的发病机制仍不清楚,所以目前采用的治疗方法也只是治标。

大量研究表明 40~60%的 PCOS 患者是肥胖者,出现胰岛素抵抗(insulin resistance, IR)及继发性血胰岛素升高。众所周知,人体内脂肪组织是胰岛素作用的重要的靶器官之一,因此脂肪组织的某些病理、生理变化也将会影响 PCOS IR 的发生、发展。

(2) 卵巢癌 (Ovarian Cancer, OAC)

雌性生殖癌症中,有的与内分泌相关。如,乳腺癌(Breast Cancer)、子宫内膜癌(Endometrial Cancer)和卵巢癌 (Ovarian Cancer, OAC)等。其中,卵巢癌是发生于卵巢的一种恶性肿瘤,90%~95%为卵巢原发性的癌,另外 5%~10%为其它部位原发的癌转移到卵巢。虽然我国的卵巢癌发病率不如欧美国家高,但根除性的手术治疗,以及细胞毒性的化疗,均缺乏有效降低卵巢癌的死亡率的效用。由于卵巢癌早期缺少症状,即使有症状也不特异,筛查的作用又有限,因此早期诊断比较困难,就诊时 60%~70%已为晚期,而晚期病例又疗效不佳。因此,虽然卵巢癌的发病率仅次于宫颈癌和子宫内膜癌,居妇科恶性肿瘤的第三位,但死亡率却超过宫颈癌及子宫内膜癌之和,高居妇科癌症首位,是严重威胁妇女健康的最大疾患。

在以往的临床研究中认为,卵巢癌在早期是没有明显的症状表现。但也一些研究表明,卵巢癌在早期是会表现出一些临床的症状,例如异常的腹胀、饱胀,腹部疼痛或背部疼痛,精神不振等,但这些症状往往被患者所忽视,当诊断时往往已发生转移,因而卵巢癌往往被形容为“无声的杀手”,进而也导致了卵巢癌的预后不良。

大量研究已表明,卵巢癌常通过直接蔓延及盆、腹腔播散种植到远处的器官。卵巢癌转移的主要途径是腹腔内种植性转移,据临床观察,转移的主要部位为大网膜,在患有卵巢癌的妇女中 80%伴有网膜转移。此时,大网膜上的癌细胞以远快于原发病灶处的速度增长。大网膜是连接胃大弯至横结肠的腹膜,内含有吞噬细胞,有重要的防御功能,同时也是含有大量脂滴的脂肪组织,是体内一个重要的内分泌器官,并参与体内环境稳态。尽管卵巢癌向大网膜转移的事实很明显,但是其机理一直尚不明晰。

因大网膜部位以脂肪组织为主，脂肪组织是体内最大的内分泌器官，可以分泌脂肪因子，细胞因子等，脂肪组织内的脂肪细胞与卵巢癌细胞之间的关系及其机制，仍需要更多的证据阐明。

随着对肿瘤研究的不断深入，越来越多的证据表明，肥胖会增加癌症患者致死的风险。比如，白色脂肪组织分泌的瘦素（Leptin）能够促进乳腺癌的发展：一方面，瘦素能够通过激活 JAK/STAT3、MAPK-ERK1/2 或者 PI3K 通路，从而促进乳腺癌的生长；另外，瘦素还能通过诱导血管生成素的表达促进肿瘤相关血管的生成，并且瘦素还能诱导人表皮生长因子受体 2（ErbB-2）的转录，并且参与三阴性乳腺癌细胞中胰岛素样生长受体 1（IGF-1）的反应，激活表皮生长因子受体（EGFR）从而促进细胞的侵袭与转移。目前的研究还表明，瘦素还能在前列腺癌、甲状腺癌等多种癌症过程中有着促进作用，其表达水平和肿瘤发生呈正相关，但胰腺癌中的瘦素水平则比较低，并且两者间的关系并不是很清楚。也有研究发现脂联素对肿瘤的发生发展具有抑制作用。

有报道称，肥胖也能增加女性患上卵巢癌的风险。脂肪组织会影响肥胖妇女的卵巢癌的病情，研究人员对 216 名妇女进行研究，其中 35 名是肥胖妇女，108 名是正常体重的妇女，发现在卵巢癌患者中，与正常体重的妇女相比，肥胖妇女的存活率较低，存活时间较短。科学家发现除了他们之间的癌症致死率和癌症复发率有区别外，他们的肿瘤细胞也表现不同，提示脂肪组织分泌的激素或者蛋白可能引起卵巢癌细胞增殖迅速。还有研究表明，腹腔中大网膜的脂肪细胞分泌的 IL-6 和 IL-8 能够促进卵巢癌细胞向其转移。

关于脂肪组织，尤其是大网膜脂肪，与卵巢癌的关系，2011 年 10 月 30 日的《自然—医学》（Nature Medicine）杂志上 Ernst Lengyel 教授发表的一篇文章提供了详实的证据。chemerin 是新近发现的一种脂肪细胞因子，又称趋化素，在免疫应答、炎症反应、脂肪细胞分化成熟、脂质代谢等方面发挥作用，与肥胖和代谢综合征相关。chemerin 基因也称为他扎罗汀诱导基因 2（Tazarotene Induced Gene2, TIG2），1997 年被首次克隆发现，随后，2003 年，Wittamer 等在卵巢癌继发的腹水中通过反相高压液相层析分离得到其活性蛋白。

2012 年，Reverchon 等的研究证实 chemerin 及其受体 CMKLR1（类趋化因子受体-1）在主要的人卵巢颗粒细胞（hGCs）和人卵巢颗粒样肿瘤细胞（KGN）中有表达，

再次提到 chemerin 与卵巢肿瘤的关系。

2011 年 10 月, Ernst Lengyel 博士发表在 nature medicine 的研究发现卵巢癌在向大网膜转移过程中, FABP4 起到了至关重要的作用, 且大网膜的趋化因子参与了卵巢癌迁移至大网膜脂肪的过程, 并检测到了大网膜脂肪细胞中的趋化因子脂联素和细胞因子 IL-6、IL-8 等。但文章中并没有记载检测到同样是趋化因子的 chemerin。

现有文献和技术报道, 还没有找到好的针对多囊卵巢综合征及卵巢癌这两种疾病的特异性靶点。

发明内容

本发明的主要目的在于寻找雌性生殖疾病的新靶点, 以更好地预防和/或治疗雌性生殖疾病, 缓解多囊卵巢综合征、抑制卵巢癌增殖。

本发明确定了 chemerin/CMKLR1 系统是调节多囊卵巢综合征和抑制卵巢癌的新型靶点。

CMKLR1 (chemokine like receptor-1, 类趋化因子受体-1), 是趋化因子/脂肪因子 chemerin 的受体之一, 属于 G 蛋白偶联受体家族。

发明人在研究中发现, 利用基因敲除技术或 shRNA 方式干扰 CMKLR1 的基因表达, 或者, 利用特异性拮抗剂干扰 CMKLR1 受体的作用, 可以有效地缓解实验性小鼠多囊卵巢综合征的症状, 也能有效抑制人卵巢癌细胞体外体内的增殖。

在本发明的一具体实验中, 本发明利用特异性干扰 CMKLR1 基因表达的 shRNA 序列, 建立了具有荧光素 (Luciferase) 和 Tomoto 荧光标记的、利用 shRNA 干扰敲弱 CMKLR1 基因的人上皮型卵巢癌 SKOV3 永久细胞系 (Tomato-shCMKLR1 SKOV3), 体外细胞群落增殖实验显示, 与对照组相比, 敲弱 CMKLR1 基因的 SKOV3 细胞的增殖显著受到抑制。进一步, 皮下注射 Tomato-shCMKLR1 SKOV3 细胞, 建立裸鼠荷瘤模型, 每周检测体重和肿瘤生长情况, 与对照组相比, Tomato-shCMKLR1 SKOV3 细胞在动物体内生长显著缓慢。此外, 利用 CMKLR1 特异性小分子拮抗剂拮抗 CMKLR1 的作用, 在裸鼠荷瘤模型中, 腹腔注射 CMKLR1 特异性小分子拮抗剂, 与对照组相比, 可以显著抑制肿瘤的生长。

在本发明的另一具体实验中, 通过干扰 CMKLR1 的基因表达, 或拮抗 CMKLR1 的作用, 可以有效缓解由双氢睾酮 (DHT) 或脱氢表雄酮 (DHEA) 引起的实验性小

鼠多囊卵巢综合征的症状。

从而，一方面，本发明提供了针对 CMKLR1 的拮抗剂在制备用于预防和/或治疗雌性生殖疾病的药物中的应用。

另一方面，本发明还提供了一种预防和/或治疗雌性生殖疾病的药物组合物，该
5 药物组合物包含针对 CMKLR1 的拮抗剂。

另一方面，本发明还提供了一种预防和/或治疗雌性生殖疾病的方法，该方法包括：以 CMKLR1 为靶点，降低 CMKLR1 的表达水平和/或拮抗 CMKLR1 的作用，以预防和/或治疗雌性生殖疾病。具体地，可以是利用针对 CMKLR1 的拮抗剂降低 CMKLR1 的表达水平（敲除 CMKLR1 基因或敲弱 CMKLR1 基因的表达水平）和/或
10 拮抗 CMKLR1 的作用。

根据本发明的具体实施方案，本发明中，所述针对 CMKLR1 的拮抗剂为任何可降低 CMKLR1 的表达水平和/或拮抗 CMKLR1 的作用的试剂。具有这样功能的试剂例如可包括 siRNA、shRNA、反义 RNA、抗体或其组合。这样的试剂对于本领域技术人员而言可根据现有技术获得，可以是现有技术中已知的任何可降低 CMKLR1 的
15 表达水平和/或拮抗 CMKLR1 的作用的拮抗剂本身，也可是基于该分子式进行修饰、改构后仍具有降低 CMKLR1 的表达水平和/或拮抗 CMKLR1 作用的功能的试剂。在本发明的一优选具体实施方案，所述针对 CMKLR1 的拮抗剂为小分子拮抗剂，例如 shRNA 或是 α -NETA 等。更优选地，所述 shRNA 具有如 SEQ ID No. 1 所示序列。

