

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 824 176**

51 Int. Cl.:

**C07K 16/18** (2006.01)

**C12N 15/11** (2006.01)

**A61K 39/395** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **14.12.2016 PCT/CN2016/109847**

87 Fecha y número de publicación internacional: **03.08.2017 WO17128880**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **14.12.2016 E 16887751 (2)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **16.09.2020 EP 3342784**

54 Título: **Anticuerpo completamente humano que inhibe específicamente la conexina 26**

30 Prioridad:

**27.01.2016 CN 201610056295**

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:

**11.05.2021**

73 Titular/es:

**SHANGHAITECH UNIVERSITY (100.0%)  
393 Middle Huaxia Road, Pudong New Area  
Shanghai 201210, CN**

72 Inventor/es:

**QU, ZIHU;  
YANG, GUANG;  
MAMMANO, FABIO y  
ZONTA, FRANCESCO**

74 Agente/Representante:

**UNGRÍA LÓPEZ, Javier**

**ES 2 824 176 T3**

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín Europeo de Patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre Concesión de Patentes Europeas).

## DESCRIPCIÓN

Anticuerpo completamente humano que inhibe específicamente la conexina 26

5 **Campo técnico**

La presente invención pertenece al campo de la medicina biotecnológica, en particular, la presente invención proporciona el anticuerpo monocatenario o plásmido que expresa el anticuerpo, que es capaz de reconocer específicamente la Conexina 26, expresada en la cóclea humana y en el tejido cutáneo, e inhibir los hemicanales de la Conexina 26, y el uso de anticuerpos en la preparación de un medicamento y un kit de diagnóstico para el tratamiento de la sordera, de enfermedades cutáneas y de tumores causados por mutaciones producidas en la Conexina 26. La presente invención también proporciona el kit de diagnóstico preparado utilizando el anticuerpo. El kit comprende el anticuerpo monoclonal como principio activo.

15 **Antecedentes**

La unión gap es una unión intercelular formada por canales de iones. Los canales de unión gap conectan el citoplasma intercelular, permitiendo que moléculas más pequeñas de menos de 1,8 KD, tales como iones, metabolitos y segundos mensajeros<sup>[1,2]</sup>, pasen libremente. En vertebrados, una vía de unión gap compuesta por Conexina, actúa como mediadora en el intercambio de iones, moléculas pequeñas y moléculas de señalización entre células adyacentes y es muy importante en la etapa temprana del desarrollo de los mamíferos. Los canales de unión gap pueden estar compuestos por muchas proteínas de conexina diferentes y mostrar diferentes características de permeabilidad, que dependen de la composición de la conexina. Las células adyacentes utilizan la comunicación intercelular mediada por uniones gap o una vía independiente de gap para transmitir señales de desarrollo y regular la proliferación, migración y diferenciación celular durante el desarrollo. Las proteínas de la familia de las Conexinas se expresan de manera generalizada en las células de los vertebrados. Los hexámeros de este miembro de la familia se encuentran en la membrana celular formando uniones gap o hemicanales y actúan como mediadores en el intercambio de material entre las células y la matriz extracelular. Los genes que codifican las proteínas conexinas en el genoma constituyen la familia de genes de conexina<sup>[3]</sup>.

Hasta el momento, se han descubierto 21 tipos de genes de conexina en el genoma humano y 20 tipos de genes de conexina en el genoma del ratón<sup>[3]</sup>. Muchas funciones celulares importantes, incluidas la regulación, la diferenciación y el desarrollo del crecimiento celular, están mediadas por canales de unión gap y comunicaciones de hemicanales de conexina<sup>[4-6]</sup>. Las mutaciones en los genes de conexina están asociadas a muchas enfermedades humanas, incluyendo anomalías cardiovasculares, neuropatía periférica, cataratas y sordera. Los canales y hemicanales de Conexina 26 (Cx26) y Conexina 30 (Cx30), intervienen en el ciclo de iones de potasio del oído interno, y la delección de Cx26 y Cx30 causa una importante pérdida auditiva y la muerte celular concomitante en el órgano de Corti en desarrollo que se encuentra en la cóclea<sup>[4,7,8]</sup>. La Cx26 y Cx30 se expresan a través de dos genes adyacentes (GJB2 y GJB6), aunque la Cx26 y Cx30 están conectadas con células no sensibles en el oído interno para formar politopos. Ambas proteínas se expresan conjuntamente en el oído interno<sup>[9]</sup>. El locus DNFB1 se encuentra en el cromosoma 13q11 - q12<sup>[10]</sup>. El cincuenta por ciento de la sordera hereditaria está relacionado con el DNFB1, con hasta un 79 % en el Mediterráneo<sup>[10,11]</sup>. Las mutaciones por delección en Cx26 y Cx30 tienen un efecto importante en la formación orgánica de las espirales cocleares<sup>[12-14]</sup>. En algunos casos, las mutaciones puntuales en las conexinas pueden causar una apertura o cierre aberrante de los hemicanales, lo que producirá sordera y enfermedades cutáneas<sup>[15]</sup>. Se espera que los anticuerpos que reconocen específicamente la Cx26 y restauran su función, traten la sordera y las enfermedades cutáneas causadas por mutaciones de conexina.

En los últimos años, los anticuerpos monoclonales han jugado un papel importante en el diagnóstico y tratamiento de enfermedades, especialmente enfermedades que expresan antígenos específicos. La detección de la reacción de los anticuerpos monoclonales y antígenos, puede utilizarse como regla de oro para el diagnóstico de enfermedades. Los anticuerpos monoclonales también juegan un papel importante como fármacos en enfermedades autoinmunitarias y tumorales.

Las enfermedades causadas por mutaciones de conexina tienen una incidencia relativamente baja y relativamente pocos fármacos de tratamiento. Por otra parte, no se dispone de ningún fármaco de anticuerpos dirigido a los canales de conexina para tratar la sordera o las enfermedades cutáneas debido a las dificultades en la administración de fármacos de anticuerpos. No hay kits para el diagnóstico clínico, por lo que los anticuerpos monocatenarios, capaces de reconocer y unirse a la conexina, serán una herramienta importante en el diagnóstico y tratamiento del cáncer colorrectal. Se han descrito algunos anticuerpos policlonales y monoclonales contra la conexina-26<sup>[16,17]</sup>

**Referencias:**

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. González Nieto, L.C. Barrio, Regulation of connexin channel 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, en: E. Winterhager (Ed.), *Gap Junctions in Development and Disease*, Springer-Verlag, Berlín, 2005, págs. 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.
16. Choung Y. H. *et al.* (2002) Functional study of GJB2, in hereditary hearing, 1671.
17. Thonnissen, E. *et al.* (2002), *HUMAN GENETICS*, vol. 111, no.º 2, 190 - 197. mono- and polyconal.

### Sumario

Un objeto de la presente invención es proporcionar un anticuerpo monocatenario, que se una especialmente al antígeno humano de Conexina 26 y, por tanto, pueda utilizarse en la preparación de medicamentos que tratan enfermedades causadas por mutaciones en la Conexina 26 o kits de diagnóstico relevantes para la Conexina 26. Para lograr el objeto anterior, la presente invención proporciona un anticuerpo completamente humano que inhibe específicamente la Conexina 26, caracterizado por que es una inmunoglobulina recombinante que tiene la estructura de scFv-Fc, en donde scFv se refiere a un anticuerpo monocatenario que comprende una región variable de cadena pesada y una región variable de cadena ligera, la secuencia de aminoácidos de la región variable de la cadena pesada es la SEQ ID NO: 1, la secuencia de aminoácidos de la región variable de la cadena ligera es la SEQ ID NO: 2, y Fc se refiere a una región constante. Preferentemente, la región constante comprende una región constante CH2 y una región constante CH3.

