

(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8月3日 (03.08.2017)



(10) 国际公布号  
WO 2017/128880 A1

- (51) 国际专利分类号:  
C07K 16/18 (2006.01) A61K 39/395 (2006.01)  
C12N 15/11 (2006.01)
- (21) 国际申请号: PCT/CN2016/109847
- (22) 国际申请日: 2016年12月14日 (14.12.2016)
- (25) 申请语言: 中文
- (26) 公布语言: 中文
- (30) 优先权:  
201610056295.3 2016年1月27日 (27.01.2016) CN
- (71) 申请人: 上海科技大学 (SHANGHAI TECH UNIVERSITY) [CN/CN]; 中国上海市浦东新区海科路100号, Shanghai 201210 (CN)。
- (72) 发明人: 曲志虎 (QU, Zhihu); 中国上海市浦东新区海科路100号, Shanghai 201210 (CN)。 杨光 (YANG, Guang); 中国上海市浦东新区海科路100号, Shanghai 201210 (CN)。 马马诺·法比奥 (MAM-MANO, Fabio); 中国上海市浦东新区海科路100号, Shanghai 201210 (CN)。 范思科 (ZONTA, Francesco); 中国上海市浦东新区海科路100号, Shanghai 201210 (CN)。
- (74) 代理人: 上海申汇专利代理有限公司 (SHANGHAI SHENHUI PATENT AGENT CO., LTD.); 中国上海市徐汇区漕宝路80号405室, Shanghai 200235 (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, DJ, 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, KH, KN, KP, KR, KW, 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)。

[见续页]

(54) Title: FULLY HUMAN ANTIBODY SPECIFICALLY INHIBITING CONNEXIN 26

(54) 发明名称: 一种特异性抑制连接蛋白26的全人抗体

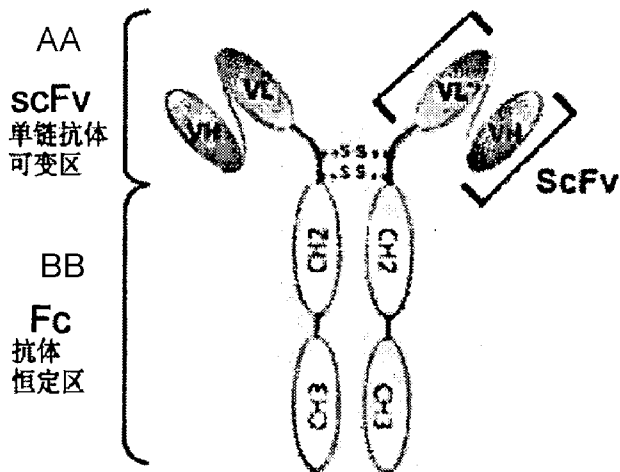


图 2A

AA scFv single-chain antibody variable region  
 BB Fc antibody constant region

(57) Abstract: Disclosed is a fully human antibody specifically inhibiting a connexin 26. The antibody is a recombinant immunoglobulin having the structure of scFv-Fc. scFv refers to a single-chain antibody comprising a heavy chain variable region and a light chain variable region, wherein the amino acid sequence of the heavy chain variable region is set forth in SEQ ID NO: 1 and the amino acid sequence of the light chain variable region is set forth in SEQ ID NO: 2. Fc refers to a constant region. An amino acid sequence from the 41<sup>st</sup> to the 56<sup>th</sup> amino acids in an extracellular region of human connexin 26, i.e., KEVWGDEQADFVCNTL, is used as an antigen. The invention is obtained by employing a single-chain antibody phage display library and a screening technique. A biochemical analysis and an immunofluorescent identification of the antibody indicated that the antibody specifically recognizes the connexin 26 and inhibits an activity of a hemichannel formed by the connexin 26. An animal test showed that the antibody exerted a significant inhibitory effect on the activity of a hemichannel in a murine cochlear tissue slice. Therefore, the antibody can be used for the treatment of a

disease associated with connexin mutation.

(57) 摘要:

[见续页]

WO 2017/128880 A1



**根据细则 4.17 的声明:**

- 发明人资格(细则 4.17(iv))

**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))。

---

一种特异性抑制连接蛋白 26 的全人抗体，其为重组免疫球蛋白，结构为 scFv-Fc，scFv 指的是单链抗体，包括重链可变区和轻链可变区，其重链可变区的氨基酸序列为 SEQ ID NO: 1，其轻链可变区的氨基酸序列为 SEQ ID NO: 2，Fc 指的是恒定区。用人连接蛋白 26 胞外区第 41-56 氨基酸序列为抗原，序列为 KEVWGDEQAD-FVCNTL。通过单链抗体噬菌体展示库及筛选技术获得，通过对该抗体的生化分析和免疫荧光鉴定，确定其能特异性识别连接蛋白 26，并抑制其形成的半通道活性。动物试验表明，该抗体对鼠耳蜗组织切片的半通道活性有显著抑制作用。因此，该抗体可用于连接蛋白突变相关疾病治疗。

# 一种特异性抑制连接蛋白 26 的全人抗体

## 技术领域

本发明属于生物医药技术领域，具体而言本发明提供特异识别人耳蜗、皮肤组织表达的连接蛋白 26 (Connexin26) 抗原，并能阻遏该连接蛋白 26 形成的半通道的单链抗体及表达该抗体的质粒载体，以及所述单链抗体在制备用于治疗连接蛋白 26 突变引起的耳聋、皮肤和肿瘤的药物和诊断试剂盒中的应用，本发明还提供利用该抗体制备诊断试剂盒，其包含所述单克隆抗体作为活性成分。

## 背景技术

离子通道间隙连接是一种细胞与细胞之间的连接。它连接细胞的胞质，允许小于 1.8KD 的较小分子如离子、代谢产物和第二信使等自由通过<sup>[1,2]</sup>。在脊椎动物，由连接蛋白 (Connexin) 组成的间隙连接通道介导相邻细胞之间离子、小分子营养物质交换及信号分子传播。哺乳动物发育早期已有多种连接蛋白表达，不同连接蛋白组成的间隙连接通道具有不同通透特征，相邻细胞利用间隙连接介导的细胞间通讯或者不依赖间隙连接通道的途径传递发育信号，调节发育过程中的细胞增殖、迁移和分化。连接蛋白是一个广泛表达于脊椎动物细胞的蛋白质家族。该家族成员组成的六聚体定位于细胞膜上，形成间隙连接通道或半通道，介导细胞之间、细胞与细胞外基质之间的物质交换。基因组中编码连接蛋白蛋白家族的基因组成连接蛋白基因家族<sup>[3]</sup>。

目前为止在人类基因组中已发现 21 种连接蛋白基因，小鼠基因组中发现 20 种连接蛋白基因<sup>[3]</sup>，由间隙连接通道和连接蛋白半通道介导的细胞间通讯对许多细胞功能具有重要的作用，包括调节细胞生长，分化和发育<sup>[4-6]</sup>。连接蛋白基因的突变与许多人类疾病相关联，包括心血管异常，周围神经病变，白内障和耳聋。连接蛋白 26 (Cx26)、连接蛋白 30 (Cx30) 参与内耳钾离子循环，并且 Cx26 和 Cx30 的缺失引起正在发育中的耳蜗中柯蒂氏器极重度耳聋并伴随细胞死亡<sup>[4,7,8]</sup>。Cx26 和 Cx30 由两个相邻基因 (GJB2 和 GJB6) 表达，Cx26、Cx30 在内耳与非感应细胞连接形成多胞体，两种蛋白在内耳共表达<sup>[9]</sup>。DNFB1 位于染色体 13q11 - q12<sup>[10]</sup>。50% 的习语前失聪都与 DNFB1 有关，地中海人甚至高达 79%<sup>[10,11]</sup>。Cx26 和 Cx30 的缺失突变对耳蜗螺旋器的器官形成产生深远影响<sup>[12-14]</sup>。连接蛋白的点突变会导致连接蛋白形成的半通道一直处于常开或者常闭状态，