根据本发明的具体实施方案，本发明中，所述预防和/或治疗雌性生殖疾病包括：
20 缓解多囊卵巢综合征症状，和/或抑制卵巢癌细胞增殖。

根据本发明的具体实施方案，本发明的预防和/或治疗雌性生殖疾病的药物组合物中，除所述针对 CMKLR1 的拮抗剂外，还可根据需要包括医药上可接受的载体或赋形剂。

综合而言，本发明佐证了 CMKLR1 是预防和治疗多囊卵巢综合征和卵巢癌的新
25 靶点，利用任何技术干扰 CMKLR1 基因表达或干预 CMKLR1 的作用，可以有效的缓解多囊卵巢综合征的症状，抑制卵巢癌的增殖。

附图说明

图 1: 敲弱 CMKLR1 基因, 可抑制卵巢癌细胞系 SKOV3 中转移相关基因的表达。

图 2: 敲弱 CMKLR1 基因, 可抑制卵巢癌细胞系 SKOV3 的迁移和增殖。

图 3: 敲弱 CMKLR1 基因, 可抑制人卵巢癌细胞在裸鼠皮下的增殖。

图 4: CMKLR1 特异性拮抗剂, 可抑制人卵巢癌细胞在裸鼠皮下的增殖。

图 5A 和图 5B: CMKLR1 基因的缺失对双氢睾酮引起的发情周期改变的影响。

5 其中, WT, wild type: 野生型小鼠。Cmklr1 ^{-/-}: CMKLR1 基因缺失小鼠。Control (Ctl): 对照安慰剂组。DHT, 双氢睾酮: 埋植了双氢睾酮的实验组。P: proestrous: 发情前期。D: diestrous: 发情间期。E: estrous: 发情期。M: metestrous: 发情后期。days: 天数。Estrous Cycles: 发情周期。

图 6: CMKLR1 基因的缺失, 对双氢睾酮引起的小鼠血清中激素水平的影响。

10 图 7: CMKLR1 基因的缺失, 对双氢睾酮引起的小鼠卵巢结构的影响。

图 8A 和图 8B: CMKLR1 基因的缺失, 对双氢睾酮引起的小鼠卵泡细胞凋亡的影响。

图 9: CMKLR1 基因的缺失, 对双氢睾酮引起的卵巢组织中激素合成相关酶基因表达的影响。

15 图 10: CMKLR1 特异性拮抗剂, α -NETA, 对双氢睾酮引起的小鼠卵巢结构、激素合成酶等基因表达的影响。

图 11: CMKLR1 特异性拮抗剂, α -NETA, 对 DHEA 引起的小鼠卵巢结构的影响。

图 12A 和图 12B: CMKLR1 特异性拮抗剂, α -NETA, 对 DHEA 引起的小鼠卵泡细胞凋亡的影响。

20

具体实施方式

为了更清楚地理解本发明, 现参照下列实施例及附图进一步描述本发明。实施例仅用于解释而不以任何方式限制本发明。实施例中, 各原始试剂材料均可商购获得, 未注明具体条件的实验方法为所属领域熟知的常规方法和常规条件, 或按照仪器制造商所建议的条件。

25

实施例 1: 干扰 CMKLR1 的基因表达, 或拮抗 CMKLR1 的作用, 可有效抑制抑制人卵巢癌细胞的增殖。

本实施例验证了干扰 CMKLR1 的基因表达, 或拮抗 CMKLR1 的作用, 可有效抑制抑制人卵巢癌细胞的增殖。其中, 设计特异性干扰 CMKLR1 基因表达的 shRNA 序

列，建立了具有荧光素（Luciferase）和 Tomato 荧光标记的、利用 shRNA 干扰敲弱 CMKLR1 基因的人上皮型卵巢癌 SKOV3 永久细胞系（Tomato-shCMKLR1 SKOV3）。

体外细胞群落增殖实验显示，与对照组相比，敲弱 CMKLR1 基因的 SKOV3 细胞的增殖显著受到抑制。皮下注射 Tomato-shCMKLR1 SKOV3 细胞，建立裸鼠荷瘤模型，每周检测体重和肿瘤生长情况，与对照组相比，Tomato-shCMKLR1 SKOV3 细胞在动物体内生长显著缓慢。利用 CMKLR1 特异性小分子拮抗剂拮抗 CMKLR1 的作用，在裸鼠荷瘤模型中，腹腔注射 CMKLR1 特异性小分子拮抗剂，与对照组相比，可以显著抑制肿瘤的生长。

具体如下：

10 **1、建立具有荧光素（Luciferase, Fluc）和 Tomato 荧光标记的人卵巢癌细胞系：SKOV3-Luc-Tomato/LRH 和 SKOV3.ipl-Luc-Tomato/LRH。**

本实验中，选用人卵巢癌细胞 SKOV3、SKOV3.ipl（购于武汉博士德公司）制备含有 Tomato/Luciferase 基因的慢病毒载体（载体按照文献 **Ren P.-G.**（任培根），Lee S-W, Biswal S, Goodman SB. Systemic trafficking of macrophages induced by bone cement particles in nude mice. **Biomaterials**, 2008. 29: 4760-4765 自行制备）。具体操作如下：

- 15 ① 选取生长旺盛的人卵巢癌细胞 SK-OV3、SK-OV3.ipl，在转染前一天以 5×10^5 个/孔，接种于 6 孔板中，培养至第二日后，细胞融合度为 60%；
- ② 第二日用含有 Tomato/Luciferase 基因的慢病毒进行细胞感染 6 小时；
- ③ 6 小时后，将待转染的细胞用 PBS 轻轻漂洗一次，向孔中加入 2 mL 完全培养基，置于二氧化碳培养箱中培养；
- 20 ④ 48 小时后选用含有 1 $\mu\text{g/mL}$ G418 的培养基进行筛选；待细胞不再出现死亡后即得到稳定表达 Tomato/Luciferase 基因的卵巢癌细胞系：SKOV3-Luc-Tomato/LRH 和 SKOV3.ipl-Luc-Tomato/LRH，即可用于肿瘤细胞体外体内实验。

25 **2、建立敲弱了 CMKLR1 基因的可发光的人卵巢癌细胞系：SKOV3-Luc-Tomato-shCMKLR1/LRH 和 SKOV3.ipl-Luc-Tomato-shCMKLR1/LRH。**

本实验中所用人 CMKLR1 基因 shRNA 为 pSM2c-Hu-shCMKLR1（购自 Open Biosystems），Hairpin 序列：5'-TGCTGTTGACAGTGAGCGAGGTGATGAATACCCTG

ATTATTAGTGAAGCCACAGATGTAATAATCAGGGTATTCATCACCGTGCCTACTG
CCTCGGA-3' (SEQ ID No. 1)。对照组为 pSM2c-Hu-scramble shRNA。

① 选取生长旺盛的可发光的人卵巢癌细胞：SKOV3-Luc-Tomato/LRH 和 SKOV3.ipl-Luc-Tomato/LRH，在转染前一天以 5×10^5 个/孔，接种于 6 孔板中，
5 培养至第二日后，细胞融合度为 60%；

② 第二日进行转染，以 6 孔板的一个培养孔为单位，用 200 μ L 的 opti-MEM 培养基稀释 3 μ g 质粒，另以 200 μ L 的 opti-MEM 培养基稀释 6 μ L 脂质体 Lipofectamine 2000，分别轻轻混匀后，室温放置 5 分钟；

③ 将两管稀释液轻轻混合，室温静置 20 分钟后，向混合后的稀释液中轻轻加入
10 600 μ L 的 opti-MEM 培养基；

④ 将待转染的细胞用 PBS 轻轻漂洗一次，然后将混合好的稀释液轻轻加入培养孔中，置于二氧化碳培养箱中培养；

⑤ 培养 4~6 小时后弃尽转染所用培养基，向孔中加入 3 mL 完全培养基；

⑥ 48 小时后选用含有 1 μ g/mL 嘌呤霉素 (puromycin) 的培养基进行筛选；待
15 细胞不再出现死亡后即得到稳定表达 CMKLR1 shRNA 的可发光的卵巢癌细胞系。然后利用流式细胞仪进行筛选，分选出高表达红色荧光的细胞，

⑦ 用 TRIzol 提取总 RNA，定量 2 μ g RNA 进行逆转录（逆转录试剂盒，购于 Promega 公司），并用特异引物序列进行 qPCR。

所用特异引物序列为 Hu-CMKLR1 引物序列：

20 Fw 5'-GAGGCGTGACATAGAATGGA-3' (SEQ ID No. 2)

Rv 5'-TGATATGGATTGGGAGGAAGAC-3' (SEQ ID No. 3)

⑧ 与转染了 pSM2c-Hu-scramble shRNA 的做比较，CMKLR1 基因表达水平仅为其 $40\% \pm 2.87\%$ ，作为敲弱了 CMKLR1 基因的可发光的人卵巢癌细胞系，并命名为：SKOV3-Luc-Tomato-shCMKLR1/LRH；和 SKOV3.ipl-Luc-Tomato-shCMKLR1/LRH；即可用于肿瘤细胞体外和体内实验。
25

3、敲弱了 CMKLR1 基因的可发光的人卵巢癌细胞系的体外增殖、迁移和侵袭实验。

(1) MTT 增殖实验：

① 将转入 shRNA 及空载质粒的卵巢癌细胞，分别以 2000 个/孔接种于 96 孔细

胞培养板中，每孔培养基体积为 200 μ L，同时将不同的培养板放置于二氧化碳培养箱中，分别培养 12 小时、24 小时、48 小时、72 小时；

② 在不同的检测时间点将 MTT 溶液（5 mg/mL），加入培养板中，每孔 20 μ L，继续放入二氧化碳培养箱中培养 4 小时；

5 ③ 弃培养板中的上清，加入 150 μ L DMSO（二甲基亚砷），震荡 10 分钟，在酶标仪上选择 490 nm 波长进行检测，绘制细胞的生长曲线。

(2) Soft Agar 软琼脂克隆形成实验：

① 配制 1.2%和 0.7%的琼脂糖，高压灭菌后置于 55℃水浴中，使其保持融化状态；

10 ② 配含 20%FBS、2 $\times$ 抗生素的 2 $\times$ RPMI 1640 培养基，37℃预热；

③ 灌下层胶：1.2%的琼脂糖胶与 2 $\times$ 培养基 1:1 混合，加入到 6 孔板中，每孔 3ml，室温放置待其凝固；

④ 等待下层胶凝固过程中消化 SKOV3-Luc-Tomato-shCMKLR1/LRH，或 SKOV3.ipl-Luc-Tomato-shCMKLR1/LRH，或 pSM2c-Hu-scramble shRNA 稳转
15 细胞，计数，用无血清培养基调整浓度为 5×10^4 /ml，每孔用 100 μ l 细胞，设 3 个平行孔；