De acuerdo con la presente divulgación, el anticuerpo completamente humano que inhibe específicamente la Conexina 26, reconoce específicamente la parte 41-75 de aminoácidos de la región extracelular de la Conexina 26. La presente divulgación también proporciona un anticuerpo modificado genéticamente, caracterizado por que tiene un 30 % o más de secuencias homólogas a un anticuerpo monocatenario del anticuerpo completamente humano que inhibe específicamente la Conexina 26. De acuerdo con la presente divulgación, el anticuerpo modificado genéticamente comprende uno de un fragmento Fab, un fragmento F(ab'), un fragmento Fd, un fragmento Fv y un fragmento Fc, una combinación de dos o más de los fragmentos anteriores, o un derivado de al menos uno de los fragmentos anteriores con otras proteínas o cadenas peptídicas. De acuerdo con la presente divulgación, la secuencia de la región CDR 3 de cadena pesada del anticuerpo modificado genéticamente es DFSWRGYMDV, la secuencia de la región CDR3 de cadena ligera es QQYGSSPRT.

La presente invención también proporciona una secuencia de nucleótidos que codifica el anticuerpo completamente humano que inhibe específicamente la Conexina 26, en donde su secuencia es la SEQ ID NO: 3 o la SEQ ID NO: 4. Preferentemente, la secuencia de nucleótidos codifica el anticuerpo completamente humano que inhibe específicamente la Conexina 26 como se ha descrito anteriormente. La presente divulgación también proporciona el uso del anticuerpo completamente humano que inhibe específicamente la Conexina 26 o el anticuerpo modificado genéticamente, en la fabricación de un medicamento o kit para el tratamiento de la sordera, enfermedades cutáneas o tumores causados por mutaciones de la Conexina 26.

La presente invención también proporciona un anticuerpo completamente humano que inhibe específicamente la Conexina 26 según la invención, para su uso en el tratamiento de la sordera, enfermedades cutáneas o tumores. El anticuerpo completamente humano que inhibe específicamente la Conexina 26 de la presente invención, se denomina Anti-Cx26-scFvll-Fc. Los resultados muestran que el anticuerpo monocatenario, obtenido mediante rondas

de exploración de fagotecas, puede unirse selectivamente a conexas e inhibir específicamente el hemicanal formado por las mismas. El anticuerpo Anti-Cx26-scFvII-Fc es un anticuerpo humano monocatenario recombinante, que es diferente de los anticuerpos de IgG habituales en aplicaciones clínicas. El Anti-Cx26-scFvII-Fc tiene una estructura de anticuerpo, características bioquímicas y funciones biológicas diferentes a las de la IgG. Nuestros experimentos demostraron que el anticuerpo monocatenario Anti-Cx26-scFvII-Fc tiene un peso molecular de aproximadamente 100 kd, reconoce y se une al epítipo del antígeno diana del dominio extracelular de conexina, reconoce específicamente células que sobreexpresan la conexina 26, y que el anticuerpo y la conexina 26 están localizados conjuntamente en la superficie celular. Los experimentos funcionales muestran que el Anti-Cx26-scFvII-Fc puede inhibir la actividad del hemicanal de la Conexina 26. La tinción inmunohistoquímica de este anticuerpo solo, puede diagnosticar con mayor precisión la expresión de la Conexina 26 humana en diversos tejidos. Resumiendo, el anticuerpo monocatenario Anti-Cx26-scFvII-Fc tiene aplicaciones potenciales en el tratamiento de la sordera, en enfermedades cutáneas y tumores, y en reactivos de diagnóstico de Conexina 26.

La secuencia de aminoácidos 41-56 de la región extracelular de la Conexina 26 humana se utiliza como antígeno, su secuencia de aminoácidos es KEVWGDEQADFVCNTL. El anticuerpo se obtiene mediante tecnología de exploración y fagotecas de presentación de anticuerpos monocatenarios. A través del análisis bioquímico y la identificación por inmunofluorescencia, se confirmó que el anticuerpo proporcionado por la presente invención reconocía específicamente la conexina 26 e inhibía su formación de actividad hemicanal. Los experimentos con animales muestran que el anticuerpo tiene un efecto inhibitorio significativo sobre la actividad hemicanal de secciones de tejido coclear de ratón. Por lo tanto, el anticuerpo puede utilizarse en el tratamiento de enfermedades asociadas a la conexina.

### Breve descripción de los dibujos

**Figura 1.** Exploración de anticuerpos monocatenarios y verificación de secuencias.

- A. Se utilizó ELISA de fagos para detectar la actividad de unión al antígeno después de enriquecer el anticuerpo.
- B. Ensayo ELISA de la unión entre el antígeno y el anticuerpo monoclonal seleccionado

**Figura 2.** Identificación de la estructura y actividad bioquímica del anticuerpo monocatenario

- A. Diagrama estructural de la inmunoglobulina scFv-Fc.
- B. El peso molecular del anticuerpo monocatenario es de aproximadamente 58 KDa analizado mediante transferencia de tipo Western
- C. Ensayo de estabilidad térmica del anticuerpo scFv II-Fc
- D. La espectrometría de masas muestra que el dímero Anti-Cx26-scFv II-Fc, tiene un peso molecular de 105140,3

**Figura 3.** Análisis de afinidad de unión entre el anticuerpo Anti-Cx26-scFv II-Fc y el antígeno Cx26.

- A. ELISA para analizar la afinidad de unión del anticuerpo/proteína Cx26
- B. Ensayo mediante SRP para analizar la afinidad de unión del anticuerpo con la proteína Cx26, los resultados mostraron que el anticuerpo anti-Cx26-scFv II-Fc se une a la proteína Cx26 con una KD de  $7,3E10^{-8}$  M

**Figura 4.** El análisis de inmunofluorescencia del anticuerpo Anti-Cx26-scFv II-Fc y la proteína Cx26-GFP para determinar las localización conjunta. Los resultados mostraron que estas dos proteínas se localizaban conjuntamente.

**Figura 5.** Los anticuerpos anti-Cx26-scFv II-Fc bloquean el análisis de actividad hemicanal de Cx26 mediante técnicas de pinzamiento zonal después de que la despolarización haya activado los canales de iones de Cx26.

### Descripción detallada

A continuación, la presente invención también se describe con referencia a realizaciones específicas.

#### Ejemplo 1. Exploración y purificación del anticuerpo monocatenario

##### 1, Materiales:

(1) polipéptido de antígeno biotinilado (secuencia: KEVWGDEQADFVCNTL, SEQ ID NO: 5, en lo sucesivo denominado antígeno) sintetizado en Genscript. (2) fagoteca de presentación de anticuerpos humanos de laboratorio. (3) perlas magnéticas de estreptavidina adquiridas en Thermo Scientific. (4) microplaca ELISA de alta adsorción adquirida en Corning Corporation. (5) anticuerpo Anti-M13 HRP adquirido en Thermo Scientific. (6) fago auxiliar adquirido en Life Technologies (Cat. N.º 18311019). (7) bacterias XL1-Blue disponibles en Agilent Technologies (Cat.

NO. 200228). (8) solución ABTS, solución de revelado, adquirida en Thermo Scientific, Cat. NO. 002024.