导致失聪和皮肤疾病的发生<sup>[15]</sup>。特异识别 Cx26 并恢复其功能的抗体有望恢复连接蛋白突变导致的失聪和皮肤疾病。

近年来单克隆抗体在疾病的诊断和治疗中发挥重要作用,特别是针对表达特异性抗原的疾病,单克隆抗体与抗原的反应检测可以作为疾病诊断的"金"标准,单克隆抗体作为药物也在自身免疫性疾病和抗肿瘤疾病中发挥重要的作用。

与其他常见疾病不同的是,连接蛋白突变导致的疾病由于发病率相对较低,治疗药物相对较少,另外在耳聋疾病中,由于抗体药物的给药方式存在困难,一直没有针对该靶点的抗体药物上市。用于临床诊断的试剂盒也没有,所以能够识别、结合连接蛋白的单链抗体将成为诊治结直肠癌的重要工具。

#### 参考文献:

1. D.A. Goodenough, D.L. Paul, Gap junctions, *Cold Spring Harb Perspect Biol* 1 (2009) a002576.
2. A.L. Harris, Connexin channel permeability to cytoplasmic molecules, *Prog Biophys Mol Biol* 94 (2007) 120-143.
3. G. Sohl, K. Willecke, Gap junctions and the connexin protein family, *Cardiovasc Res* 62 (2004) 228-232.
4. C.J. Wei, X. Xu, C.W. Lo, Connexins and cell signaling in development and disease, *Annu Rev Cell Dev Biol* 20 (2004) 811-838.
5. A.B. Belousov, J.D. Fontes, Neuronal gap junctions: making and breaking connections during development and injury, *Trends in Neurosciences* 36 (2013) 227-236.
6. I. Fasciani, A. Temperan, L.F. Perez-Atencio, A. Escudero, P. Martinez-Montero, J. Molano, J.M. Gomez-Hernandez, C.L. Paino, D. Gonzalez-Nieto, L.C. Barrio, Regulation of connexin hemichannel activity by membrane potential and the extracellular calcium in health and disease, *Neuropharmacology* (2013).
7. D.W. Laird, Life cycle of connexins in health and disease, *Biochem J* 394 (2006) 527-543.
8. R. Dobrowolski, K. Willecke, Connexin-caused genetic diseases and corresponding mouse models, *Antioxid Redox Signal* 11 (2009) 283-295.
9. F. Ceriani, F. Mammano, A rapid and sensitive assay of intercellular coupling by voltage imaging of gap junction networks, *Cell Commun Signal* 11 (2013) 78.
10. F.J. del Castillo, I. del Castillo, The DFNB1 subtype of autosomal recessive non-syndromic hearing impairment, *Front Biosci* 16 (2011) 3252-3274.

11. L. Zelante, P. Gasparini, X. Estivill, S. Melchionda, L. D'Agruma, N. Govea, M. Mila, M.D. Monica, J. Lutfi, M. Shohat, E. Mansfield, K. Delgrosso, E. Rappaport, S. Surrey, P. Fortina, Connexin26 mutations associated with the most common form of non-syndromic neurosensory autosomal recessive deafness (DFNB1) in Mediterraneans, *Hum Mol Genet* 6 (1997) 1605-1609.
12. M. Cohen-Salmon, F.J. del Castillo, C. Petit, Connexins Responsible for Hereditary Deafness - The Tale Unfolds, in: E. Winterhager (Ed.), *Gap Junctions in Development and Disease*, Springer-Verlag, Berlin, 2005, pp. 111-134.
13. M. Leibovici, S. Safieddine, C. Petit, Mouse models for human hereditary deafness, *Curr Top Dev Biol* 84 (2008) 385-429.
14. R. Dobrowolski, K. Willecke, Connexin-Caused Genetic Diseases and Corresponding Mouse Models, *Antioxidants & Redox Signaling* 11 (2009) 283-295.
15. F.J. del Castillo, I. del Castillo, The DFNB1 subtype of autosomal recessive non-syndromic hearing impairment, *Frontiers in Bioscience-Landmark* 16 (2011) 3252-3274.

### 发明内容

本发明的目的是提供一种单链抗体，所述单链抗体可与人源连接蛋白 26 抗原特异性结合，从而可以用于制备治疗连接蛋白 26 突变导致的疾病药物或连接蛋白 26 相关诊断试剂盒。

为了达到上述目的，本发明提供了一种特异性抑制连接蛋白 26 的全人抗体，其特征在于，其为重组免疫球蛋白，结构为 scFv-Fc，scFv 指的是单链抗体，包括重链可变区和轻链可变区，其重链可变区的氨基酸序列为 SEQ ID NO: 1，其轻链可变区的氨基酸序列为 SEQ ID NO: 2，Fc 指的是恒定区。

优选地，所述的恒定区包括 CH2 恒定区和 CH3 恒定区。

优选地，所述的特异性抑制连接蛋白 26 的全人抗体特异识别连接蛋白 26 的胞外区第 41-75 氨基酸部分。

本发明还提供了一种基因工程抗体，其特征在于，其与上述的特异性抑制连接蛋白 26 的全人抗体的单链抗体具有 30% 以上的同源序列。

优选地，所述的基因工程抗体包含 Fab 片段，F(ab)' 片段，Fd 片段，Fv 片段和 Fc 片段中的一种，上述各片段中两种以上的组合，或上述各片段中的至少一种与其它蛋白或肽链形成的衍生物。

优选地，所述的基因工程抗体的重链 CDR 3 区序列为 DFSWRGYMDV，轻链 CDR3 区序

列为 QQYGSSPRT。

本发明还提供了一种编码特异性抑制连接蛋白 26 的全人抗体的核酸序列，其序列为 SEQ ID NO: 3 或 SEQ ID NO: 4。

优选地，所述的核苷酸序列编码上述的特异性抑制连接蛋白 26 的全人抗体。

本发明还提供了上述的特异性抑制连接蛋白 26 的全人抗体或基因工程抗体在制备用于治疗与连接蛋白 26 突变导致的耳聋、皮肤病或者肿瘤的药物或试剂盒中的应用。

本发明还提供了一种用于治疗耳聋、皮肤病或者肿瘤的药物，其包含上述的特异性抑制连接蛋白 26 的全人抗体或基因工程抗体作为活性成份。

本发明的特异性抑制连接蛋白 26 的全人抗体命名为 Anti-Cx26-scFvII-Fc，经过检测单链抗体对连接蛋白选择性结合，并可特异性抑制该连接蛋白形成的半离子通道，是经过多轮噬菌体库筛选获得。与目前临床应用常见 IgG 类抗体不同，Anti-Cx26-scFvII-Fc 为重组单链抗体，因此具有不同于 IgG 的抗体结构、生化特性和生物学功能。我们的实验证明，Anti-Cx26-scFvII-Fc 单链抗体分子量大约 100Kd，识别、结合靶抗原表位为连接蛋白胞外区结构，特异识别过表达连接蛋白 26 的细胞系，且抗体与连接蛋白 26 在细胞表面共定位。功能实验显示 Anti-Cx26-scFvII-Fc 能够抑制连接蛋白 26 半离子通道的活性。单独使用该抗体的免疫组化染色即可较为准确地诊断各种组织中的人源连接蛋白 26 的表达情况。综上 Anti-Cx26-scFvII-Fc 单链抗体在耳聋、皮肤病和肿瘤的治疗方面和连接蛋白 26 诊断试剂方面有潜在的应用价值。

本发明用人连接蛋白 26 胞外区第 41-56 氨基酸序列为抗原，序列为 KEVWGDEQADFVCNTL。通过单链抗体噬菌体展示库及筛选技术获得，通过对该抗体的生化分析和免疫荧光鉴定，确定本发明提供的抗体能特异性识别连接蛋白 26，并抑制其形成的半通道活性。动物试验表明，该抗体对鼠耳蜗组织切片的半通道活性有显著抑制作用。因此，该抗体可用于连接蛋白突变相关疾病治疗。