⑤ 下层胶凝固后灌上层胶：0.7%的琼脂糖胶与 2 $\times$ 培养基 1:1 混合(温度约 40℃左右)，加入 100 μ l 细胞悬液，即 5000 个细胞，混匀，加入孔板中，每孔 3ml；

⑥ 37℃ 5% CO₂ 培养，约 2~3 周后荧光观察克隆大小，计数并比较两组克隆形成情况。
20

(3) Transwell 侵袭实验：

采用 Transwell 小室以及预包被 Matrigel 的 Transwell 小室检测干扰 CMKLR1 基因表达对卵巢癌细胞迁移和侵袭的影响。具体操作如下：

① 将转入 shRNA 及空载质粒的卵巢癌细胞饥饿培养 24 小时后，消化离心弃去
25 上清，用无血清的培养基进行重悬并计数，将细胞密度调整为 5×10^5 个/mL；

② 在 Transwell 小室（Pore size 8.0 μ m，购于 Corning 公司）和 BD BioCoat 小室（Matrigel Invasion Chamber, Pore size 8.0 μ m，购于 BD 公司）的下室中加入 600 μ L 含有 10%FBS 的培养基，在上室中加入 200 μ L 制备好的细胞悬液后将小室放入二氧化碳培养箱中培养 6 小时；

③ 用 PBS 轻轻漂洗 Transwell 小室, 并用棉签擦去上室中的细胞, 用甲醇固定 30 分钟后充分晾干小室, 用含有 1 $\mu\text{g/mL}$ 的 DAPI 溶液避光染色 2 分钟, 并用蒸馏水轻轻漂洗后即可在荧光显微镜下进行观察, 随机选取 5 个视野进行拍照, 对细胞核进行计数并统计迁移细胞的数量。

5 图 1 显示敲弱 CMKLR1 基因, 可抑制卵巢癌细胞系 SKOV3 中转移相关基因的表达。

在卵巢癌细胞系 SKOV3 中用慢病毒转染干扰 CMKLR1 基因的 RNA (shCMKLRA) 技术, 敲弱细胞中内源性 CMKLR1 基因的表达(约敲弱 50%CMKLR1 基因的表达), 然后检测敲弱了 CMKLR1 基因后, 对 SKOV3 中肿瘤转移基因粘蛋白家族-16(MUC16)和基质金属蛋白酶-2(MMP2)的表达水平的影响, 结果显示 MUC16
10 和 MMP2 两个基因表达水平显著降低。* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$ 。

图 2 显示敲弱 CMKLR1 基因, 可抑制卵巢癌细胞系 SKOV3 的迁移和增殖。

检测敲弱 CMKLR1 后对卵巢癌细胞系 SKOV3 迁移(migration)和侵袭(invasion)的影响。SKOV3.shCMKLR1 为转染了 shCMKLR1 干扰 RNA 的细胞系; SKOV3.pSM2c
15 为只转染了空白载体的 SKOV3 细胞系。

迁移实验中(图 2 中的图片 A), 作为对照细胞系, SKOV3.pSM2c, 当 chemerin 处理不同浓度(从 0nM 到 0.5nM)后, 随 chemerin 浓度升高迁移的细胞的数量也逐渐增多, chemerin 处理浓度在 0.02nM 时, 迁移细胞的数量达到最多, chemerin 为 0.5nM 时, 迁移的细胞数量开始降低。

20 当敲弱 CMKLR1 的表达后, 给予不同浓度 chemerin 处理后, SKOV3 细胞几乎没有迁移。

在侵袭实验中(图 2 中的图片 B), chemerin 处理使对照组 SKOV3 细胞系 (SKOV3.pSM2c) 侵袭的数量增加, 但是 CMKLR1 敲弱后, 侵袭的细胞数量显著减少。

25 同时研究组建立了 SKOV3-pSM2c 和 SKOV3-shCMKLR1 细胞系的 Tomato 荧光标记的细胞系。软琼脂克隆实验可检测癌细胞的增殖(图 2 中的图片 C), 结果显示, 敲弱了 CMKLR1 基因的 SKOV3-shCMKLR1 细胞系, 形成克隆的个数和大小, 均明显低于未敲弱 CMKLR1 基因的对照组细胞系 (SKOV3-pSM2c)。

4、敲弱了 CMKLR1 基因的可发光的人卵巢癌细胞系的体内增殖、迁移和侵袭

实验。

本实验中，进行裸鼠皮下荷瘤实验，以验证敲弱了 CMKLR1 基因的可发光的人卵巢癌细胞系的体内增殖、迁移和侵袭的影响。具体操作如下：

- ① 随机选择 6~8 周龄的裸鼠，将可发光的敲弱了 CMKLR1 基因的人卵巢癌细胞制成细胞悬液，将 1×10^{-7} 个/毫升浓度的细胞悬液 0.2 毫升(约含细胞数为 2×10^{-6} 个)的量注射到细胞悬液接种裸鼠背部皮肤内，同时接种了同样细胞数量的 pSM2c-Hu-scramble shRNA 稳转细胞作为对照组；
- ② 利用活体动物成像仪动态追踪观察两组肿瘤细胞模型的生长情况及体内肿瘤的转移情况。

图 3 显示敲弱 CMKLR1 基因，可抑制人卵巢癌细胞在裸鼠皮下的增殖。

将 SKOV3 细胞注射到裸鼠皮下，建立 SKOV3 卵巢癌细胞体内荷瘤肿瘤模型，检测敲弱了 CMKLR1 基因的细胞系在鼠体内形成肿瘤的情况。Tomato-SKOV3.shCMKLR1 为转染了 shCMKLR1 干扰 RNA 的发光细胞系；Tomato-SKOV3.sramble 为只转染了非特异性干扰 RNA (sramble RNA) 的 SKOV3 发光细胞系，作为对照。

将 SKOV3 ipl-sramble RNA-Tomato 细胞和 SKOV3 ipl-shCMKLR1-Tomato 细胞分别注射到小鼠的皮下，在第 7 天 (D7)，第 14 天 (D14)，第 28 天 (D28) 和第 35 天 (D35) 检测 Fluc 生物发光的强度，推断移植皮下肿瘤生长的程度。发光信号越强，发光信号面积越大，表示形成的肿瘤越大。随着时间延长，SKOV3 ipl-sramble RNA-Tomato 细胞在鼠体内增长明显，而 shCMKLR1 细胞几乎没有显著增长。

图 4 显示 CMKLR1 特异性拮抗剂，可抑制人卵巢癌细胞在裸鼠皮下的增殖。

将 Tomato 标记的 SKOV3-Fluc-Tomato 细胞系注射到鼠的皮下，同时鼠腹腔注射不同剂量药物 a-NETA (a-NETA 为 CMKLR1 特异性小分子拮抗剂，可按照以下文献自行制备：Graham KL, Zhang JV (张健), Lewén S, Burke TM, Dang T, Zoudilova M, Sobel RA, Butcher EC, Zabel BA. A Novel CMKLR1 Small Molecule Antagonist Suppresses CNS Autoimmune Inflammatory Disease. PLOS ONE, 2014 Dec 1;9(12):e112925. doi: 10.1371/journal.pone.0112925. eCollection 2014), 每天每公斤体重注射 0.1mg (a-NETA 0.1mg/kg/d)，每天每公斤体重注射 1mg (a-NETA 1mg/kg/d)。在细胞注射后第 7 天 (D7)，第 14 天 (D14)，第 28 天 (D28) 和第 35 天 (D35)

时检测 Fluc 生物发光的强度，推断移植皮下肿瘤生长的程度。发光信号越强，发光信号面积越大，表示形成的肿瘤越大。

在 D7，三个处理组（对照，NETA-0.1mg/kg/d 和 1mg/kg/d）荧光强度无明显变化，在 D14, D28 和 D35，对照组肿瘤组织明显增长，荧光强度逐渐增强。而在 α -NETA 处理组，相比对照组， α -NETA 处理使得 SKOV 细胞肿瘤增长减慢，特别是在 D28 和 D35，荧光强度明显减弱。

实施例 2、干扰 CMKLR1 的基因表达，或拮抗 CMKLR1 的作用，可以有效缓解由 DHT 或 DHEA 引起的实验性小鼠多囊卵巢综合征的症状。

本实施例中，验证了干扰 CMKLR1 的基因表达，或拮抗 CMKLR1 的作用，可以有效缓解由 DHT 或 DHEA 引起的实验性小鼠多囊卵巢综合征的症状。其中，建立了高雄激素 DHT 或 DHEA 引起的实验性小鼠多囊卵巢综合征模型。但是，与野生型小鼠相比，CMKLR1 基因敲除小鼠多囊卵巢综合征的症状明显得到缓解，包括：维持着一定的生理周期，血清中由一定水平的孕酮，卵巢上仍有黄体产生，减少 DHT 引起的卵巢基质和卵泡膜性细胞的调亡。DHT 或 DHEA 引起的实验性小鼠多囊卵巢综合征模型，腹腔给予 CMKLR1 特异性小分子拮抗剂 α -NETA，可以缓解多囊卵巢综合征的症状，包括：血清中维持有一定水平的孕酮，卵巢上仍有黄体产生。

具体如下：

(1) DHT 实验性小鼠多囊卵巢综合征模型

C57BL / 6J 背景的 CMKLR1 基因敲除小鼠购自 Deltagen 有限公司，由斯坦福大学 ZABLE 博士实验室提供。C57BL / 6J 野生型雌性小鼠来自广东省医学实验动物中心。

将动物养在恒定温度和湿度下，12 小时的光-暗循环饲养室内。饲料和水可用自由采食。所有动物的程序，按照动物福利伦理委批准的程序进行。

野生型小鼠：雌鼠在出生后的第 19 天（D19），随机分为：安慰剂组，DHT 组，CMKLR1 拮抗剂组，DHT+CMKLR1 拮抗剂组，每组至少 10 只小鼠）。

CMKLR1 基因缺失小鼠：雌鼠在出生后的第 19 天（D19），随机分为：安慰剂组，DHT 组，每组至少 10 只小鼠。

DHT 组：皮下植入 DHT 持续释放颗粒（美国，萨拉索塔，佛罗里达州的创新研究所）。这些粒料包含的 DHT 的 7.5 毫克，连续 90 天，每日释放剂量为 83.3 微克）。