## 2, Método:

5 Doseos (200) microlitros de la fagoteca de presentación de anticuerpos humanos que expresan anticuerpos monocatenarios humanos (que contienen  $1 \times 10^{11}$  partículas de fago) se mezclaron con 5 microgramos de antígeno, se incubaron a temperatura ambiente durante 30 minutos y después se añadieron a 50 microlitros de las perlas magnéticas de estreptavidina. Las perlas magnéticas de estreptavidina capturaron los fagos unidos al antígeno, los fagos no unidos se eliminaron mediante aclarado con PBST, y después los fagos unidos de manera estable se eluyeron con tampón de glicina-HCl (pH 2,2). Bacterias XL1-Blue (Agilent Technologies Cat. 200228) se inocularon en 200 ml de medio SB y cuando la DO alcanzó 0,6, los fagos eluidos se añadieron a las bacterias XL1-Blue y se incubaron a 37°C durante 30 minutos, y después se incubaron durante la noche a 30°C. Las bacterias se recogieron por centrifugación y se añadieron 30 microlitros de fago auxiliar (que contenía  $1 \times 10^{11}$  partículas de fago auxiliar). La siguiente ronda de exploración se realizó después de la amplificación. Las etapas de selección anteriores se repitieron durante 3-4 rondas. Después, el caldo XL1-Blue que contenía fagos se diluyó minuciosamente y se sembró en placas de 10 cm con 100-500 clones en cada placa, y se escogieron los monoclonos. El ensayo ELISA de fagos se llevó a cabo después de cada ronda de selección de la fagoteca.

20 El ensayo ELISA de fagos comprende las siguientes etapas: inocular, en 200 microlitros de medio SB, en una placa de 96 pocillos, las bacterias monoclonales XL1-Blue que contienen los fagos, agitar a 37°C con una velocidad de 200 rpm durante 4-6 horas, añadir 1 microlitro de fago auxiliar cuando la DO esté próxima a 0,6 y agitar a 30°C durante la noche, centrifugar al día siguiente para recoger el sobrenadante a 3 000 g para su uso, recubrir durante la noche con el antígeno una microplaca de 96 pocillos de baja permeabilidad, añadir a la microplaca el fago preparado en el sobrenadante, incubar durante 2 horas a temperatura ambiente, y después, añadir el anticuerpo Anti-M13 HRP e incubar durante 30 minutos, lavar tres veces con PBST y añadir 50 microlitros de ABTS como solución de revelado.

30 El resultado del ensayo de inmunoabsorción enzimática (ELISA, por las siglas del inglés *enzyme-linked immunosorbent assay*) muestra que, a medida que avanza la selección, la señal de la inmunoabsorción enzimática aumenta continuamente mientras que la señal del antígeno de control (Acro Biosystems, número de catálogo CD0-H82F2) sigue siendo baja. Después de la cuarta ronda de selección, la intensidad de la señal del antígeno fue varias veces la del antígeno de control, lo que indica que después de 4 rondas de selección, los fagos capaces de expresar el anticuerpo de unión específico de antígeno se habían enriquecido. Se escogió el monoclonal de la biblioteca de la tercera y cuarta ronda, y el clon con resultados ELISA más del doble que los del clon de control, se seleccionó como un clon positivo. La secuencia del clon positivo se analizó y mediante análisis de comparación se determinaron diferentes secuencias de anticuerpos y situaciones de enriquecimiento.

## 3, Resultados:

40 Como se muestra en la FIG. 1A, el antígeno peptídico CB se exploró frente a la fagoteca de presentación de anticuerpos humanos. Después de 4 rondas de selección, la lectura del ensayo ELISA del grupo seleccionado, se incrementó continuamente en comparación con la del grupo de control. Se escogieron 700 anticuerpos monoclonales y se analizaron mediante ensayo ELISA, y el clon con resultados ELISA más del doble que los del grupo de control, se seleccionó como clon positivo, como se muestra en la Figura 1B. Se llevó a cabo un análisis de secuenciación de 150 clones positivos. Después del análisis de comparación y alineación, la secuencia de enriquecimiento eficaz se determinó basándose en que los que tienen mayores repeticiones tienen la afinidad de unión más fuerte del anticuerpo. El clon positivo seleccionado en la presente invención se repitió 84 veces en las 150 secuencias de clones, por tanto, tiene una alta afinidad.

50 Se secuenció el clon positivo seleccionado y la secuencia de ácido nucleico del clon positivo seleccionado fue la SEQ ID NO: 3.

## Ejemplo 2. Purificación de anticuerpos monocatenarios y detección de propiedades bioquímicas

### 1. Materiales:

60 (1) Los colorantes Sypro Orange se adquirieron en Thermo Scientific. (2) El vector de expresión pFUSE, pFUSE-hIgG1-FC2, se adquirió en la empresa Invivogen, n.º de catálogo pfuse-hg1fc2. (3) Las columnas HP de Proteína A HiTrap se adquirieron en GE. (4) El purificador de proteínas AKTApurifier100 se adquirió en GE. (5) El instrumento de PCR cuantitativa en tiempo real se adquirió en la empresa BioRad. (6) El kit de extracción de plásmidos se adquirió en la empresa Qiagen. (7) Kit de ensayo de proteína BCA (kit de ensayo de proteína BCA Pierce™, Pierce # 23253). (8) Las enzimas de restricción BamH1 y BglII se adquirieron en NEB.

### 2. Métodos:

La secuencia positiva obtenida en el Ejemplo 1 (es decir, la SEQ ID NO: 3) se sintetizó mediante el método de síntesis de genes (Nanjing GenScript Ltd.) y se añadió con los sitios de restricción BamH1 y BglII en ambos extremos de la secuencia. La secuencia de ácido nucleico obtenida, se insertó en el vector de expresión pFUSE-hlGg1-FC2 (Invivogen Corporation, con referencia a los procedimientos descritos en el manual de instrucciones), después de la digestión enzimática en los sitios de restricción BamH1 y BglII con referencia a los procedimientos descritos en el manual de instrucciones de NEB, para obtener un plásmido de expresión de anticuerpos eucariotas de Anti-Cx26-scFvII-Fc, que es un anticuerpo monocatenario que tiene un segmento Fc. El reactivo 293Fectin (Invitrogen Corporation, Cat. N.º 12347500) se mezcló con el plásmido de expresión de anticuerpos eucariotas con una relación de volumen frente a masa de 30 microlitros: 15 microgramos. La mezcla obtenida se añadió a 30 ml de células en suspensión 293Freestyle (disponibles en Thermo Corporation) y se incubó con agitación a 1 200 rpm y a 37 °C durante la noche. El sobrenadante se recogió después de la centrifugación, y la proteína del anticuerpo (Anti-Cx26-scFvII-Fc) se purificó en un purificador de proteínas AKTApurifier100, utilizando columnas HP de Proteína A HiTrap. Al final, la concentración de anticuerpos se analizó utilizando el kit de ensayo de proteínas BCA (Pierce, Cat. n.º 23252) con referencia a los procedimientos descritos en el manual de instrucciones.

El anticuerpo purificado se analizó mediante transferencia de tipo Western: para la electroforesis SDS-PAGE (electroforesis en gel de poliacrilamida con dodecilsulfato sódico), se cargaron 5 microgramos de la muestra de anticuerpos purificados, aplicando un voltaje de electroforesis de 110 V durante 60 minutos, se transfirieron a una membrana de acetato de celulosa y después se hibridaron con un anticuerpo secundario de cabra anti-ser humano conjugado con peroxidasa de rábano picante (Thermo Scientific). La membrana se aclaró y después, para la obtención de imágenes, se añadió reactivo de revelado (Pierce, Cat. n.º 35055).

El anticuerpo purificado se sometió a un ensayo de termoestabilidad con las siguientes etapas: diluir el anticuerpo purificado a 0,1 mg/ml, añadir colorante Sypro Orange con una relación de volumen de 1:2000 y sellar, cargar en el instrumento de PCR cuantitativa en tiempo real (BioRad) con un programa de calentamiento de 25°C a 90°C, 0,5°C por minuto y detectar los valores de fluorescencia.