## 附图说明

图 1. 单链抗体的筛选和序列验证。

- A. 抗体富集后抗体库酶联免疫反应检测抗原结合活性
- B. 挑取抗体单克隆与抗原结合酶联免疫反应检测

图 2. 单链抗体的结构及生化活性鉴定。

- A. scFv -Fc 型免疫球蛋白结构示意图。

B. Western blot 检测单链抗体分子量大小约为 58KDa

C. scFv II-Fc 抗体热稳定性检测

D.质谱分析双链结构 Anti-Cx26-scFv II-Fc 分子量大小为 105140.3

图 3. Anti-Cx26-scFv II-Fc 抗体与抗原亲和力检测。

A. 酶联免疫反应鉴定抗体 scFv II -Fc 与抗原亲和力

B. SRP 法检测抗体与 Cx26 蛋白相互作用，结果显示 Anti-Cx26-scFv II-Fc 抗体与 Cx26 的结果活性 KD 为  $7.3E10-8M$

图 4. 免疫荧光检测 Anti-Cx26-scFv II-Fc 抗体与 Cx26-GFP 蛋白，结果显示两个蛋白共定位。

图 5. 去极化激活 Cx26 离子通道后，利用膜片钳技术检测 Anti-Cx26-scFv II-Fc 抗体阻碍 Cx26 离子半通道的活性。

### 具体实施方式

下面结合具体实施例，进一步阐述本发明。应理解，这些实施例仅用于说明本发明而不用限制本发明的范围。此外应理解，在阅读了本发明讲授的内容之后，本领域技术人员可以对本发明作各种改动或修改，这些等价形式同样落于本申请所附权利要求书所限定的范围。

#### 实施例 1、单链抗体的筛选和单链抗体的表达纯化

##### 1、所用材料：

(1) 生物素化抗原多肽，(序列为：KEVWGDEQADFVCNTL，序列表 SEQ ID NO: 5，下称抗原)，合成自金斯瑞公司。(2) 全人单链抗体噬菌体展示库，实验室自有。(3) 链霉亲和素化的磁珠购自赛默飞公司。(4) 高吸附酶联免疫反应微孔板购自康宁公司。(5) Anti-M13 HRP 抗体购自赛默飞公司。(6) 辅助噬菌体购自 Life Technologies，货号 18311019。(7) XL1-Blue 细菌购自 Agilent Technologies，货号 200228。(8) 显影液 ABTS 溶液购自赛默飞公司，货号 002024。

##### 2、实验方法：

表达全人单链抗体的噬菌体展示库 200 微升 (含有噬菌体粒  $1 \times 10^{11}$  个) 与 5 微克抗原混合后室温孵育 30 分钟，再加入 50 微升的链霉亲和素化的磁珠。与抗原结合的噬菌体被链霉亲和素化的磁珠捕获，未结合的噬菌体经 PBST 漂洗后去除，用盐酸甘氨酸 (pH 2.2) 溶液将与磁珠稳定结合的噬菌体洗脱待用。接种 XL1-Blue 细菌 (Agilent Technologies，货号 200228) 200 毫升，待 OD 达到 0.6 后，加入上述洗脱的噬菌体与 XL1-Blue 细菌 37°C 静置 30 分钟，后在 30 摄氏度条件下过夜扩增，离心收集细菌后，加入 30 微升辅助噬菌体 (含有辅助噬菌体粒  $1 \times 10^{11}$  个) 扩增后

进行下一轮淘选。重复上述筛选步骤 3-4 轮，将感染噬菌体的 XL1-Blue 菌液经过充分稀释后涂 10cm 平板，每个板上有 100-500 个克隆，挑取单克隆，通过噬菌体酶联免疫反应对淘选后的各轮噬菌体库进行验证。

噬菌体酶联免疫反应步骤为，将感染噬菌体的 XL1-Blue 单克隆菌接种进 200 微升的 96 孔板中，200rpm 37°C 摇 4-6 小时，检测 OD 接近 0.6 后，加入 1 微升的辅助噬菌体，继续 30°C 摇过夜。第二天 3000g 离心取上清待用。取 96 低透平底微孔板，包被抗原过夜，第二天加入上一步制备好的噬菌体上清，室温孵育 2 小时，再加入 Anti-M13 HRP 抗体孵育 30 分钟，后用 PBST 洗 3 次，加入 50 微升显影液 ABTS。

由抗原的酶联免疫反应结果可以看出随着淘选的进行，酶联免疫反应的信号不断升高，而对照抗原（AcroBiosystems 公司，货号 CD0-H82F2）的信号仍然比较低，在第四轮淘选后，抗原的信号强度是对照抗原的多倍，说明经过 4 轮淘选，能够表达与抗原特异性结合抗体的噬菌体不断的被富集。从淘选后的第三、四轮库中挑取单克隆，最后确定酶联免疫反应读值是对照两倍以上克隆作为阳性克隆，阳性克隆测序分析，经过比对分析，确定不同的抗体序列和富集情况。

### 3、实验结果：

如图 1A 所示，多肽抗原 CB 在全人抗体噬菌体展示库中进行筛选，经过 4 轮淘选后，酶联免疫反应的信号与对照组相比不断升高，从淘选后的库中挑取 700 个单克隆进行酶联免疫反应验证，最后确定酶联免疫反应读值是对照两倍以上克隆作为阳性克隆，如图 1B 所示，150 个阳性克隆测序分析，经过比对分析，重复次数越多，说明该抗体序列的亲和力越强，依此确定有效富集序列。本发明中所选的阳性克隆在 150 个克隆序列中重复 84 次，说明亲和力较强。

挑取的克隆经测序，所选的阳性克隆的核酸序列为 SEQ ID NO: 3。

### 实施例 2、单链抗体纯化和生化特性检测

#### 1、所用材料：

(1) Sypro Orange 染料购自赛默飞公司。(2) pFUSE 表达载体 pFUSE-hIgG1-FC2 购自 Invivogen 公司，货号 pfuse-hg1fc2。(3) HiTrapProtein A HP columns 购自 GE 公司。(4) ÄKTApurifier100 蛋白纯化仪购自 GE 公司。(5) 实时定量 PCR 仪购自 BioRad 公司。(6) 质粒抽提试剂盒购自 Qiagen 公司。(7) BCA 蛋白定量试剂盒 (Pierce™ BCA Protein Assay kit, Pierce #23253)。(8) BamHI 和 BglIII 限制性内切酶购自 NEB 公司。

#### 2、实验方法：

将实施例 1 得到的阳性序列（即 SEQ ID NO: 3）由全基因合成（南京金斯瑞生物公司）并在序列两端加入 BamH1 和 BglII 酶切位点，将得到的核酸序列经过参照 NEB 说明书在 BamH1 和 BglII 酶切后插入 pFUSE-hIgG1-FC2 表达载体（Invivogen 公司，操作步骤请参照说明书），将获得具有 Fc 段的单链抗体 Anti-Cx26-scFv II -Fc 的真核抗体表达质粒。利用 293Fectin 转染试剂（Invitrogen 公司，货号 12347500）与上述获得的真核抗体表达载体质粒按照体积质量比 30 微升：15 微克的比例混合后加入 30 毫升的 293Freestyle 悬浮细胞（购自赛默飞公司）后，37℃ 1200rpm 摇过夜，离心后收集上清，采用 HiTrap Protein A HP columns 在 ÄKTApurifier100 蛋白纯化仪上进行抗体蛋白纯化（Anti-Cx26-scFv II -Fc），最后用 BCA 法蛋白定量试剂盒（Pierce，货号 23252）参照说明书检测抗体浓度。