安慰剂组：小鼠皮下植入安慰剂颗粒 90 天。

CMKLR1 拮抗剂组：皮下植入 1mg CMKLR1 拮抗剂 α -NETA 缓释泵。

DHT+CMKLR1 拮抗剂组：皮下植入 DHT 持续释放颗粒，粒料包含的 DHT 的 7.5 毫克，连续 90 天，每日释放剂量为 83.3 微克。皮下植入 1mg CMKLR1 拮抗剂
5 α -NETA 缓释泵。

在开始和治疗结束时称量体重，在治疗期 90 天结束时的处死小鼠。此外，在 90-D 治疗期结束时，收集血样和组织。将小鼠用异氟烷麻醉，眶后穿刺收集血样。分离卵巢和子宫，性腺脂肪，称重，并在 4%多聚甲醛液流体过夜固定。此外，离体组织快速冷冻在液氮中，直至进一步处理。

10 图 5A 和图 5B 显示了 CMKLR1 基因的缺失对双氢睾酮引起的发情周期改变的影响。

如图 5A 所示，使用安慰剂的野生型小鼠 (WT-control)，12 天内一般会有 2-3 个发情周期（每个周期从发情前期 (P)，发情期 (E)，发情后期 (M)，到发情间期 (D)）；而经过双氢睾酮 (DHT) 处理 90 天的野生型小鼠 (WT-DHT)，其生理周期都处于发
15 情间期 (D)，没有完整的发情周期。双氢睾酮严重影响了小鼠的正常生理周期。

图 5B 中，a 是野生型小鼠对照组和处理组两组之间量化的比较，统计学具有显著意义 ($aP<0.01$)。

使用了安慰剂的 CMKLR1 基因缺失小鼠 (cmklr1 -/- control)，12 天内也会有 2-3 个发情周期。当使用双氢睾酮诱发 CMKLR1 基因缺失小鼠后 (cmklr1 -/- DHT)，仍然有较完整的生理周期 (P, E, M, D)，有 1 到 2 个完整的生理周期。图 1B 中，b
20 是 CMKLR1 基因缺失两组之间量化的比较，统计学具有显著意义 ($bP<0.05$)；d 是双氢睾酮处理的野生型小鼠和 CMKLR1 基因缺失小鼠两组之间的比较，CMKLR1 基因缺失明显改善了对小鼠生理周期的影响，统计学具有显著意义 ($dP<0.001$)。

25 WT, wild type: 野生型小鼠。Cmklr1 -/-: CMKLR1 基因缺失小鼠。Control (Ctl): 对照安慰剂组。DHT, 双氢睾酮: 埋植了双氢睾酮的实验组。P: proestrous: 发情前期。D: diestrous: 发情间期。E: estrous: 发情期。M: metestrous: 发情后期。days: 天数。Estrous Cycles: 发情周期。

图 6 显示了 CMKLR1 基因的缺失，对双氢睾酮引起的小鼠血清中激素水平的影

响。

对比四组小鼠处理组（WT-Control，WT-DHT，CMKLR1-/-Control，CMKLR1-/-DHT）血清中双氢睾酮（DHT）的含量，其中WT-Control和CMKLR1-/-Control组中DHT含量都在100pg/mL左右，而在WT-DHT和CMKLR1-/-DHT处理组，血清中DHT的含量分别上升到200pg/mL左右，证明了双氢睾酮处理组造模成功。

然后分别对血清中雌激素（estradiol）和孕酮（progesterone）的水平进行了检测：雌激素在WT-Control和CMKLR1-/-Control组维持在5pg/mL左右，而DHT处理降低了WT小鼠中雌激素的水平；在CMKLR1-/-小鼠中，DHT的处理并未显著性的影响血清中雌激素的含量。同时，DHT的处理也降低了WT小鼠血清中孕酮的含量，而对于CMKLR1-/-小鼠，DHT并未影响血清中孕酮正常水平的表达。图6中，a是野生型小鼠对照组和DHT处理组两组之间量化的比较；b是CMKLR1基因缺失对照组和DHT处理组两组之间量化的比较；d是DHT双氢睾酮处理的野生型小鼠和CMKLR1基因缺失小鼠两组之间的比较。P<0.05代表统计学差异上有显著意义。

图7显示了CMKLR1基因的缺失，对双氢睾酮引起的小鼠卵巢结构的影响。

对比四组小鼠处理组（Wild type-placebo，wild type-DHT，CMKLR1-/-placebo，CMKLR1-/-DHT）的卵巢的形态，WT-Control和CMKLR1-/-Control小鼠的卵巢有各个发育时期的卵泡及黄体。DHT处理的WT小鼠（WT-DHT）的大部分卵泡已经萎缩，卵巢中没有黄体。而DHT处理的CMKLR1-/-（CMKLR1-/-DHT）小鼠中卵泡的发育比较正常，也能观察到完整的黄体。

图8A和图8B显示了CMKLR1基因的缺失，对双氢睾酮引起的小鼠卵泡细胞凋亡的影响。

对比四组小鼠处理组（WT-Control，WT-DHT，CMKLR1-/-Control，CMKLR1-/-DHT）卵巢中的凋亡信号（Tunnel染色—绿色），蓝色信号为染核的DAPI信号。野生小鼠（WT）和CMKLR1基因缺失小鼠（CMKLR1-/-）对照组卵巢中的卵泡颗粒细胞（granulosa cell），卵泡膜细胞（theca cell），及卵泡间质细胞（interstitial cell）中都未发现明显凋亡着色（绿色），而在野生小鼠（WT）和CMKLR1基因缺失小鼠（CMKLR1-/-）的双氢睾酮（DHT）处理组的卵巢中，卵泡颗粒细胞（granulosa cell），卵泡膜细胞（theca cell），及卵泡间质细胞（interstitial cell）中有明显的着色（如图

8A 中所示)。其中,图 8B 中计算了四组小鼠处理组分别在卵泡颗粒细胞 (granulosa cell), 卵泡膜细胞 (theca cell), 及卵泡间质细胞 (interstitial cell) 中凋亡细胞的数量, 统计分析显示, DHT 处理增加了三种组织中凋亡细胞的数量, 其中在颗粒细胞 (granulosa) 中, DHT 处理显著增加在 CMKLR1^{-/-} 小鼠中的凋亡细胞。DHT 处理使得野生小鼠的膜细胞 (theca) 和间质细胞 (interstitial cell) 凋亡信号增加中, 相应的, DHT 处理导致 CMKLR1 基因缺失小鼠 (CMKLR1^{-/-}) 膜细胞和间质细胞凋亡信号明显比野生型小鼠的弱。图中, a 是野生型小鼠对照组和 DHT 处理组两组之间量化的比较; b 是 CMKLR1 基因缺失对照组和 DHT 处理组两组之间量化的比较; d 是 DHT 双氢睾酮处理的野生型小鼠和 CMKLR1 基因缺失小鼠两组之间的比较。P<0.05 代表统计学差异上有显著意义。

图 9 显示了 CMKLR1 基因的缺失, 对双氢睾酮引起的卵巢组织中激素合成相关酶基因表达的影响。

在四组小鼠处理组 (WT-Control, WT-DHT, CMKLR1^{-/-}-Control, CMKLR1^{-/-}-DHT) 中, 检测了卵巢中的类固醇激素合成快速调节蛋白 (steroidogenic acute regulatory protein, StAR), 胆固醇侧链裂解酶 (cholesterol-side-chain cleavage enzyme, P450scc), 3 β -羟类固醇脱氢酶 (3 β HSD), 骨形态发生蛋白 2 (BMP2) 和骨形态发生蛋白 4 (BMP4) mRNA 水平的表达。

StAR, P450scc, 3 β HSD 的表达在野生小鼠 (WT) 和 CMKLR1 基因缺失小鼠 (CMKLR1^{-/-}) 对照处理组卵巢中未有明显的差别。当双氢睾酮 (DHT) 处理后, 三个基因的表达在 WT 小鼠中显著性降低, 而在 CMKLR1^{-/-}组中, 三个基因相比 WT 组表达量显著性增高。

BMP2 和 BMP4 是 BMP 信号通路中的信号分子。BMP2 在 CMKLR1^{-/-}小鼠卵巢中的表达较野生小鼠卵巢中的表达显著升高。而 DHT 处理多 BMP2 的表达没有明显的影响。

而 BMP4 在 WT 和 CMKLR1^{-/-}对照组小鼠卵巢中表达无差别, DHT 处理增高了 BMP4 在野生小鼠卵巢中的表达, 但是在 CMKLR1^{-/-}组无显著性增加。

图 9 中, a 是野生型小鼠对照组和 DHT 处理组两组之间量化的比较; b 是 CMKLR1 基因缺失对照组和 DHT 处理组两组之间量化的比较; d 是 DHT 双氢睾酮处理的野生型小鼠和 CMKLR1 基因缺失小鼠两组之间的比较。P<0.05 代表统计学差异上有显著

意义。

图 10 显示了 CMKLR1 特异性拮抗剂, α -NETA, 对双氢睾酮引起的小鼠卵巢结构、激素合成酶等基因表达的影响。

观察四组野生小鼠 (control, NETA, DHT, DHT+NETA) 卵巢的形态。Control (溶剂对照组), α -NETA (α -NETA 单独处理组), DHT (双氢睾酮单独处理组), DHT+NETA (α -NETA 和双氢睾酮协同处理组)。

溶剂对照组和 NETA 处理组卵巢中黄体 (corpus luteum, CL) 的数量未有明显的差别; DHT 处理以后, 小鼠卵巢中未观察到黄体, 而用 NETA 和 DHT 共同处理小鼠的卵巢中仍有黄体的出现。

分别检测这四组小鼠血清中 DHT, 雌激素 (Estradiol) 和孕酮 (progesterone) 的含量, 其中 DHT 单独处理及 DHT 与 NETA 协同处理均增加小鼠血清中 DHT 的含量 (证明 DHT 造模成功), DHT 单独处理降低了血清孕酮的含量, NETA 与 DHT 协同处理, 不影响血清中 DHT 的含量, 但是升高了 DHT 处理引起的血清中孕酮水平。血清中雌激素的含量并没有收到影响。

检测卵巢中激素关键合成酶 3β -羟类固醇脱氢酶 (3 β HSD) mRNA 水平的表达, 结果显示, DHT 处理降低了 3 β -HSD mRNA 水平, 而 NETA 的单独处理不影响 3 β -HSD mRNA 水平, 但是 NETA 和 DHT 共同处理后, 升高了 3 β -HSD mRNA 水平。