El anticuerpo purificado se analizó mediante LC-MS, cromatografía líquida acoplada a espectrometría de masas, con las siguientes etapas: mezclar 5 microgramos del anticuerpo purificado con 1 microlitro de enzima PNGasa (disponible en NEB Inc., Catálogo n.º P0709S) a 37°C durante una hora, y cargar en un instrumento de LC/MS TOF Agilent 6230 para la espectrometría de masas de alta resolución.

### 3. Resultados:

La secuencia de ácido nucleico (SEQ ID NO: 3) obtenida en el Ejemplo 1, se insertó en el vector de expresión pFUSE-hlGg1-FC2 después de la digestión enzimática, para obtener la secuencia de ADN de scFv II (SEQ ID NO: 4) que contenía la región Fc. La secuencia de ADN de scFv II es capaz de codificar un anticuerpo monocatenario completamente humano (Anti-Cx26-scFvII-Fc, SEQ ID NO: 6) que inhibe específicamente la Conexina 26, es decir, el anticuerpo completamente humano que inhibe específicamente la Conexina 26, que es una inmunoglobulina recombinante que tiene la estructura de scFv-Fc, mostrada en la Figura 2A, en donde scFv se refiere a un anticuerpo monocatenario que comprende una región variable de cadena pesada y una región variable de cadena ligera, la secuencia de aminoácidos de la región variable de la cadena pesada es la SEQ ID NO: 1, la secuencia de aminoácidos de la región variable de la cadena ligera es la SEQ ID NO: 2, la secuencia de la región CDR 3 de cadena pesada es DFSWRGYYMDV, la secuencia de la región CDR3 de cadena ligera es QQYGSSPRT y Fc se refiere a la región constante. La región constante comprende una región constante CH2 y una región constante CH3. El anticuerpo completamente humano que inhibe específicamente la Conexina 26, reconoce específicamente la parte 41-75 de aminoácidos de la región extracelular de la Conexina 26.

El resultado de la transferencia de tipo Western se muestra en la Fig. 2B. La banda obvia a 58 kd muestra que el anticuerpo puede reconocer específicamente la proteína Cx26. La T<sub>f</sub> (temperatura de fusión) del anticuerpo es de 65°C, calculada utilizando los resultados del ensayo de estabilidad térmica, como se muestra en la Figura 2 C, por tanto, el anticuerpo Anti-Cx26-scFv II-Fc descrito tiene alta estabilidad. Los resultados de la LC-MS, cromatografía líquida acoplada a espectrometría de masas, mostrados en la FIG. 2D, muestran que el peso molecular del anticuerpo es de 105140 Daltons.

### Ejemplo 3. Ensayo ELISA para analizar la unión del anticuerpo monocatenario con la conexina 26

#### 1, Materiales:

1. La solución de fijación de antígenos CBS se adquirió en Thermo Scientific. 2. El anticuerpo secundario anti-Fc humano conjugado con HRP (*horseradish peroxidase*, peroxidasa de rábano picante), se adquirió en Thermo Scientific. 3. La solución ABST del sustrato revelador se adquirió en ThermoScientific. 4. La placa de fondo plano de 96 pocillos se adquirió en Corning Corporation.

#### 2, Métodos:

A la placa de 96 pocillos, se añadieron 50 µl por pocillo del antígeno polipeptídico Cx26 (sintetizado por GenScript, diluido con la solución de fijación de antígenos CBS, SEQ ID NO: 5) y 0,05 µg por pocillo del antígeno, se incubó durante la noche a 4° C, y después se incubó con agitación a temperatura ambiente durante 30 min. La placa de 96 pocillos se aclaró tres veces con PBS, se bloqueó con solución PBST que contenía leche al 5 % a 37°C durante 60 minutos y se aclaró tres veces con PBS. Se añadió el anticuerpo Anti-Cx26-scFv II-Fc obtenido en el Ejemplo 2 y se incubó a 37°C durante 60 minutos. Después de aclarar y secar la placa de 96 pocillos, se añadió a la misma el anticuerpo secundario anti-Fc humano y se incubó durante 30 minutos con agitación a temperatura ambiente. La placa de 96 pocillos se aclaró tres veces con PBS, se añadió el sustrato revelador y finalmente se realizó la lectura con un lector de microplacas.

### 3, Resultados:

Como se muestra en la FIG. 3A, los valores de DO de los pocillos de control negativo fueron inferiores a 0,2 y los valores de DO de los pocillos positivos fueron superiores a 0,4. Basándose en los resultados del ensayo ELISA, se seleccionaron 150 pocillos de colonias positivas.

#### Ejemplo 4. Detección de la combinación del anticuerpo monocatenario y la conexina 26 mediante SRP

##### 1, Materiales:

1. El instrumento Octet RED y su microplaca de detección (microplaca CM5) se adquirieron en Pall Corporation.
2. El anticuerpo humano anti-IgG se adquirió en Thermo Scientific.

##### 2, Método experimental:

La afinidad y la cinética del anticuerpo y el antígeno se detectaron mediante el método de cinética de ciclos múltiples. La inmovilización del anticuerpo se realizó mediante el método de captura. En primer lugar, el anticuerpo humano anti-IgG se acopló a la microplaca CM5, y después de diluirse en serie, la muestra de anticuerpo Anti-Cx26-scFv II-Fc fluyó a través de la superficie de la microplaca. A continuación, el anticuerpo a detectar se capturó con el anticuerpo anti-Fc humano acoplado. Después, se añadió el antígeno polipeptídico (sintetizado por Nanjing Genscript Co.Ltd, secuencia: SEQ ID NO: 5), el antígeno se unió con el anticuerpo y la señal se detectó y se registró. Por último, para una nueva ronda de ensayo, el anticuerpo y las muestras de antígeno en la superficie de la microplaca CM5, se eluyeron mediante un reactivo de regeneración (solución de glicina, pH 1,7).

##### 3, Resultados:

Como se muestra en la Figura 3B, la detección mediante SRP de la interacción entre el anticuerpo y la conexina 26, mostró que la KD resultante del anticuerpo Anti-Cx26-scFv II-Fc con la proteína Cx26 era de  $7,3E10^{-8}$  M.

#### Ejemplo 5. Detección de inmunofluorescencia celular de la proteína Cx26 reconocida específicamente por el anticuerpo

##### 1, Materiales:

(1) Las células HeLa DH se adquirieron en la empresa Sigma. (2) El plásmido indicador Cx26-Venus-YFP se adquirió en Addgene, Cat. n.º 69016. (3) El anticuerpo secundario de cabra anti-ser humano conjugado con el colorante fluorescente Alexa Fluor 594, se adquirió en Thermo Scientific. (4) El microscopio confocal de fluorescencia se adquirió en la empresa Leica.

##### 2, Métodos:

El plásmido Cx26-Venus-YFP se transfectó en células HeLa DH con 293Fectin (Thermo) con referencia a los procedimientos descritos en el manual de instrucciones. El plásmido Cx26-Venus-YFP puede expresar la proteína Cx26 humana en la membrana celular con fluorescencia verde. Después de fijar con formol al 2 %, las células se mantuvieron a temperatura ambiente durante 10 minutos. Después de aclarar, las células se bloquearon con BSA al 2 % en PBS durante 30 min, y después se incubaron durante 4 a 5 horas en la solución de anticuerpo Anti-Cx26-scFvII-Fc, que se obtuvo diluyendo 1 mg/ml de solución de anticuerpo Anti-Cx26-scFvII-Fc con BSA/PBS al 1 % con una relación de dilución de 1:500. Después de aclarar, las células se añadieron con el anticuerpo secundario de cabra anti-ser humano conjugado con colorante fluorescente Alexa Fluor 594, que se diluyó en una solución de BSA/PBS al 1 % con una relación de dilución de 1:1 000. Las células se incubaron a temperatura ambiente durante 60 min., se añadió DAPI (1 µg/ml) y se incubaron durante 5 minutos, se aclararon, se montaron en un microscopio confocal láser de barrido y se detectaron.