将所得的纯化抗体进行 Western blot 检测，具体为：将 5 微克纯化抗体样品进行 SDS-PAGE 电泳，电泳电压 110V，60 分钟，后转印到醋酸纤维素膜上，用羊抗人辣根过氧化物酶二抗(购自赛默飞)杂交，洗膜加入显影液（Pierce 公司，货号 35055）成像。

将所得的纯化抗体进行热稳定性检测，具体为：将纯化抗体稀释至 0.1 毫克/毫升，按照体积比 1:2000 加入 Sypro Orange 染料后密封，实时定量 PCR 仪（BioRad）设置程序温度由 25℃升至 90℃，0.5℃每分钟。同时检测荧光值。

将所得的纯化抗体进行 LC-MS 质谱分析，具体为：将纯化的抗体 5 微克与 1 微升蛋白质脱糖酶（购自 NEB 公司，货号 P0709S）混合 37℃一小时后，上样到高分辨质谱用仪器 Agilent 6230 TOF LC/MS 检测。

### 3、实验结果：

将实施例 1 得到的抗体的核酸序列（SEQ ID NO: 3）经过酶切插入 pFUSE-hIgG1-FC2 表达载体，得到含有 Fc 段的 scFv II DNA 序列（SEQ ID NO: 4），其能够编码特异性抑制连接蛋白 26 的全人单链抗体（Anti-Cx26-scFv II -Fc，序列为 Seq ID NO6），即所述的特异性抑制连接蛋白 26 的全人抗体为重组免疫球蛋白，结构为 scFv-Fc，如图 2A 所示，scFv 指的是单链抗体，包括重链可变区和轻链可变区，其重链可变区的氨基酸序列为 SEQ ID NO: 1，其轻链可变区的氨基酸序列为 SEQ ID NO: 2，其重链 CDR 3 区序列为 DFSWRGYYMDV，轻链 CDR3 区序列为 QQYGSSPRT，Fc 指的是恒定区，所述的恒定区包括 CH2 恒定区和 CH3 恒定区。所述的特异性抑制连接蛋白 26 的全人抗体特异识别连接蛋白 26 的胞外区第 41-75 氨基酸部分。

Western blot 实验结果如图 2B 所示，胶图在 58Kd 处出现明显条带，说明抗体能特异识别 Cx26

蛋白。热稳定性结果计算出该抗体的  $T_m$  值为  $65^{\circ}\text{C}$ ，如图 2 C 所示，说明 Anti-Cx26-scFv II-Fc 抗体具有高稳定性。如图 2D 所示，LC-MS 质谱分析结果显示该抗体蛋白的分子量为 105140 道尔顿。

### 实施例 3、酶联免疫反应检测单链抗体与连接蛋白 26 的结合

#### 1、所用材料：

1. CBS 抗原固定溶液购自赛默飞公司。2. Anti-Human Fc HRP 二抗购自赛默飞公司。3. 显影底物 ABST 溶液购自赛默飞公司。4. 检测用 96 孔底透板购自 Corning 公司。

#### 2、实验方法：

96 孔底透板每孔加入 50 微升 CBS 抗原固定溶液稀释的 Cx26 抗原多肽（金斯瑞公司合成，序列请见 Seq ID NO5），抗原每孔 0.05 微克， $4^{\circ}\text{C}$  过夜孵育，室温震荡孵育 30 分钟，PBS 漂洗三次，含 5% 牛奶的 PBST 溶液， $37^{\circ}\text{C}$  条件下封闭 60 分钟。PBS 漂洗三次，加入实施例 2 所得的 Anti-Cx26-scFv II-Fc 抗体， $37^{\circ}\text{C}$  条件下孵育 60 分钟。漂洗干燥后，加入 Anti-Human Fc 二抗，室温震荡孵育 30 分钟，PBS 漂洗三次，最后加底物显色，酶标仪读值。

#### 3、实验结果：

如图 3A 所示，阴性对照孔酶联免疫反应读值 OD 值均在 0.2 以下，而阳性孔 OD 值在 0.4 以上。根据结果获得 150 个阳性克隆孔。

### 实施例 4、SRP 法检测单链抗体与连接蛋白 26 的结合

#### 1、所用材料：

1. Octet RED 仪器及其检测芯片 CM5 芯片购自 Pall 公司。2. Anti-human IgG 抗体购自赛默飞公司。

#### 2、实验方法：

通过多循环动力学的方法检测抗体与抗原亲和力与动力学。抗体固定采用捕获法进行，先将 Anti-human IgG 抗体偶联在 CM5 芯片上，然后将待测的 Anti-Cx26-scFv II-Fc 抗体样品稀释梯度后流过芯片表面，待测抗体就会被已经偶联的抗人 Fc 抗体所捕获。随后再注入抗原多肽（由南京金斯瑞公司合成，序列为 Seq ID NO: 5），抗原与抗体结合后信号被检测并记录。最后用再生试剂（pH1.7 的甘氨酸溶液）将 CM5 芯片表面的抗体和抗原样品全部洗脱，并进行新一轮检测。

### 3、实验结果:

如图 3B 所示, SRP 法检测抗体与 Cx26 蛋白相互作用, 显示 Anti-Cx26-scFv II-Fc 抗体与 Cx26 的结果活性 KD 为  $7.3E10-8M$ 。

## 实施例 5、细胞免疫荧光检测抗体特异识别 Cx26 蛋白

### 1、所用材料:

(1) HeLa DH 细胞购自西格玛公司。(2) Cx26-Venus-YFP 报告基因质粒购买自 Addgene 公司, 货号 69016。(3) 荧光二抗 Alexa Fluor 594 goat anti-human 购自赛默飞公司。(4) 荧光共聚焦显微镜购自徕卡公司。

### 2、实验方法:

HeLa DH 细胞用 293Fectin (赛默飞) 参照说明书步骤转染质粒 Cx26-Venus-YFP, 该质粒可在细胞膜上表达人源 Cx26 蛋白且伴随绿色荧光, 用 2% 甲醛固定细胞, 室温条件下放置 10 分钟。漂洗后, 加入含 2% BSA 的 PBS 溶液封闭细胞 30 分钟, 1 毫克/毫升 Anti-Cx26-scFvII-Fc 抗体溶液用 1% BSA/PBS 以稀释比 1:500 稀释后孵育细胞 4~5 小时, 漂洗后, 加入荧光 Alexa Fluor 594 goat anti-human 二抗在溶液 1% BSA/PBS 中以 1:1000 浓度稀释, 室温条件下孵育 60 分钟后, 加入 DAPI (1 微克/毫升) 孵育 5 分钟, 漂洗后, 封片, 激光共聚焦显微镜观察及拍照。

### 3、实验结果:

如图 4 所示, Anti-Cx26-scFv II-Fc 抗体与 Cx26-GFP 两个蛋白共定位。

## 实施例 6、膜片钳技术检测抗体抑制 Cx26 半通道活性

### 1、所用材料:

(1) HeLa DH 细胞购自西格玛公司。(2) Cx26-Venus-YFP 报告基因质粒购买自 Addgene 公司, 货号 69016。(3) 全自动膜片钳系统购自美国 MDC 公司。

### 2、实验方法:

HeLa DH 细胞用 293Fectin (赛默飞) 参照说明书步骤转染质粒 Cx26-Venus-YFP, 膜片钳采用全细胞式记录单个细胞膜离子电流, 细胞处理上清中加入 940nM 的 Anti-Cx26-scFv II-Fc 抗体, 对照组  $Zn^{2+}$  浓度 100uM, 不加抗体作为空白对照组, 加大电压至 40 毫伏使细胞去极化导致 Cx26 半通道开放, 记录加入抗体的实验组, 阳性对照组和空白对照组的半通道电流, 降低电压至负 40