胱天蛋白酶-3 (Caspase-3) 水平增加, 可显示卵巢中凋亡信号增高。DHT 单独处理可显著性增加卵巢凋亡相关性酶 Caspase3 的表达, 而与 NETA 协同处理后, NETA 能够降低 DHT 对 Caspase3 表达的刺激作用。* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$ 。

(2) DHEA 实验性小鼠多囊卵巢综合征模型

野生型小鼠: 雌鼠在出生后的第 19 天 (D19), 随机分为: 对照组, DHEA 组, CMKLR1 拮抗剂组, DHEA+CMKLR1 拮抗剂组, 每组至少 10 只小鼠)。

CMKLR1 基因缺失小鼠: 雌鼠在出生后的第 19 天 (D19), 随机分为: 对照组, DHEA 组, 每组至少 10 只小鼠)。

对照组: 按照 6mg/100g 皮下注射芝麻油, 按照 1mg/kg 腹腔注射生理盐水。

DHEA 组: 按照 6mg/100g 皮下注射 DHEA, 按照 1mg/kg 腹腔注射注射生理盐水。

CMKLR1 拮抗剂组: 按照 6mg/100g 皮下注射芝麻油, 按照 1mg/kg 腹腔注射

CMKLR1 拮抗剂 α -NETA。

DHEA+CMKLR1 拮抗剂组：按照 6mg/100g 皮下注射 DHEA，按照 1mg/kg 腹腔注射 CMKLR1 拮抗剂 α -NETA。

5 在开始和治疗结束时称量体重，在治疗期 21 天结束时的处死小鼠。此外，在 21 天治疗期结束时，收集血样和组织。将小鼠用异氟烷麻醉，眶后穿刺收集血样。分离卵巢和子宫，性腺脂肪，称重，并在 4%多聚甲醛液流体过夜固定。此外，离体组织快速冷冻在液氮中，直至进一步处理。

图 11 显示了 CMKLR1 特异性拮抗剂 α -NETA，对 DHEA 引起的小鼠卵巢结构的影响。

10 四组小鼠处理组（cnontrol, α -NETA, DHEA, DHEA+ α -NETA）中卵巢中卵泡形态对比。Control（溶剂对照组）， α -NETA（ α -NETA 单独处理组），DHEA（脱氢表雄酮单独处理组），DHEA+NETA（ α -NETA 和脱氢表雄酮协同处理组）。在 control 和 NETA 处理组，可以观察到形态完整的二级卵泡，说明溶剂对照组和 NETA 的处理多卵泡的发育没有明显的影响。DHEA 的处理使得卵泡的发育发生了明显的改变，在卵
15 巢中未发现发育成熟的二级卵泡和排卵前卵泡。而在 DHEA+NETA 处理组中，二级卵泡的发育明显改善，有发育成熟的卵泡，说明了 NETA 对卵泡的发育的保护作用。

图 12A 和图 12B 显示了 CMKLR1 特异性拮抗剂 α -NETA，对 DHEA 引起的小鼠卵泡细胞凋亡的影响。

四组野生小鼠（WT）处理组（cnontrol, NETA, DHEA, DHEA+NETA）中卵巢
20 中凋亡信号的比较。凋亡信号（Tunnel 染色—绿色），蓝色信号为染核的 DAPI 信号。Control（溶剂对照组）， α -NETA（ α -NETA 单独处理组），DHEA（脱氢表雄酮单独处理组），DHEA+NETA（ α -NETA 和脱氢表雄酮协同处理组）。

图 12A，在野生小鼠脱氢表雄酮处理组（WT-DHEA）中，卵泡的颗粒细胞（granulosa cell, GC），膜细胞（Theca cell, TC）及间质细胞（interstitial cell, IC）中
25 有较多的凋亡细胞；而与 NETA 协同处理后（WT-NETA-DHEA），膜细胞（TC）中凋亡细胞明显减少，间质细胞（IC）中的凋亡细胞也显著减少。图 12B 分别对比计算了 WT 小鼠在 Ctrl、NETA、DHEA、DHEA+NETA 处理组中在 GC、TC 和 IC 中凋亡细胞的数量。*P<0.05, **P<0.01, ***P<0.001。

权利要求书

1、针对 CMKLR1 的拮抗剂在制备用于预防和/或治疗雌性生殖疾病的药物中的应用。

2、根据权利要求 1 所述的应用，其中，所述针对 CMKLR1 的拮抗剂为降低
5 CMKLR1 的表达水平和/或拮抗 CMKLR1 的作用的试剂，例如可包括 siRNA、shRNA、反义 RNA、抗体或其组合。

3、根据权利要求 1 所述的应用，其中，所述针对 CMKLR1 的拮抗剂为 shRNA、和/或 α -NETA。

4、根据权利要求 3 所述的应用，其中，所述 shRNA 具有如 SEQ ID No. 1 所示
10 序列。

5、根据权利要求 1 所述的应用，其中，所述雌性生殖疾病包括多囊卵巢综合征和/或卵巢癌。

6、根据权利要求 1 所述的应用，其中，所述预防和/或治疗雌性生殖疾病包括：缓解多囊卵巢综合征症状，和/或抑制卵巢癌细胞增殖。

7、一种预防和/或治疗雌性生殖疾病的药物组合物，该药物组合物包含针对
15 CMKLR1 的拮抗剂。

8、根据权利要求 7 所述的药物组合物，其中，所述针对 CMKLR1 的拮抗剂为降低 CMKLR1 的表达水平和/或拮抗 CMKLR1 的作用的试剂，例如 siRNA、shRNA、反义 RNA、抗体或其组合。

9、根据权利要求 7 所述的药物组合物，其中，所述针对 CMKLR1 的拮抗剂为
20 shRNA 和/或 α -NETA。

10、根据权利要求 9 所述的药物组合物，其中，所述 shRNA 具有如 SEQ ID No. 1 所示序列。

11、一种预防和/或治疗雌性生殖疾病的方法，该方法包括：以 CMKLR1 为靶点，
25 降低 CMKLR1 的表达水平和/或拮抗 CMKLR1 的作用，以预防和/或治疗雌性生殖疾病。

12、根据权利要求 11 所述的方法，其中，是利用针对 CMKLR1 的拮抗剂降低 CMKLR1 的表达水平和/或拮抗 CMKLR1 的作用，所述针对 CMKLR1 的拮抗剂包括

siRNA、shRNA、反义 RNA、抗体或其组合。

13、根据权利要求 11 所述的方法，其中，所述针对 CMKLR1 的拮抗剂为 shRNA 和/或 α -NETA，该方法是利用 shRNA 敲弱 CMKLR1 的表达水平，或是利用 α -NETA 拮抗 CMKLR1 的作用。