##### 3, Resultados:

Como se muestra en la Figura 4, el anticuerpo Anti-Cx26-scFv II-Fc se localiza conjuntamente con las proteínas

Cx26 y GFP (por sus siglas en inglés, *Green Fluorescent Protein*, proteína verde fluorescente).

**Ejemplo 6, Detección de la actividad hemicanal de Cx26 inhibida por el anticuerpo mediante la técnica de pinzamiento zonal**

5 **1, Materiales:**  
 (1) Las células HeLa DH se adquirieron en la empresa Sigma. (2) El plásmido indicador Cx26-Venus-YFP se  
 10 adquirió en Addgene, Cat. n.º 69016. (3) El sistema automático de pinzamiento zonal se adquirió en la empresa  
 MDC de Estados Unidos.

**2, Métodos:**  
 El plásmido Cx26-Venus-YFP se transfectó en células HeLa DH con 293Fectin (Thermo) con referencia a los  
 15 procedimientos descritos en el manual de instrucciones. Para registrar las corrientes de iones de una sola  
 membrana, se utilizó pinzamiento zonal de células enteras. Al sobrenadante de las células se le añadió el anticuerpo  
 Anti-Cx26-scFv II-Fc 940 nM, mientras que a grupo de control positivo se le añadió  $Zn^{2+}$  100 uM y a un grupo de  
 20 control en blanco no se le añadió ningún anticuerpo. La tensión aumentó a 40 milivoltios para que las células se  
 despolarizaran, lo que dio lugar a la apertura del hemicanal Cx26. Se registraron las corrientes de los hemicanales  
 del grupo de experimentación al que se añadió el anticuerpo, del grupo de control positivo y del grupo de control en  
 blanco. La tensión se redujo a menos 40 milivoltios para hiperpolarizar las células y simultáneamente se registró la  
 corriente de los hemicanales de cada grupo.

**3, Resultados:**  
 25 Como se muestra en la Figura 5, el anticuerpo Anti-Cx26-scFv II-Fc puede inhibir eficazmente la actividad hemicanal  
 de Cx26, que es 100 veces más alta que la del inhibidor inespecífico  $Zn^{2+}$ .

- LISTADO DE SECUENCIAS
- 30 <110> ShanghaiTech University
- <120> Un anticuerpo completamente humano que inhibe específicamente la conexina 26
- 35 <130> 11
- <160> 6
- <170> PatentIn versión 3.5
- 40 <210> 1
- <211> 109
- <212> PRT
- <213> Cadena pesada de la secuencia de aminoácidos del anticuerpo humano
- 45 <400> 1

ES 2 824 176 T3

Pro Gly Arg Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe  
 1 5 10 15  
 Ser Ser Tyr Ala Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu  
 20 25 30  
 Glu Trp Val Ala Val Ile Ser His Gly Gly Ser Asn Lys Tyr Tyr Ala  
 35 40 45  
 Asp Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn  
 50 55 60  
 Thr Leu Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val  
 65 70 75 80  
 Tyr Tyr Cys Ala Arg Asp Phe Ser Trp Arg Gly Tyr Tyr Met Asp Val  
 85 90 95  
 Trp Gly Lys Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Gly Ser  
 100 105

<210> 2  
 <211> 108  
 <212> PRT  
 <213> Cadena ligera de la secuencia de aminoácidos del anticuerpo humano  
 <400> 2

5

Glu Thr Thr Leu Thr Gln Ser Pro Ala Thr Leu Ser Leu Ser Pro Gly  
 1 5 10 15  
 Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Gln Ser Ile Ser Ser Tyr  
 20 25 30  
 Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Arg Leu Leu Ile  
 35 40 45  
 Tyr Gly Ala Ser Thr Arg Ala Thr Gly Ile Pro Asp Arg Phe Ser Gly  
 50 55 60  
 Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Arg Leu Glu Pro  
 65 70 75 80  
 Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Tyr Gly Ser Ser Pro Arg  
 85 90 95  
 Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg  
 100 105

10

<210> 3  
 <211> 732  
 <212> ADN

15

ES 2 824 176 T3

<213> Secuencia artificial

<400> 3

caggtacagc tgcagcagtc aggggggggc gtggtccagc ctgggaggtc cctgagactc 60  
tcctgtgcag cctctggatt caccttcagt agctatgcta tgcactgggt ccgccaggct 120  
ccaggcaagg ggctggagtg ggtggcagtt atatcacatg gtggaagtaa taaatactac 180  
gcagactccg tgaagggccg attcaccatc tccagagaca attccaagaa cacgctgtat 240  
ctgcaaatga acagcctgag agctgaggac acggctgtgt attactgtgc gagagathtt 300  
agttggagag ggtactacat ggacgtctgg ggcaaaggca ccctggtcac cgtctcctca 360  
ggcagcggcg gtggcggatc cgaaacgaca ctcaacgagt ctccagccac cctgtctttg 420  
tctccagggg aaagagccac cctctcctgc agggccagtc agagtattag cagctactta 480  
gcctgggtacc agcagaaacc tggccaggct cccaggctcc tcatctatgg tgcattcacc 540  
agggccactg gcatcccaga caggttcagt ggcagtgggt ctgggacaga cttcactctc 600  
accatcagca gactggagcc tgaagathtt gcagtgtatt actgtcagca gtatggtagc 660  
tcacctcgaa ctttcggcgg agggaccaag gtggaaatca aacgtggcct cgggggcat 720  
atcggccatg gt 732

5

<210> 4

<211> 1422

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

10

<400> 4

atggcacagg tacagctgca gcagtcaggg gggggcgtgg tccagcctgg gaggtccctg 60  
agactctcct gtgcagcctc tggattcacc ttcagtagct atgctatgca ctgggtccgc 120  
caggctccag gcaaggggct ggagtgggtg gcagttatat cacatggtgg aagtaataaa 180

15

ES 2 824 176 T3

tactacgcag actccgtgaa gggccgattc accatctcca gagacaattc caagaacacg 240  
ctgtatctgc aatgaacag cctgagagct gaggacacgg ctgtgtatta ctgtgcgaga 300  
gattttagtt ggagagggta ctacatggac gtctggggca aaggcaccct ggtcacctgc 360  
tcctcaggca gcggcgggtg cggatccgaa acgacactca cgcagtctcc agccaccctg 420  
tctttgtctc caggggaaag agccaccctc tcctgcaggg ccagtccagag tattagcagc 480  
tacttagcct ggtaccagca gaaacctggc caggctocca ggctcctcat ctatggtgca 540  
tccaccaggg cactggcat cccagacagg ttcagtggca gtgggtctgg gacagacttc 600  
actctacca tcagcagact ggagcctgaa gattttgcag tgtattactg tcagcagtat 660  
ggtagctcac ctcgaaactt cggcggaggg accaagggtg aatcaaacg tggcctcggg 720  
ggccccatgg ttagatctga caaaactcac acatgccac cgtgccacg acctgaactc 780  
ctgggggggac cgtcagtctt cctcttcccc ccaaaacca aggacaccct catgatctcc 840  
cggaccctg aggtcacatg cgtgggtggtg gacgtgagcc acgaagacc tgaggtcaag 900  
ttcaactggt acgtggacgg cgtggaggtg cataatgcca agacaaagcc gcgggaggag 960  
cagtacaaca gcacgtaccg tgtggtcagc gtcctcaccg tcctgcacca ggactggctg 1020  
aatggcaagg agtacaagtg caaggtctcc acaaagccc tcccagcccc catcgagaaa 1080  
accatctcca aagccaaagg gcagccccga gaaccacagg tgtacaccct gccccatcc 1140  
cgggaggaga tgaccaagaa ccaggtcagc ctgacctgcc tggtaaag cttctatccc 1200  
agcgacatcg ccgtggagtg ggagagcaat gggcagccgg agaacaacta caagaccacg 1260  
cctcccgtgc tggactccga cggctccttc tcctctaca gcaagctcac cgtggacaag 1320  
agcaggtggc agcaggggaa cgtcttctca tgctccgtga tgcacgaggc tctgcacaac 1380  
cactacacgc agaagagcct ctccctgtct ccgggtaaat ga 1422