毫伏使细胞处于超极化状态，并同时记录各组的半通道电流。

3、实验结果：如图 5 所示，抗体 Anti-Cx26-scFv II-Fc 可有效抑制 Cx26 半通道活性，是非特异抑制剂  $Zn^{2+}$  的一百倍。

序列表:

<110>序列表

<120>一种特异性抑制连接蛋白 26(Connexin26)的全人抗体

<160> 4

<170>PatentIn version3. 1

<210> 1

<211> 109

<212> PRT

<213>人源抗体氨基酸序列重链

<400>1

ProGlyArgSerLeuArgLeuSerCysAlaAlaSerGlyPheThrPhe

1 5 10 15

SerSerTyrAlaMetHisTrpValArgGlnAlaProGlyLysGlyLeu

20 25 30

GluTrpValAlaValIleSerHisGlyGlySerAsnLysTyrTyrAla

35 40 45

AspSerValLysGlyArgPheThrIleSerArgAspAsnSerLysAsn

50 55 60

ThrLeuTyrLeuGlnMetAsnSerLeuArgAlaGluAspThrAlaVal

65 70 75 80

TyrTyrCysAlaArgAspPheSerTrpArgGlyTyrTyrMetAspVal

85 90 95

TrpGlyLysGlyThrLeuValThrValSerSerGlySer

100 105 109

<210> 2

<211> 108

<212> PRT

<213>人源抗体氨基酸序列轻链

<400>2

GluThrThrLeuThrGlnSerProAlaThrLeuSerLeuSerProGly

1 5 10 15

GluArgAlaThrLeuSerCysArgAlaSerGlnSerIleSerSerTyr  
 20 25 30  
 LeuAlaTrpTyrGlnGlnLysProGlyGlnAlaProArgLeuLeuIle  
 35 40 45  
 TyrGlyAlaSerThrArgAlaThrGlyIleProAspArgPheSerGly  
 50 55 60  
 SerGlySerGlyThrAspPheThrLeuThrIleSerArgLeuGluPro  
 65 70 75 80  
 GluAspPheAlaValTyrTyrCysGlnGlnTyrGlySerSerProArg  
 85 90 95  
 ThrPheGlyGlyGlyThrLysValGluIleLysArg  
 100 105 109

SequenceName : SEQ ID NO: 3

-----

<211>Length : 732

<212>Type : DNA

<213>OrganismName : 人工序列

<400>3

caggtacagc tgcagcagtc aggggggggc gtggtccagc ctgggaggtc cctgagactc 60  
 tcctgtgcag cctctggatt caccttcagt agctatgeta tgcactgggt cgccaggct 120  
 ccaggaagg ggetggagtg ggtggcagtt atatcacatg gtggaagtaa taaatactac 180  
 gcagactccg tgaagggccg attcaccatc tccagagaca attccaagaa cacgctgtat 240  
 ctgcaaatga acagcctgag agctgaggac acggetgtgt attactgtgc gagagatfff 300  
 agttggagag ggtactacat ggacgtctgg ggcaaaggea cctgggtcac cgtctectca 360  
 ggcagcggcg gtggcggatc cgaaacgaca ctcacgcagt ctccagccac cctgtctttg 420  
 tctccagggg aaagagccac cctctctgag agggccagtc agagtattag cagctactta 480  
 gcctggtaac agcagaaacc tggccaggct cccaggctcc tcactatgg tgcateccac 540  
 agggccactg gcatccaga caggttcagt ggcagtggtg ctgggacaga cttactctc 600  
 accatcagca gactggagcc tgaagatfff gcagtgtatt actgtcagca gtatggtagc 660  
 tcacctgaa ctttcggcgg agggaccaag gtggaaatca aacgtggcct cgggggccc 720

atcgccatggt

732

SequenceName : SEQ ID NO: 4

<211>Length : 1422

<212>Type : DNA

<213>OrganismName :人工序列

<400> 4

atggcacagg tacagctgca gcagtcaggg gggggcgtgg tccagcctgg gaggtccctg	60
agactctct gtgcagctc tggattcacc ttcagtagct atgctatgca ctgggtccgc	120
caggetccag gcaaggggct ggagtggtg gcagttatat cacatggtgg aagtaataaa	180
tactacgcag actccgtgaa gggccgattc accatctcca gagacaattc caagaacacg	240
ctgtatctgc aatgaacag cctgagagct gaggacacgg ctgtgtatta ctgtgcgaga	300
gattttagtt ggagagggta ctacatggac gtctggggca aaggcacctt ggtcacctc	360
tcctcaggca gcgccggtgg cggatccgaa acgacactca cgagctctcc agccaccctg	420
tctttgtctc caggggaaag agccaccctc tctgcaggg ccagtcagag tattagcagc	480
tacttagcct ggtaccagca gaaacctggc caggetccca ggctctctat ctatggtgca	540
tccaccaggg cactggcat cccagacagg ttcagtggca gtgggtctgg gacagacttc	600
actctacca tcagcagact ggagctgaa gattttgcag tgtattactg tcagcagtat	660
ggtagctcac ctgaaacttt cggcggaggg accaaggtgg aatcaaacg tgccctcggg	720
ggcccatgg ttagatctga caaaactcac acatgcccac cgtgcccagc acctgaactc	780
ctggggggac cgtcagtctt cctctccc ccaaaaacca aggacacct catgatctcc	840
cggaccctg aggtcacatg cgtggtggtg gacgtgagcc acgaagacc tgaggtaag	900
ttcaactggt acgtggacgg cgtggaggtg cataatgcca agacaaagcc gcgggaggag	960
cagtacaaca gcacgtaccg tgtggtcage gtcctaccg tctgcacca ggactggetg	1020
aatggcaagg agtacaagtg caaggtctcc aacaaagccc tccagcccc catcgagaaa	1080
accatctcca aagccaaagg gcagccccga gaaccacagg tgtacacct gcccctatcc	1140
cgggaggaga tgaccaagaa ccaggtcage ctgacctgcc tggtaaaagg cttctatccc	1200
agcgacatcg ccgtggagtg ggagagcaat gggcagccgg agaacaacta caagaccacg	1260
ctcccctgc tggactccga cggctcttc ttctctaca gcaagctcac cgtggacaag	1320
agcaggtggc agcaggggaa cgtcttctca tgctccgtga tgcacgagge tetgcacaac	1380

cactacacgc agaagagcct ctcctgtct ceggtaaata ga

1422

SequenceName : Seq ID NO: 5

<212> Type : PRT

<211> Length : 16

<213> OrganismName : 合成多肽

<400> 5

KEVWGDEQADFVCNTL 16

SequenceName : Seq ID NO: 6

<213> OrganismName : 人工序列

<212> Type : PRT

<211> Length: 473

<400> 6

MAQVQLQQSG GGVVQPGRSL RLSAASGFT FSSYAMHWVR QAPGKGLEWV  
AVISHGGSNK 60

YYADSVKGRF TISRDNKNT LYLQMNSLRA EDTAVYYCAR DFSWRGYYMD  
VWGKGTLLTV 120

SSGSGGGGSE TLLTQSPATL SLSPGERATL SCRASQSISS YLAWYQQKPG QAPRLLIYGA  
180

STRATGIPDR FSGSGSGTDF TLTISRLEPE DFAVYYCQY GSSPRTFGGG TKVEIKRGLG  
240

GPMVRSRKTH TCPPCPAPEL LGGPSVFLFP PKPKDTLMIS RTPEVTCVVV  
DVSHEDPEVK 300

FNWYVDGVEV HNAKTKPREE QYNSTYRVVS VLTVLHQDWL NGKEYKCKVS  
NKALPAPIEK 360

TISKAKGQPR EPQVYTLPPS REEMTKNQVS LTCLVKGFYP SDIAVEWESN  
GQPENNYKTT 420

PPVLDSDGSF FLYSKLTVDK SRWQQGNVFS CSVMHEALHN HYTQKSLSLG PGK  
473

**权利要求：**

1、一种特异性抑制连接蛋白 26 的全人抗体，其特征在于，其为重组免疫球蛋白，结构为 scFv-Fc，scFv 指的是单链抗体，包括重链可变区和轻链可变区，其重链可变区的氨基酸序列为 SEQ ID NO: 1，其轻链可变区的氨基酸序列为 SEQ ID NO: 2，Fc 指的是恒定区。