5 14、根据权利要求 13 所述的方法，其中，所述 shRNA 具有如 SEQ ID No. 1 所示序列。

15、根据权利要求 11 所述的方法，该方法是用于缓解多囊卵巢综合征症状，和/或抑制卵巢癌细胞增殖。

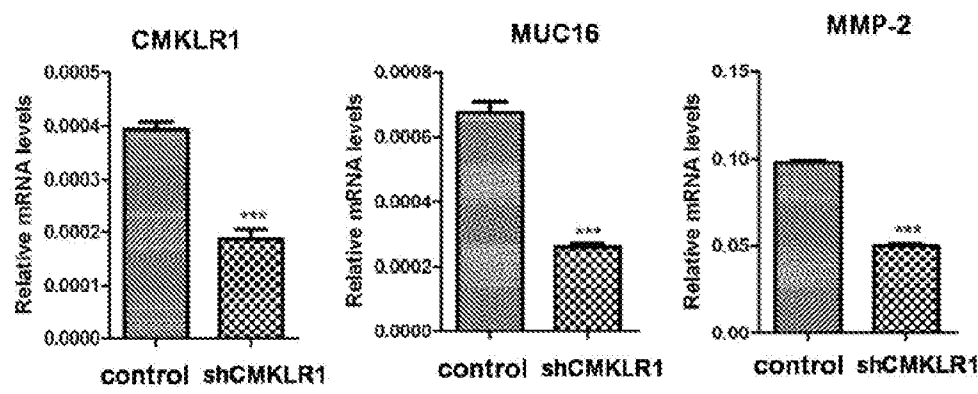


图 1

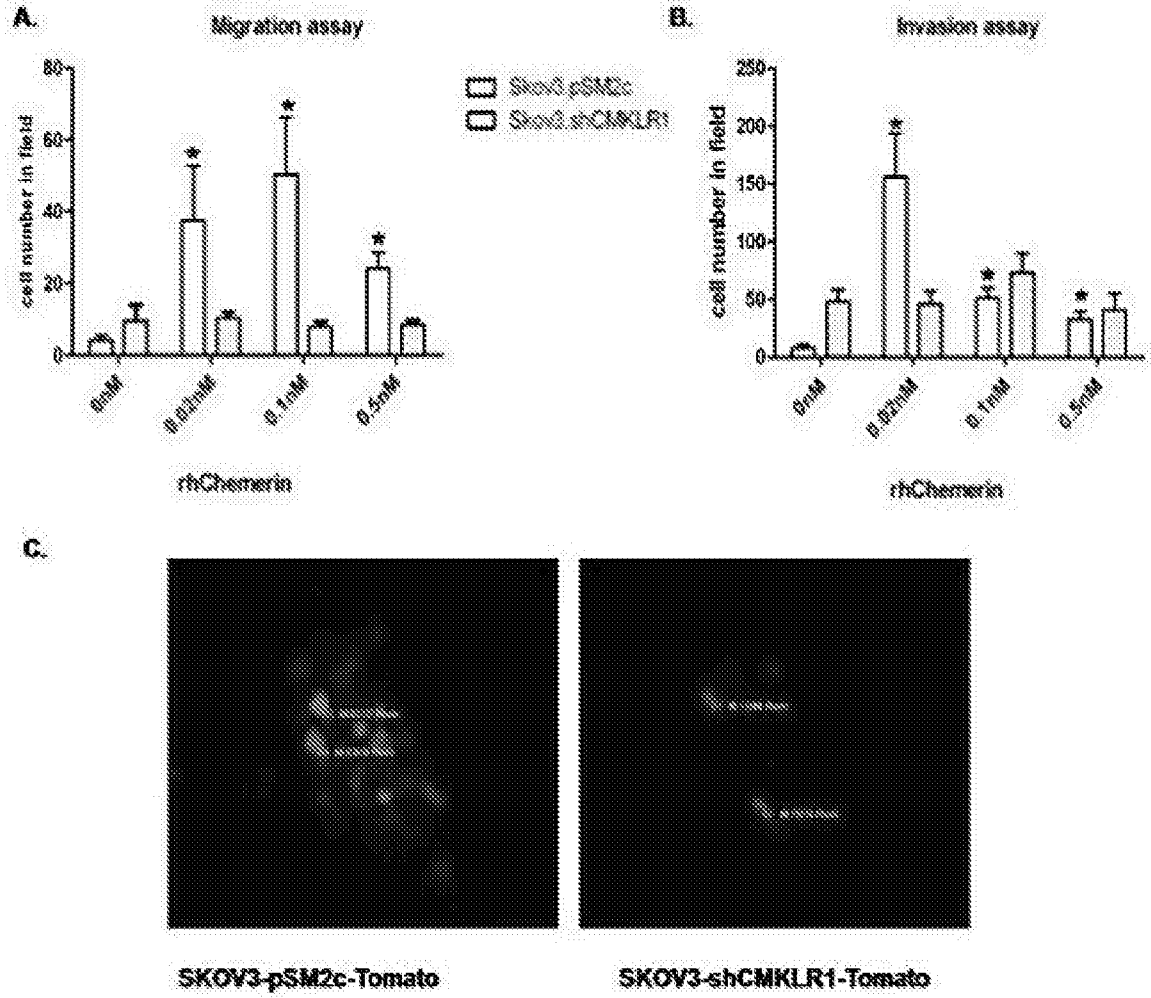


图 2

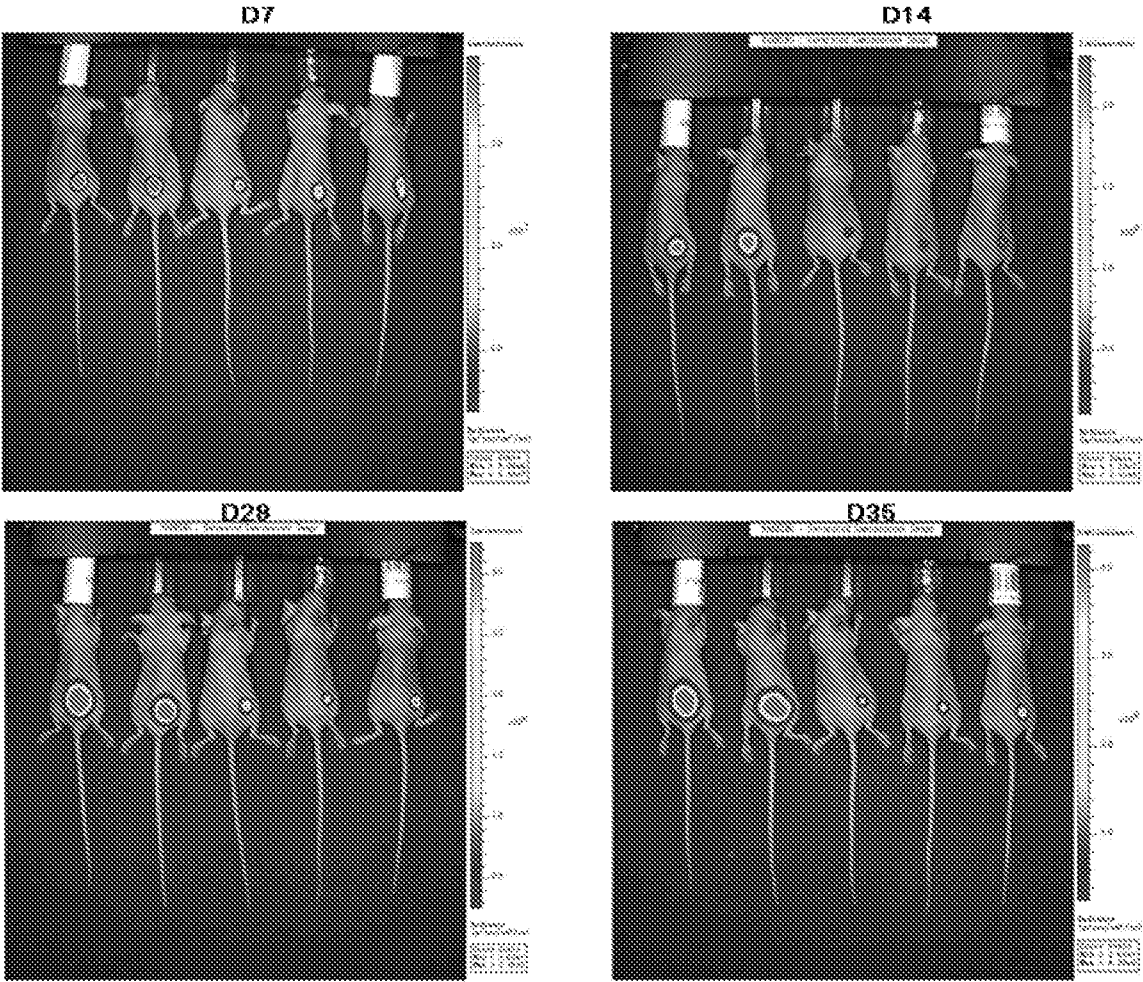


图 3

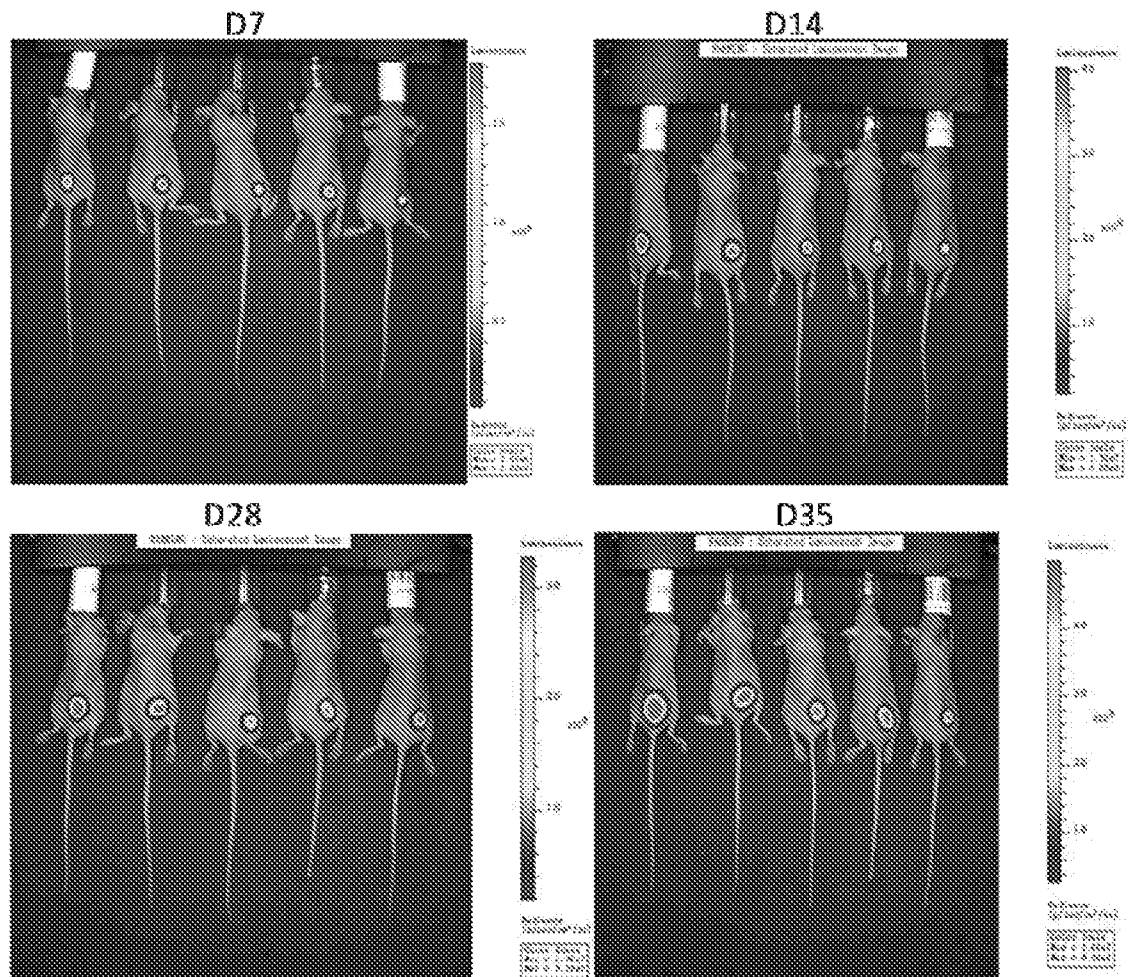


图 4

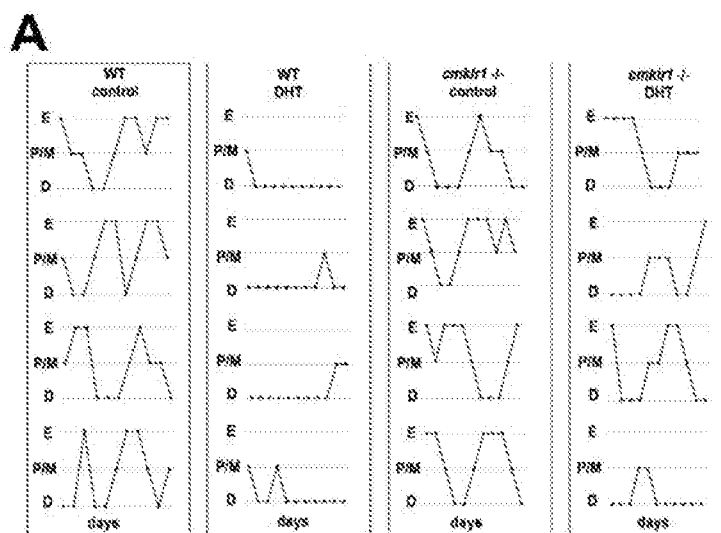


图 5A

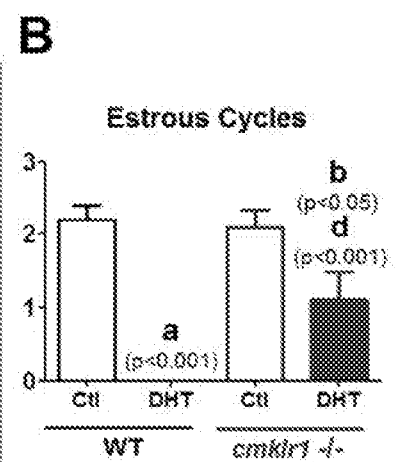


图 5B

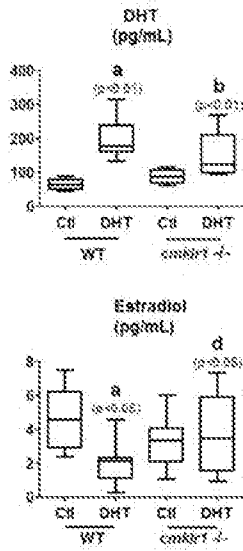


图 6

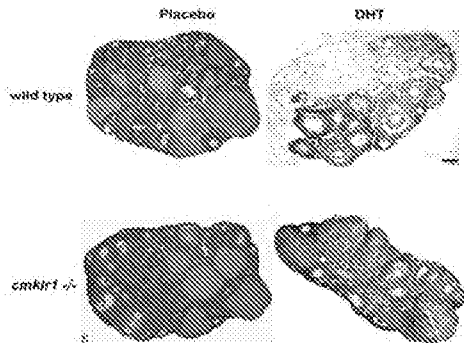


图 7

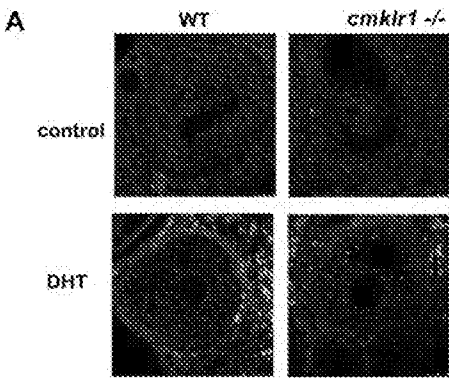


图 8A

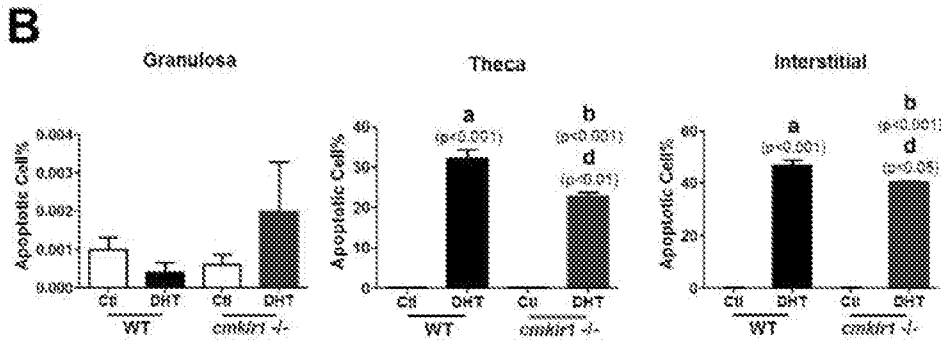


图 8B

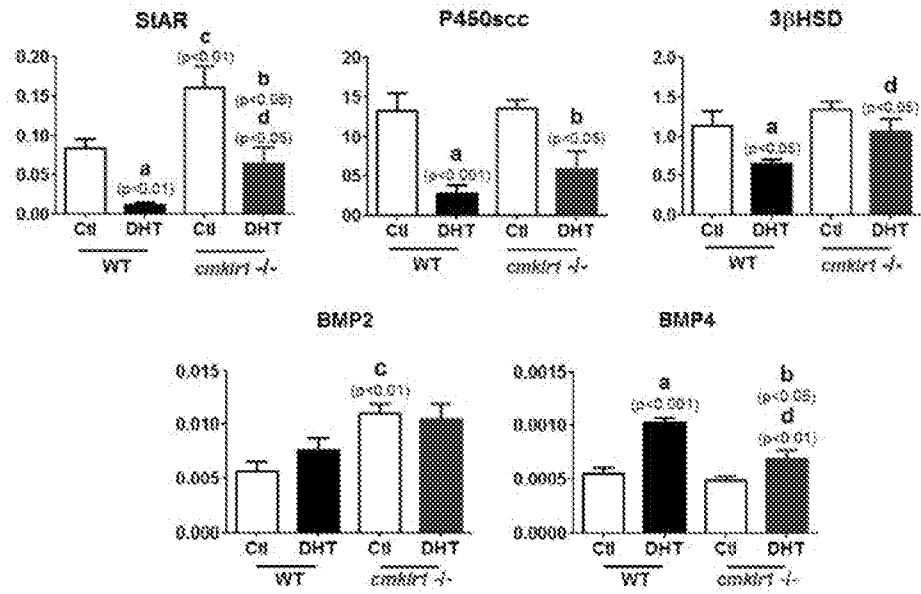


图 9

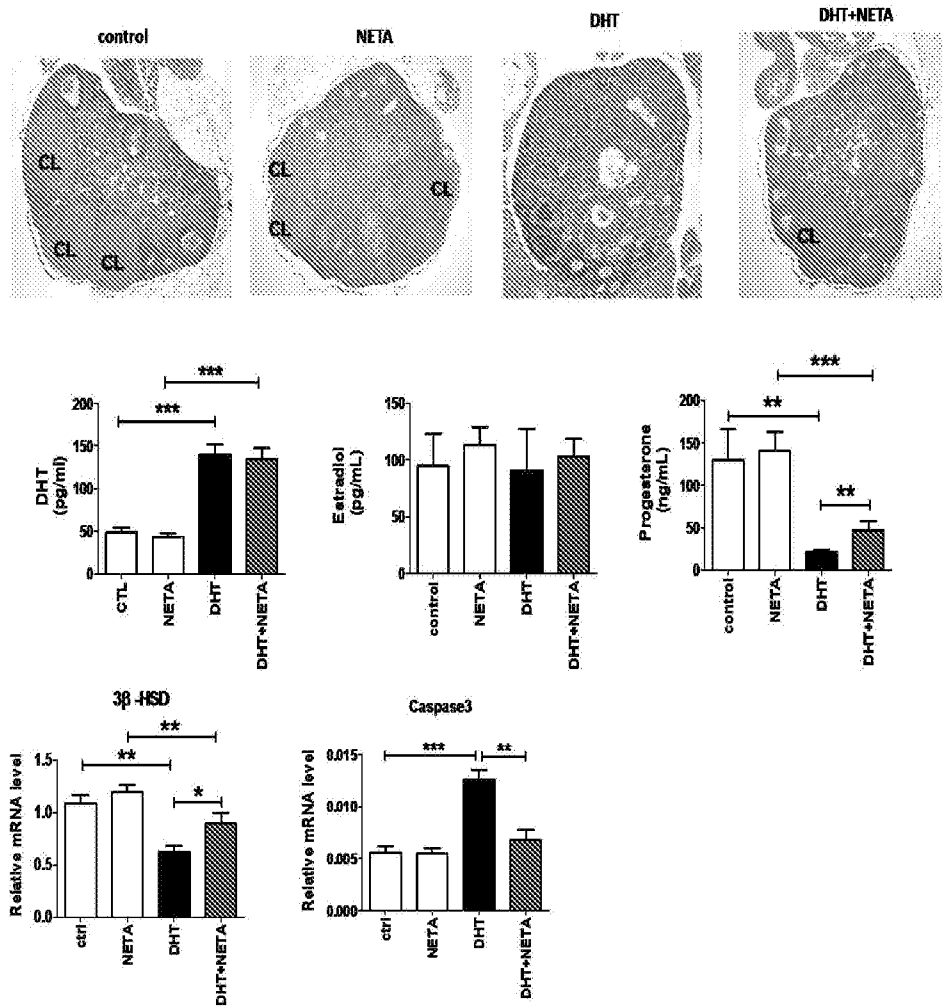


图 10

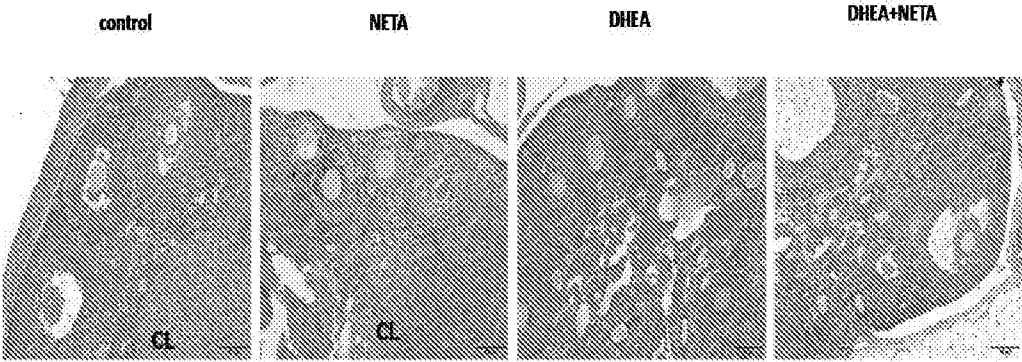


图 11

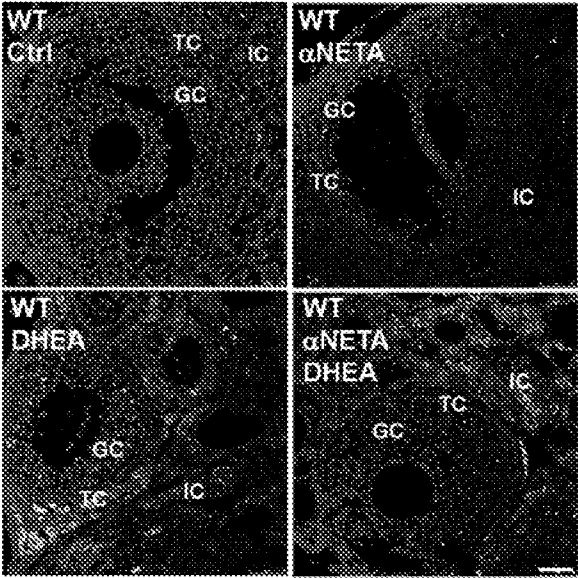


图 12A

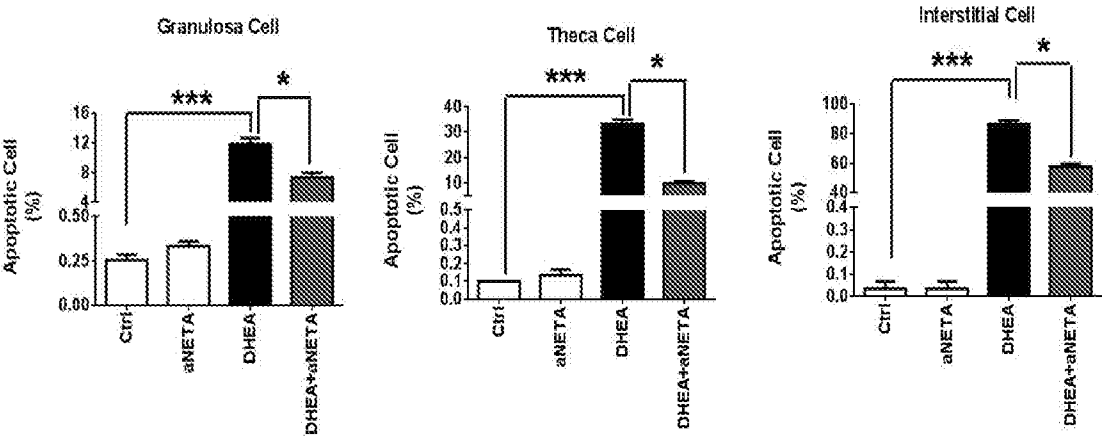


图 12B

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/CN2015/099464

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

C12N 15/113 (2010.01) i; A61K 31/7105 (2006.01) i; A61K 39/395 (2006.01) i; A61P 15/00 (2006.01) i; A61P 35/04 (2006.01) i
According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

C12N; A61K; A61P

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

Data Bases: CPRSABS, CNABS, CNTXT, DWPI, SIPOABS, CNKI, PubMed, GenBank+DDBJ+EMBL, National Bio-Sequence Database of Chinese Patent

Search Terms: chemokine, adipocyte factor, small interfering RNA, short hairpin RNA, CMKLR1, chemokine like receptor 1, chemerin, receptor, reproductive, PCOS, polycystic ovary syndrome, OAC, ovarian cancer, siRNA, shRNA, antisense RNA, NETA, antibody, antagonist, agonist, search on SEQ ID No. 1

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	CN 104434888 A (SHENZHEN INSTITUTES OF ADVANCED TECHNOLOGY), 25 March 2015 (25.03.2015), see abstract, claims 1-2, and description, page 3, paragraphs [0019] and [0020]	7-9
A	US 2007286863 A1 (SINAL, C. et al.), 13 December 2007 (13.12.2007), see the whole document	1-10
A	CN 104884087 A (ADELAIDE RESEARCH & INNOVATION PTY LTD., PETER MACCALLUM CANCER CENTRE), 02 September 2015 (02.09.2015), see the whole document	1-10

☐ Further documents are listed in the continuation of Box C.

☒ See patent family annex.

* Special categories of cited documents:	“T” later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
“A” document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance	“X” document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