<210> 5  
<211> 16  
5 <212> PRT  
<213> Polipéptido artificial

<400> 5

Lys Glu Val Trp Gly Asp Glu Gln Ala Asp Phe Val Cys Asn Thr Leu  
1 5 10 15

<210> 6  
10 <211> 473  
<212> PRT  
15 <213> Secuencia artificial

<400> 6

Met Ala Gln Val Gln Leu Gln Gln Ser Gly Gly Gly Val Val Gln Pro

20

ES 2 824 176 T3

1				5						10					15
Gly	Arg	Ser	Leu	Arg	Leu	Ser	Cys	Ala	Ala	Ser	Gly	Phe	Thr	Phe	Ser
			20					25					30		
Ser	Tyr	Ala	Met	His	Trp	Val	Arg	Gln	Ala	Pro	Gly	Lys	Gly	Leu	Glu
		35					40					45			
Trp	Val	Ala	Val	Ile	Ser	His	Gly	Gly	Ser	Asn	Lys	Tyr	Tyr	Ala	Asp
	50					55					60				
Ser	Val	Lys	Gly	Arg	Phe	Thr	Ile	Ser	Arg	Asp	Asn	Ser	Lys	Asn	Thr
65					70					75					80
Leu	Tyr	Leu	Gln	Met	Asn	Ser	Leu	Arg	Ala	Glu	Asp	Thr	Ala	Val	Tyr
				85					90					95	
Tyr	Cys	Ala	Arg	Asp	Phe	Ser	Trp	Arg	Gly	Tyr	Tyr	Met	Asp	Val	Trp
			100					105					110		
Gly	Lys	Gly	Thr	Leu	Val	Thr	Val	Ser	Ser	Gly	Ser	Gly	Gly	Gly	Gly
		115					120					125			
Ser	Glu	Thr	Thr	Leu	Thr	Gln	Ser	Pro	Ala	Thr	Leu	Ser	Leu	Ser	Pro
	130					135					140				
Gly	Glu	Arg	Ala	Thr	Leu	Ser	Cys	Arg	Ala	Ser	Gln	Ser	Ile	Ser	Ser
145					150					155					160
Tyr	Leu	Ala	Trp	Tyr	Gln	Gln	Lys	Pro	Gly	Gln	Ala	Pro	Arg	Leu	Leu
				165					170					175	
Ile	Tyr	Gly	Ala	Ser	Thr	Arg	Ala	Thr	Gly	Ile	Pro	Asp	Arg	Phe	Ser
			180					185					190		
Gly	Ser	Gly	Ser	Gly	Thr	Asp	Phe	Thr	Leu	Thr	Ile	Ser	Arg	Leu	Glu
		195					200					205			
Pro	Glu	Asp	Phe	Ala	Val	Tyr	Tyr	Cys	Gln	Gln	Tyr	Gly	Ser	Ser	Pro
	210					215					220				
Arg	Thr	Phe	Gly	Gly	Gly	Thr	Lys	Val	Glu	Ile	Lys	Arg	Gly	Leu	Gly
225					230					235					240
Gly	Pro	Met	Val	Arg	Ser	Asp	Lys	Thr	His	Thr	Cys	Pro	Pro	Cys	Pro
				245					250					255	

ES 2 824 176 T3

Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys  
 260 265 270

Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val  
 275 280 285

Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr  
 290 295 300

Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu  
 305 310 315 320

Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His  
 325 330 335

Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys  
 340 345 350

Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln  
 355 360 365

Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met  
 370 375 380

Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro  
 385 390 395 400

Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn  
 405 410 415

Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu  
 420 425 430

Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val  
 435 440 445

Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln  
 450 455 460

Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys  
 465 470

**REIVINDICACIONES**

- 5 1. Un anticuerpo completamente humano que inhibe específicamente la Conexina 26, **caracterizado por que** es una inmunoglobulina recombinante que tiene la estructura de scFv-Fc, en donde scFv se refiere a un anticuerpo monocatenario que comprende una región variable de cadena pesada y una región variable de cadena ligera, la secuencia de aminoácidos de la región variable de la cadena pesada es la SEQ ID NO: 1, la secuencia de aminoácidos de la región variable de la cadena ligera es la SEQ ID NO: 2, y Fc se refiere a una región constante.
- 10 2. El anticuerpo completamente humano que inhibe específicamente la Conexina 26 según la reivindicación 1, en donde la región constante comprende una región constante CH2 y una región constante CH3.
3. Una secuencia de nucleótidos que codifica un anticuerpo completamente humano que inhibe específicamente la Conexina 26, en donde, según la reivindicación 1, su secuencia es la SEQ ID NO: 3 o la SEQ ID NO: 4.
- 15 4. Un anticuerpo completamente humano que inhibe específicamente la Conexina 26 según una cualquiera de las reivindicaciones 1 y 2, para su uso en el tratamiento de la sordera, enfermedades cutáneas o tumores.