2、如权利要求 1 所述的特异性抑制连接蛋白 26 的全人抗体，其特征在于，所述的恒定区包括 CH2 恒定区和 CH3 恒定区。

3、如权利要求 1 所述的特异性抑制连接蛋白 26 的全人抗体，其特征在于，所述的特异性抑制连接蛋白 26 的全人抗体特异识别连接蛋白 26 的胞外区第 41-75 氨基酸部分。

4、一种基因工程抗体，其特征在于，其与权利要求 1-3 中任一项所述的特异性抑制连接蛋白 26 的全人抗体的单链抗体具有 30% 以上的同源序列。

5、如权利要求 4 所述的基因工程抗体，其特征在于，所述的基因工程抗体包含 Fab 片段，F(ab)' 片段，Fd 片段，Fv 片段和 Fc 片段中的一种，上述各片段中两种以上的组合，或上述各片段中的至少一种与其它蛋白或肽链形成的衍生物。

6、如权利要求 4 所述的基因工程抗体，其特征在于，所述的基因工程抗体的重链 CDR 3 区序列为 DFSWRGYMDV，轻链 CDR3 区序列为 QQYGSSPRT。

7、一种编码特异性抑制连接蛋白 26 的全人抗体的核苷酸序列，其序列为 SEQ ID NO: 3 或 SEQ ID NO: 4。

8、权利要求 1-3 中任一项所述的特异性抑制连接蛋白 26 的全人抗体或权利要求 4-6 中任一项所述的基因工程抗体在制备用于治疗与连接蛋白 26 突变导致的耳聋、皮肤病或者肿瘤的药物或试剂盒中的应用。

9、一种用于治疗耳聋、皮肤病或者肿瘤的药物，其包含权利要求 1-3 中任一项所述的特异性抑制连接蛋白 26 的全人抗体或权利要求 4-6 中任一项所述的基因工程抗体作为活性成份。

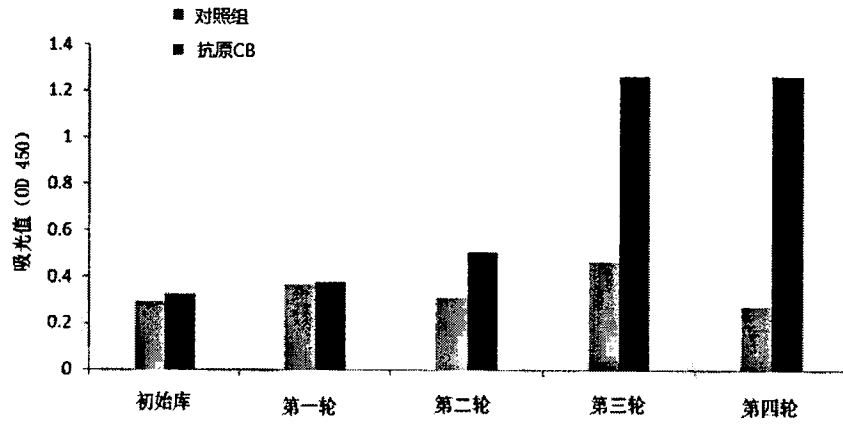


图 1A

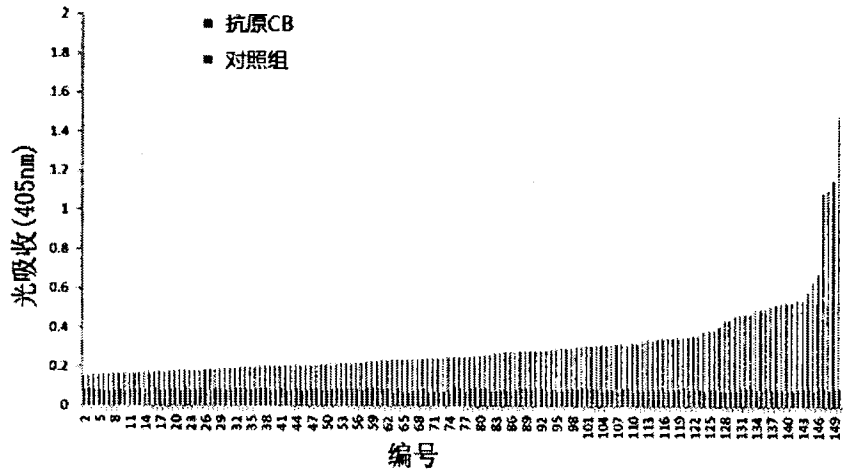


图 1B

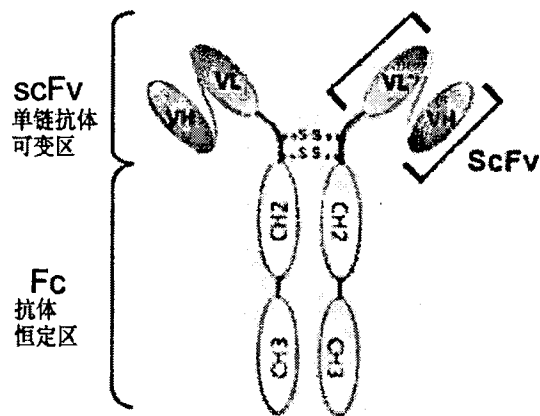


图 2A

替换页(细则第26条)

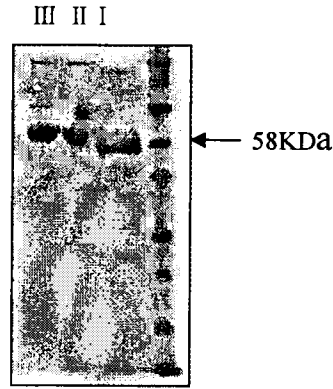


图 2B

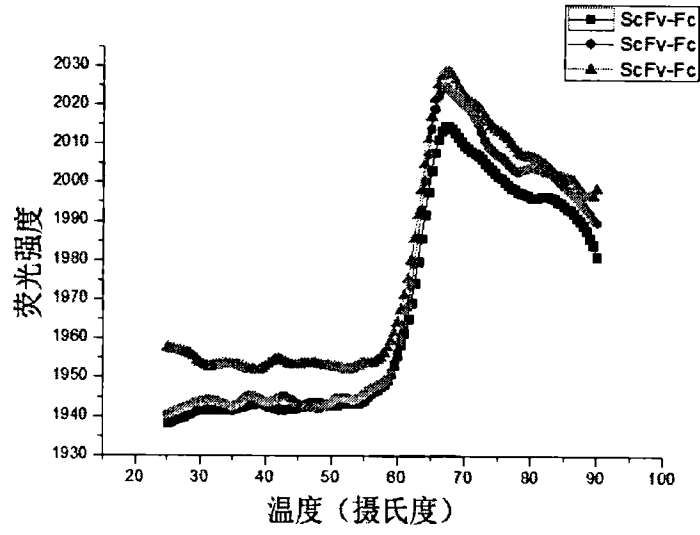


图 2C

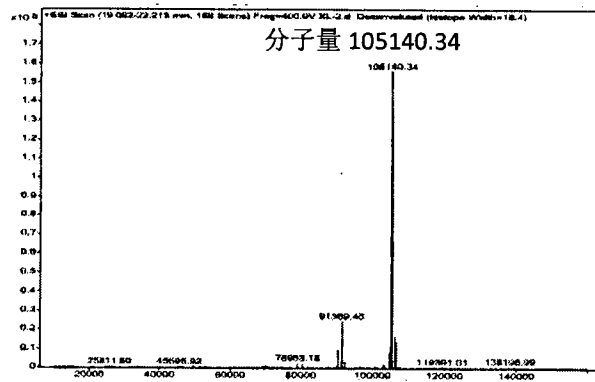


图 2D

替换页(细则第26条)