“E” earlier application or patent but published on or after the international filing date	“Y” document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art
“L” document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)	“&” document member of the same patent family
“O” document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means	
“P” document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed	

Date of the actual completion of the international search 27 August 2016 (27.08.2016)	Date of mailing of the international search report 12 September 2016 (12.09.2016)
Name and mailing address of the ISA/CN: State Intellectual Property Office of the P. R. China No. 6, Xitucheng Road, Jimenqiao Haidian District, Beijing 100088, China Facsimile No.: (86-10) 62019451	Authorized officer YU, Ting Telephone No.: (86-10) 010-62089322

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/CN2015/099464

Box No. II Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 2 of first sheet)

This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1. ☒ Claims Nos.: 11-15
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:
[1] claims 11-15 relate to a treatment method for an illness in a human or animal body.
2. ☐ Claims Nos.:
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:
3. ☐ Claims Nos.:
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

INTERNATIONAL SEARCH REPORT
Information on patent family members

International application No.

PCT/CN2015/099464

Patent Documents referred in the Report	Publication Date	Patent Family	Publication Date
CN 104434888 A	25 March 2015	None	
US 2007286863 A1	13 December 2015	None	
CN 104884087 A	02 September 2015	EP 2892560 A4	23 March 2016
		WO 2014036608 A1	13 March 2014
		AU 2013313026 A1	16 April 2015
		US 2015291698 A1	15 October 2015
		EP 2892560 A1	15 July 2015

A. 主题的分类 C12N 15/113(2010.01)i; A61K 31/7105(2006.01)i; A61K 39/395(2006.01)i; A61P 15/00(2006.01)i; A61P 35/04(2006.01)i 按照国际专利分类(IPC)或者同时按照国家分类和IPC两种分类														
B. 检索领域 检索的最低限度文献(标明分类系统和分类号) C12N; A61K; A61P 包含在检索领域中的除最低限度文献以外的检索文献 在国际检索时查阅的电子数据库(数据库的名称, 和使用的检索词(如使用)) 数据库: CPRSABS, CNABS, CNTXT, DWPI, SIPOABS, CNKI, PubMed, GenBank+DDBJ+EMBL, 中国专利生物序列检索系统 关键词: 类趋化因子受体1, 趋化因子, 脂肪因子, 受体, 生殖, 多囊卵巢综合征, 卵巢癌, 小干扰RNA, 短发夹RNA, 反义RNA, 抗体, 拮抗剂, CMKLR1, chemokine like receptor 1, chemerin, receptor, reproductive, PCOS, polycystic ovary syndrome, OAC, ovarian cancer, siRNA, shRNA, antisense RNA, NETA, antibody, antagonist, agonist, 对SEQ ID No. 1的序列进行检索														