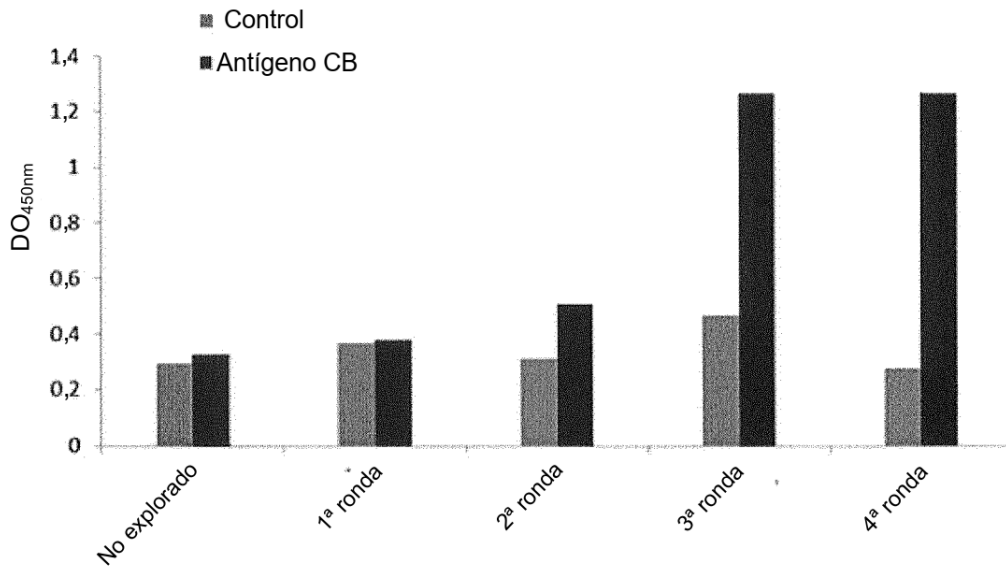


Figura 1A

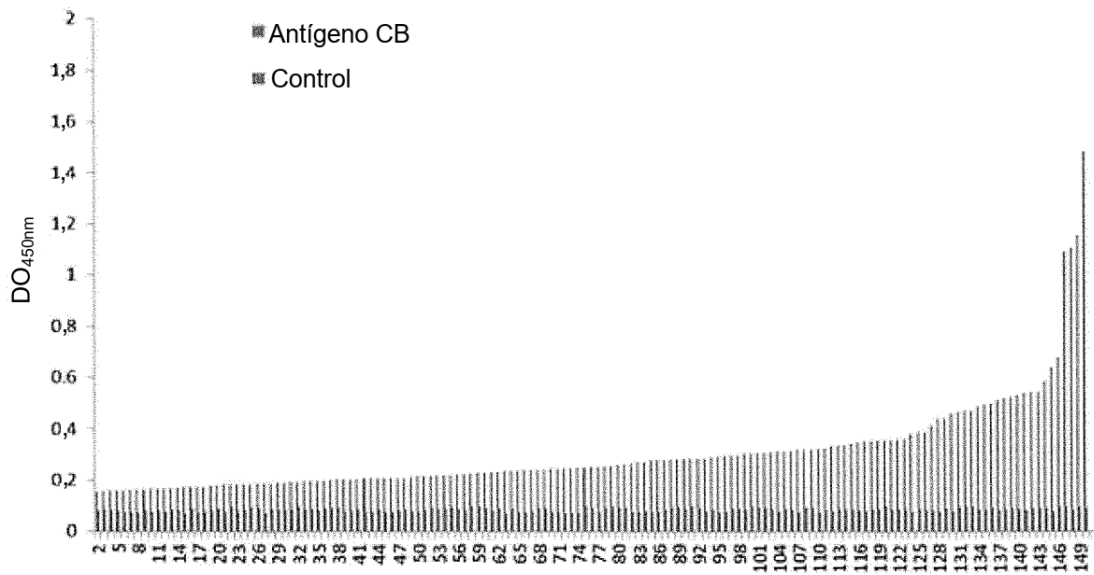


Figura 1B

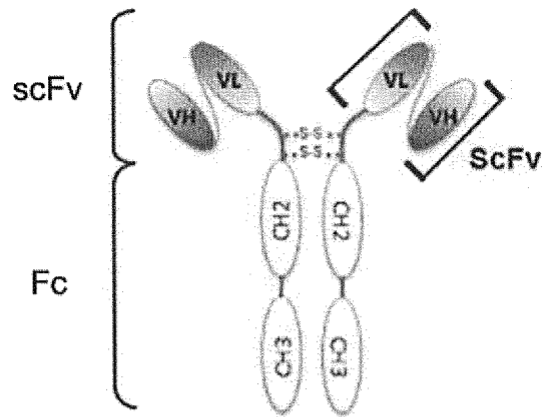


Figura 2A

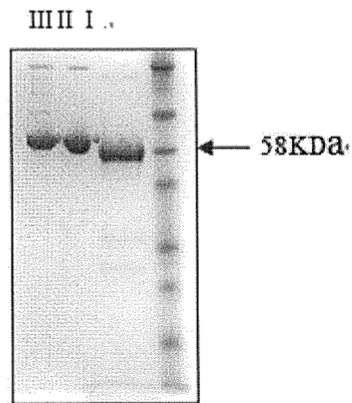


Figura 2B

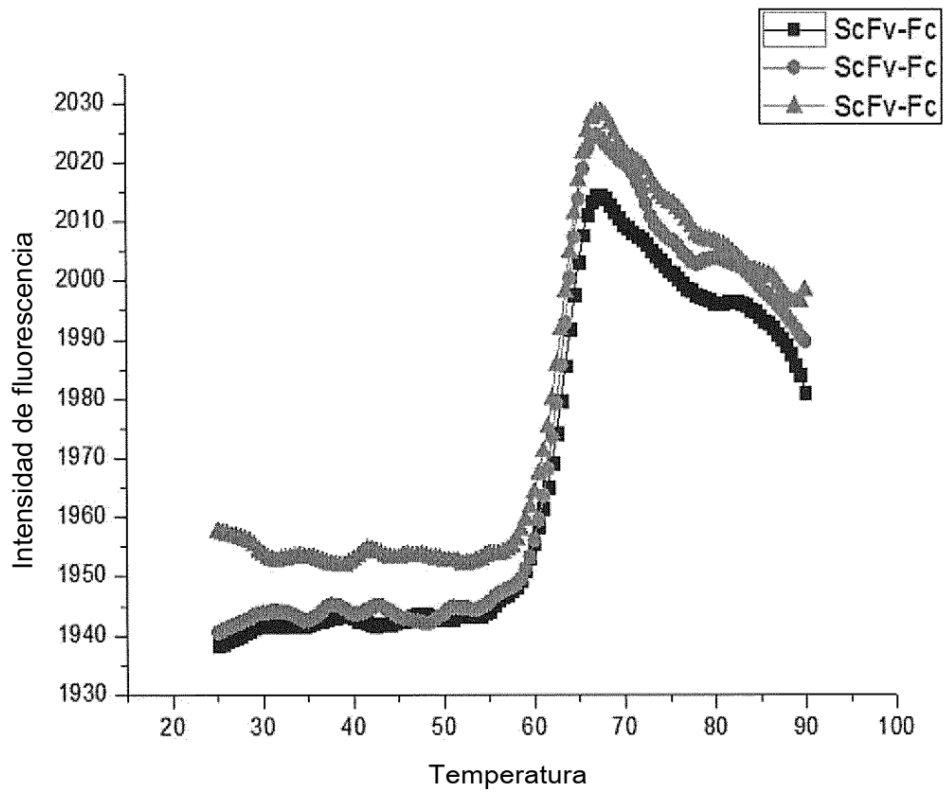


Figura 2C

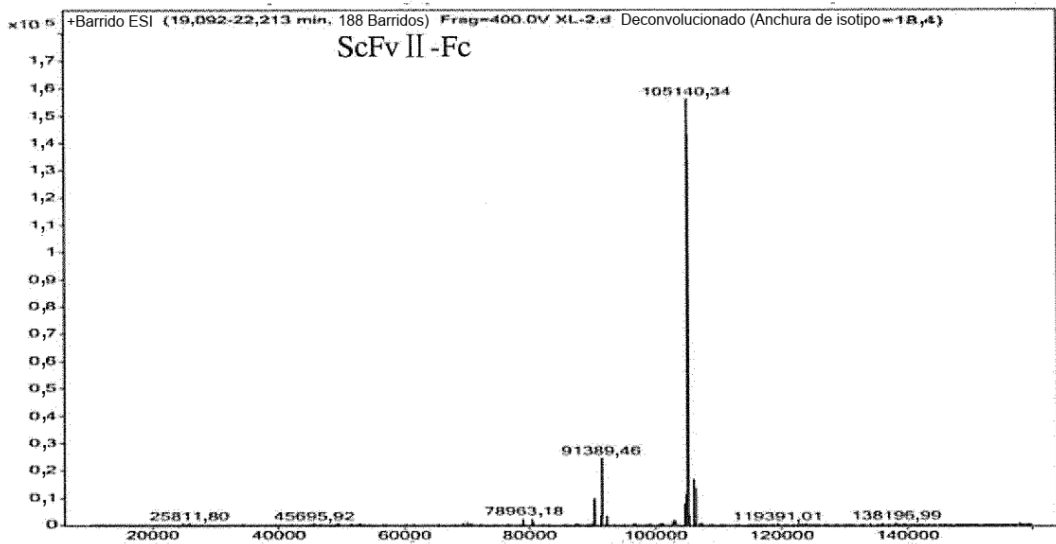