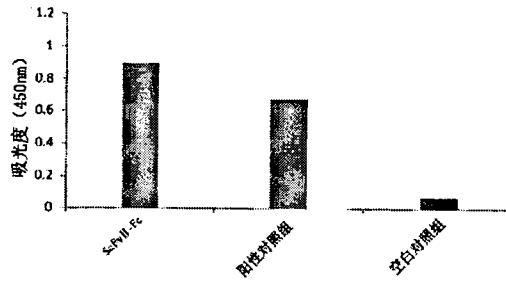


图 3A

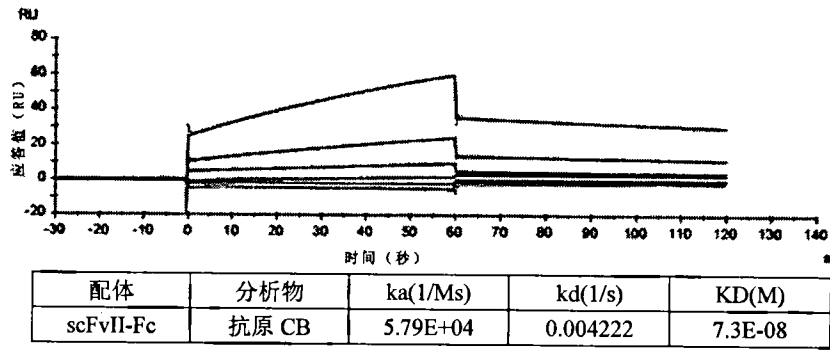


图 3B

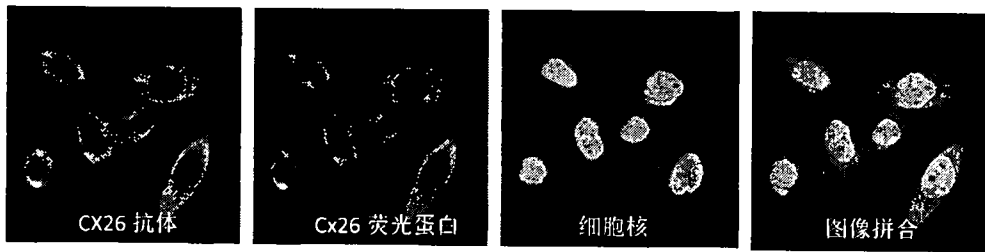


图 4

替换页(细则第26条)

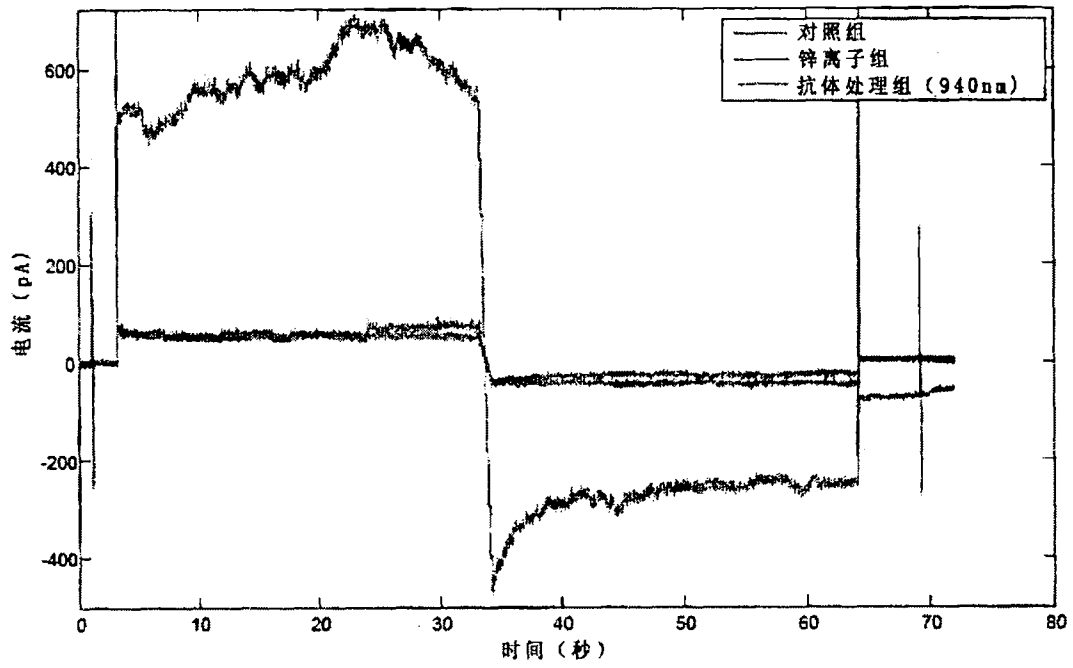


图 5

# INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

**PCT/CN2016/109847**

## A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

C07K 16/18 (2006.01) i; C12N 15/11 (2006.01) i; A61K 39/395 (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)

C07K; C12N; A61K

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)

WPI; EPODOC; USTXT; EPTXT; CNTXT; CNABS; WOTXT; CJFD; DWPI; CNKI; GOOGLE; PUBMED; GenBank ;EBI; ISI  
 WEB OF KNOWLEDGE: scfv, scFv-Fc, phage display library, single-chain antibody, connexin26, dnfb1, GJB2, fully human  
 single-chain antibody, cx26, extracellular, extracellular region, 41-56, intracellular region, connexin,  
 KEVWGDEQADFCVNTL, DFNB1, DFNA3, CXN-26, gap junction protein, beta2,  $\beta$ 2, human single-chain antibody, cochlea,  
 deafness, skin, tumour, cancer, SEQ ID NOs:1-6

## C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
PX	CN 105566495 A (SHANGHAITECH UNIVERSITY), 11 May 2016 (11.05.2016), claims 1-9	1-9
X	"GenPept accession number: 2GHW_B", NCBI, 10 October 2012 (10.10.2012), amino acid sequence part	4, 5
A	CN 102105492 A (CODA THERAPEUTICS, INC.), 22 June 2011 (22.06.2011), description, paragraphs [0069] and [0375]	1-9
A	CN 102099475 A (CODA THERAPEUTICS, INC.), 15 June 2011 (15.06.2011), description, paragraphs [0065] and [0145]	1-9
A	WANG, Yafei et al., "Expression of connexin26 in mouse cochlea lateral wall after noise exposure", JOURNAL OF AUDIOLOGY AND SPEECH PATHOLOGY, vol. 21, no. 3, 11 March 2013 (11.03.2013), pages 263-266	1-9

Further documents are listed in the continuation of Box C.

See patent family annex.