C. 相关文件 <table border="1"> <thead> <tr> <th>类 型*</th> <th>引用文件, 必要时, 指明相关段落</th> <th>相关的权利要求</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>X</td> <td>CN 104434888 A (深圳先进技术研究院) 2015年 3月 25日 (2015 - 03 - 25) 参见摘要和权利要求1-2, 说明书第3页第[0019]和[0020]段</td> <td>7-9</td> </tr> <tr> <td>A</td> <td>US 2007286863 A1 (SINAL CHRISTOPHER等) 2007年 12月 13日 (2007 - 12 - 13) 参见全文</td> <td>1-10</td> </tr> <tr> <td>A</td> <td>CN 104884087 A (阿德莱德研究创新有限公司, 彼得麦卡勒姆癌症研究中心) 2015年 9月 2日 (2015 - 09 - 02) 参见全文</td> <td>1-10</td> </tr> </tbody> </table>			类 型*	引用文件, 必要时, 指明相关段落	相关的权利要求	X	CN 104434888 A (深圳先进技术研究院) 2015年 3月 25日 (2015 - 03 - 25) 参见摘要和权利要求1-2, 说明书第3页第[0019]和[0020]段	7-9	A	US 2007286863 A1 (SINAL CHRISTOPHER等) 2007年 12月 13日 (2007 - 12 - 13) 参见全文	1-10	A	CN 104884087 A (阿德莱德研究创新有限公司, 彼得麦卡勒姆癌症研究中心) 2015年 9月 2日 (2015 - 09 - 02) 参见全文	1-10
类 型*	引用文件, 必要时, 指明相关段落	相关的权利要求												
X	CN 104434888 A (深圳先进技术研究院) 2015年 3月 25日 (2015 - 03 - 25) 参见摘要和权利要求1-2, 说明书第3页第[0019]和[0020]段	7-9												
A	US 2007286863 A1 (SINAL CHRISTOPHER等) 2007年 12月 13日 (2007 - 12 - 13) 参见全文	1-10												
A	CN 104884087 A (阿德莱德研究创新有限公司, 彼得麦卡勒姆癌症研究中心) 2015年 9月 2日 (2015 - 09 - 02) 参见全文	1-10												
☐ 其余文件在C栏的续页中列出。 ☒ 见同族专利附件。														
* 引用文件的具体类型: “A” 认为不特别相关的表示了现有技术一般状态的文件 “E” 在国际申请日的当天或之后公布的在先申请或专利 “L” 可能对优先权要求构成怀疑的文件, 或为确定另一篇引用文件的公布日而引用的或者因其他特殊理由而引用的文件(如具体说明的) “O” 涉及口头公开、使用、展览或其他方式公开的文件 “P” 公布日先于国际申请日但迟于所要求的优先权日的文件 “T” 在申请日或优先权日之后公布, 与申请不相抵触, 但为了理解发明之理论或原理的在后文件 “X” 特别相关的文件, 单独考虑该文件, 认定要求保护的发明不是新颖的或不具有创造性 “Y” 特别相关的文件, 当该文件与另一篇或者多篇该类文件结合并且这种结合对于本领域技术人员为显而易见时, 要求保护的发明不具有创造性 “&” 同族专利的文件														
国际检索实际完成的日期 2016年 8月 27日		国际检索报告邮寄日期 2016年 9月 12日												
ISA/CN的名称和邮寄地址 中华人民共和国国家知识产权局(ISA/CN) 中国北京市海淀区蓟门桥西土城路6号 100088 传真号 (86-10)62019451		授权官员 于婷 电话号码 (86-10)010-62089322												

第II栏

某些权利要求被认为是不能检索的意见(续第1页第2项)

根据条约第17条(2)(a)，对某些权利要求未做国际检索报告的理由如下：

1. ☒ 权利要求： 11-15
因为它们涉及不要求本单位进行检索的主题，即：
[1] 权利要求11—15涉及人或动物的疾病的治疗方法
2. ☐ 权利要求：
因为它们涉及国际申请中不符合规定的要求的部分，以致不能进行任何有意义的国际检索， 具体地说：
3. ☐ 权利要求：
因为它们是从属权利要求，并且没有按照细则6.4(a)第2句和第3句的要求撰写。

国际检索报告
关于同族专利的信息

国际申请号

PCT/CN2015/099464

检索报告引用的专利文件			公布日 (年/月/日)	同族专利			公布日 (年/月/日)
CN	104434888	A	2015年 3月 25日	无			
US	2007286863	A1	2007年 12月 13日	无			
CN	104884087	A	2015年 9月 2日	EP	2892560	A4	2016年 3月 23日
				WO	2014036608	A1	2014年 3月 13日
				AU	2013313026	A1	2015年 4月 16日
				US	2015291698	A1	2015年 10月 15日
				EP	2892560	A1	2015年 7月 15日