Figura 2D

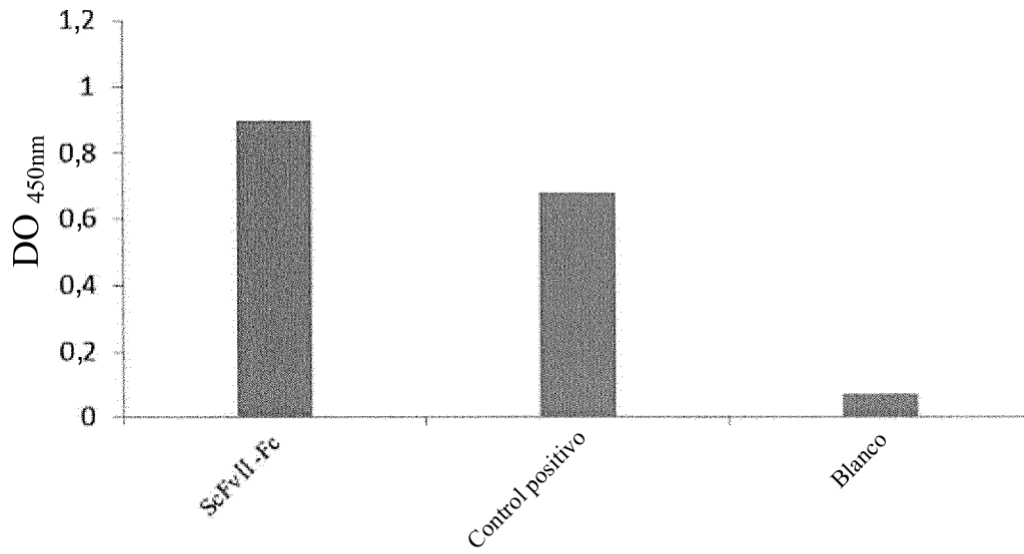
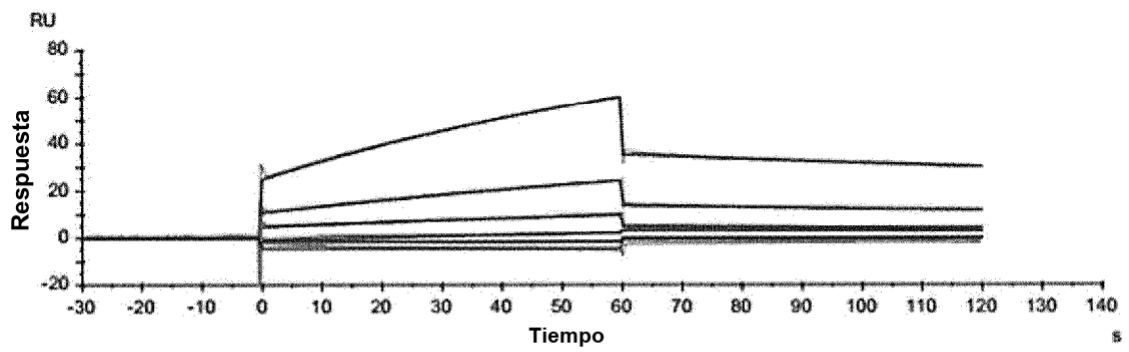


Figura 3A



Ligando	Analito	ka(1/Ms)	kd(1/s)	KD(M)
scFvII-Fc	antígeno CB	5,79E+04	0,004222	7,30E-08

Figura 3B

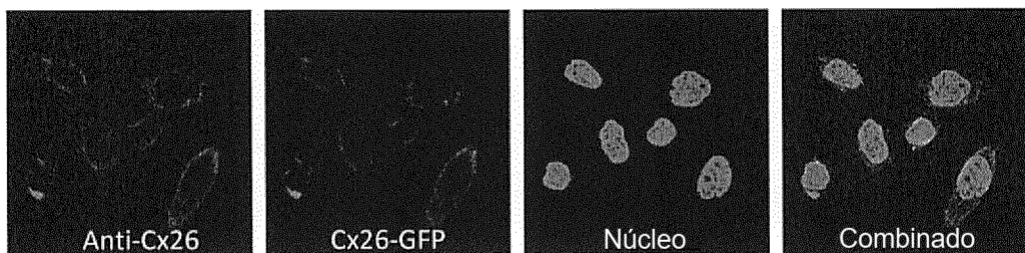


Figura 4

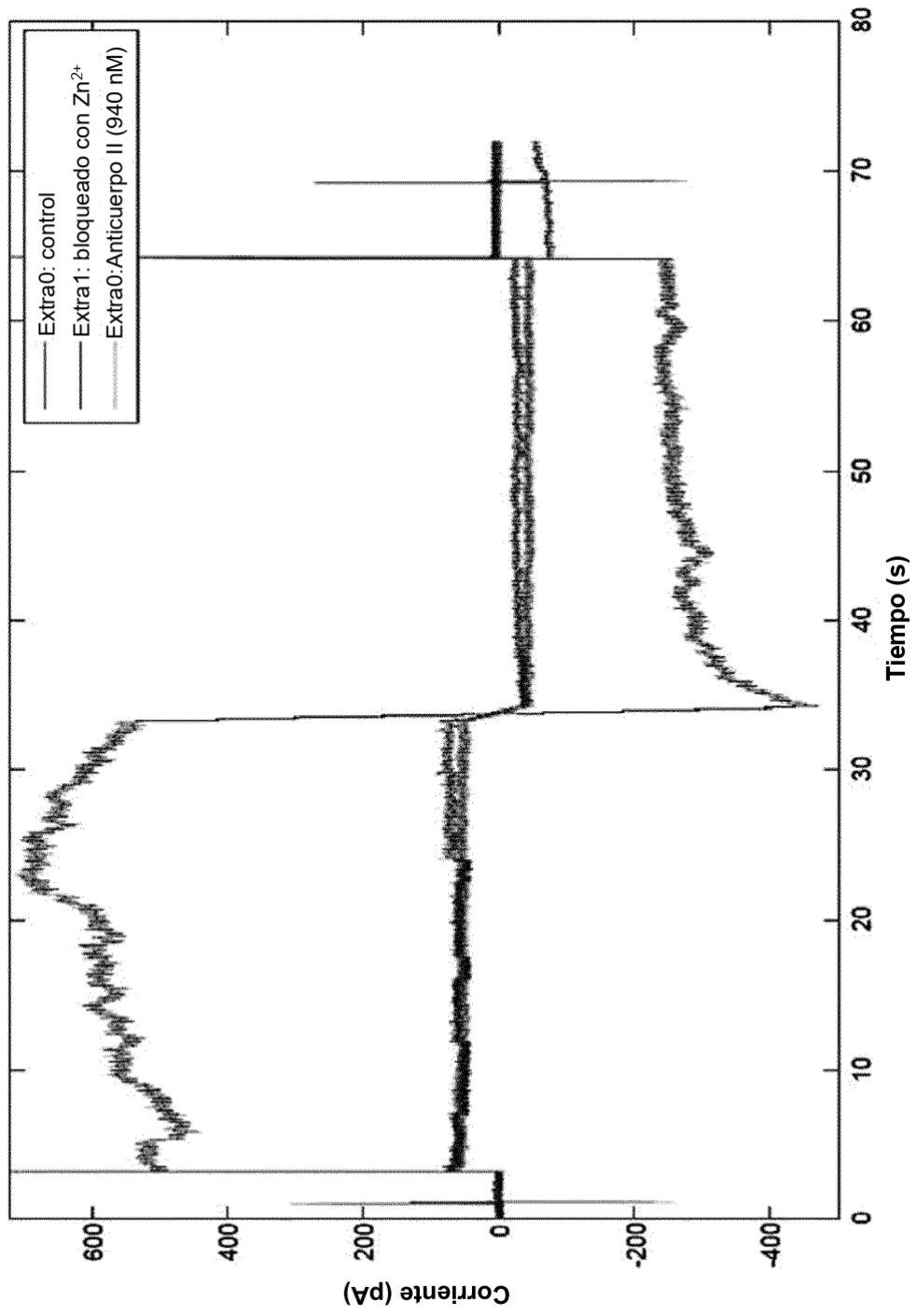


Figura 5