<p>* Special categories of cited documents:</p> <p>"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance</p> <p>"E" earlier application or patent but published on or after the international filing date</p> <p>"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)</p> <p>"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means</p> <p>"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed</p>	<p>"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</p> <p>"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</p> <p>"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</p> <p>"&amp;" document member of the same patent family</p>
---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------	-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------

Date of the actual completion of the international search  
 26 February 2017 (26.02.2017)

Date of mailing of the international search report  
**07 March 2017 (07.03.2017)**

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  
**ZHANG, Yanqing**  
 Telephone No.: (86-10) **010-62413836**

# INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

**PCT/CN2016/109847**

## C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	CHOUNG, Y.H. et al. "Functional Study of GJB2 in Hereditary Hearing Loss", THE LARYNGOSCOPE, vol. 112, 30 September 2002 (30.09.2002), pages 1667-1671	1-9
A	THONNISSEN, E. et al. "Human connexin26 (GJB2) deafness mutations affect the function of gap junction channels at different levels of protein expression", HUM. GENET., vol. 111, 22 June 2002 (22.06.2002), pages 190-197	1-9

**INTERNATIONAL SEARCH REPORT**  
Information on patent family members

International application No.  
**PCT/CN2016/109847**

Patent Documents referred in the Report	Publication Date	Patent Family	Publication Date
CN 105566495 A	11 May 2016	None	
CN 102105492 A	22 June 2011	WO 2009075881 A3	30 July 2009
		WO 2009075881 A2	18 June 2009
		JP 2011506446 A	03 March 2011
		EP 2245061 A2	03 November 2010
		EP 2628747 A1	21 August 2013
		US 2011300130 A1	08 December 2011
		JP 2014231521 A	11 December 2014
		AU 2008335717 A1	18 June 2009
		CA 2709151 A1	18 June 2009
CN 102099475 A	15 June 2011	CA 2727015 A1	10 December 2009
		JP 2015166375 A	24 September 2015
		ZA 201100046 B	26 October 2011
		WO 2009148613 A1	10 December 2009
		AU 2016216611 A1	01 September 2016
		EP 2307546 A1	13 April 2011
		JP 2011524345 A	01 September 2011
		US 2011223204 A1	15 September 2011
		AU 2009255619 A1	10 December 2009

<p>A. 主题的分类</p> <p>C07K 16/18(2006.01)i; C12N 15/11(2006.01)i; A61K 39/395(2006.01)i</p> <p>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</p>																				
<p>B. 检索领域</p> <p>检索的最低限度文献(标明分类系统和分类号)</p> <p>C07K; C12N; A61K</p> <p>包含在检索领域中的除最低限度文献以外的检索文献</p> <p>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))</p> <p>WPI;EPODOC;USTXT;EPTXT;CNTXT;CNABS;WOTXT;CJFD;DWPI;CNKI;GOOGLE;PUBMED;GenBank;EBI;ISI WEB OF KNOWLEDGE: scfv, scFv-Fc, phage display library, 单链抗体, connexin26, dnf1, GJB2, 全人单链抗体, cx26, extracellular, 胞外区, 41-56, 胞内区, 连接蛋白, KEVWGDEQADFCNTL, DFN1, 噬菌体展示库, 连接蛋白26, 间隙连接蛋白, DFNA3, CXN-26, gap junction protein, beta2, <math>\beta</math>2, 人单链抗体, 耳蜗, 耳聋, 皮肤, 肿瘤, 癌, SEQ ID NOs: 1-6</p>																				
<p>C. 相关文件</p> <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>PX</td> <td>CN 105566495 A (上海科技大学) 2016年 5月 11日 (2016 - 05 - 11) 权利要求1-9</td> <td>1-9</td> </tr> <tr> <td>X</td> <td>"GenPept accession number: 2GHW_B" NCBI, 2012年 10月 10日 (2012 - 10 - 10), 氨基酸序列部分</td> <td>4、5</td> </tr> <tr> <td>A</td> <td>CN 102105492 A (科达治疗公司) 2011年 6月 22日 (2011 - 06 - 22) 说明书第69、375段</td> <td>1-9</td> </tr> <tr> <td>A</td> <td>CN 102099475 A (科达治疗公司) 2011年 6月 15日 (2011 - 06 - 15) 说明书第65、145段</td> <td>1-9</td> </tr> <tr> <td>A</td> <td>王亚菲等. "噪声对小鼠耳蜗外侧壁缝隙连接蛋白Connexin26表达的影响" 听力学及言语疾病杂志, 第21卷, 第3期, 2013年 3月 11日 (2013 - 03 - 11), 第263-266页</td> <td>1-9</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	PX	CN 105566495 A (上海科技大学) 2016年 5月 11日 (2016 - 05 - 11) 权利要求1-9	1-9	X	"GenPept accession number: 2GHW_B" NCBI, 2012年 10月 10日 (2012 - 10 - 10), 氨基酸序列部分	4、5	A	CN 102105492 A (科达治疗公司) 2011年 6月 22日 (2011 - 06 - 22) 说明书第69、375段	1-9	A	CN 102099475 A (科达治疗公司) 2011年 6月 15日 (2011 - 06 - 15) 说明书第65、145段	1-9	A	王亚菲等. "噪声对小鼠耳蜗外侧壁缝隙连接蛋白Connexin26表达的影响" 听力学及言语疾病杂志, 第21卷, 第3期, 2013年 3月 11日 (2013 - 03 - 11), 第263-266页	1-9
类型*	引用文件, 必要时, 指明相关段落	相关的权利要求																		
PX	CN 105566495 A (上海科技大学) 2016年 5月 11日 (2016 - 05 - 11) 权利要求1-9	1-9																		
X	"GenPept accession number: 2GHW_B" NCBI, 2012年 10月 10日 (2012 - 10 - 10), 氨基酸序列部分	4、5																		
A	CN 102105492 A (科达治疗公司) 2011年 6月 22日 (2011 - 06 - 22) 说明书第69、375段	1-9																		
A	CN 102099475 A (科达治疗公司) 2011年 6月 15日 (2011 - 06 - 15) 说明书第65、145段	1-9																		
A	王亚菲等. "噪声对小鼠耳蜗外侧壁缝隙连接蛋白Connexin26表达的影响" 听力学及言语疾病杂志, 第21卷, 第3期, 2013年 3月 11日 (2013 - 03 - 11), 第263-266页	1-9																		
<p><input checked="" type="checkbox"/> 其余文件在C栏的续页中列出。</p> <p><input checked="" type="checkbox"/> 见同族专利附件。</p> <p>* 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                      "&amp;" 同族专利的文件</p>																				
<p>国际检索实际完成的日期</p> <p>2017年 2月 26日</p>		<p>国际检索报告邮寄日期</p> <p>2017年 3月 7日</p>																		
<p>ISA/CN的名称和邮寄地址</p> <p>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</p> <p>传真号 (86-10)62019451</p>		<p>授权官员</p> <p>张艳青</p> <p>电话号码 (86-10)010-62413836</p>																		

C. 相关文件		
类型*	引用文件, 必要时, 指明相关段落	相关的权利要求
A	CHOUNG, Y.H. et al. "Functional Study of GJB2 in Hereditary Hearing Loss" THE LARYNGOSCOPE, 第112卷, 2002年 9月 30日 (2002 - 09 - 30), 第1667-1671页	1-9
A	THONNISSEN, E. et al. "Human connexin26 (GJB2) deafness mutations affect the function of gap junction channels at different levels of protein expression" HUM. GENET., 第111卷, 2002年 6月 22日 (2002 - 06 - 22), 第190-197页	1-9

国际检索报告  
关于同族专利的信息

国际申请号

PCT/CN2016/109847

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	105566495	A	2016年 5月 11日	无			
CN	102105492	A	2011年 6月 22日	WO	2009075881	A3	2009年 7月 30日
				WO	2009075881	A2	2009年 6月 18日
				JP	2011506446	A	2011年 3月 3日
				EP	2245061	A2	2010年 11月 3日
				EP	2628747	A1	2013年 8月 21日
				US	2011300130	A1	2011年 12月 8日
				JP	2014231521	A	2014年 12月 11日
				AU	2008335717	A1	2009年 6月 18日
				CA	2709151	A1	2009年 6月 18日
CN	102099475	A	2011年 6月 15日	CA	2727015	A1	2009年 12月 10日
				JP	2015166375	A	2015年 9月 24日
				ZA	201100046	B	2011年 10月 26日
				WO	2009148613	A1	2009年 12月 10日
				AU	2016216611	A1	2016年 9月 1日
				EP	2307546	A1	2011年 4月 13日
				JP	2011524345	A	2011年 9月 1日
				US	2011223204	A1	2011年 9月 15日
				AU	2009255619	A1	2009年 12月 10日

表 PCT/ISA/210 (同族专利附件) (2009年7月)