

抗 TRPV6 单克隆抗体及其应用

技术领域

[1] 本发明涉及一系列可以识别人 TRPV6 蛋白的抗体及可分泌该系列抗体的杂交瘤细胞系。具体而言，本发明提供了一系列特异性结合肿瘤细胞膜/浆内 TRPV6 分子的单克隆抗体，对该抗体重链和轻链可变区的氨基酸序列和编码可变区的 DNA 序列进行了确定，该抗体或其抗原片段可以用于通过人工或自动化方式，以免疫组织化学（IHC）、酶联免疫吸附（ELISA）、免疫荧光（IF）、化学发光（CLIA）、免疫比浊（TIA）或免疫印迹（Western Blot）方式检测细胞中 TRPV6 的水平，从而用于对这些肿瘤进行诊断的方法中，属于生物检测领域。

背景技术

[2] 瞬时受体阳离子通道亚家族 V 成员 6（transient receptor potential cation channel subfamily V member 6），即 TRPV6，是一种高选择性钙离子跨膜转运通道，介导钙离子由细胞外向细胞内的主动转运。TRPV6 在人正常的肾脏、胃肠道、胰腺、乳腺、唾液腺等中有表达，但是主要表达于肠上皮细胞，其参与钙离子向细胞内的转运，因此当 TRPV6 通道的数量或功能发生改变时，可引起钙离子调节的变化，进一步导致与其相关组织器官的结构或功能异常。

[3] 和正常组织相比，TRPV6 在乳腺癌、胆管癌、卵巢癌、肺鳞癌、前列腺癌等恶性肿瘤中表达明显升高，其异常表达可能与肿瘤的形成与进展有关。Prevarskaya 团队发现高表达 TRPV6 的人前列腺癌 LNCap 细胞摄取钙离子是由 TRPV6 介导的，在经过 siRNA 处理，调低 TRPV6 蛋白水平后，其 S 期细胞数量减少，细胞增殖受到抑制。还有利用利多卡因处理人乳腺癌 MDA-MB-231 细胞、前列腺癌 PC-3 细胞和卵巢癌 ES-2 细胞后，使 TRPV6 mRNA 和蛋白的水平下调，细胞增殖受到抑制，同时钙离子进入细胞内的速率降低，表明癌细胞的抑制可能与钙离子的减少有关，并且可能与 TRPV6 水平有关。可见 TRPV6 与人体多种肿瘤均有密切联系，并且可能与其调节细胞内外钙离子浓度变化有关。

[4] TRPV6 作为肿瘤细胞标记物，针对其的检测对于病理诊断和相应靶向药物使用都有重要意义。目前市面上尚未有可用作诊断用途的抗 TRPV6 抗体，本专利所涉及抗体可以填补该方面的空白。

发明内容

[5] 本申请的一个方面提供了一种特异性结合 TRPV6 的抗体或其抗原结合片段，其中所述抗体或其抗原结合片段包含如下重链可变区所包括的三个重链互补决定区 HCDR1、HCDR2 和 HCDR3：SEQ ID NO: 25 所示的重链可变区；SEQ ID NO: 27 所示的重链可变区；或 SEQ ID NO: 29 所示的重链可变区。在一些实施方式中，所述抗体或其抗原结合片段包含选自下组的三个重链互补决定区 HCDR1、HCDR2 和 HCDR3：SEQ ID NO: 7 所示的 HCDR1、SEQ ID NO: 8 所示的 HCDR2、SEQ ID NO: 9 所示的 HCDR3；SEQ ID NO: 13 所示的 HCDR1、SEQ ID NO: 14 所示的 HCDR2、SEQ ID NO: 15 所示的 HCDR3；或 SEQ ID NO: 19 所示的 HCDR1、SEQ ID NO: 20 所示的 HCDR2、SEQ ID NO: 21 所示的 HCDR3。

[6] 在一些实施方式中，所述抗体或其抗原结合片段进一步包含如下轻链可变区所包括的三个轻链互补决定区 LCDR1、LCDR2 和 LCDR3：SEQ ID NO: 26 所示的轻链可变区；SEQ ID NO: 28 所示的轻链可变区；或 SEQ ID NO: 30 所示的轻链可变区。在一些实施方式中，所述抗体或其抗原结合片段进一步包含选自下组的三个轻链互补决定区 LCDR1、LCDR2 和 LCDR3：SEQ ID NO: 10 所示的 LCDR1、SEQ ID NO: 11 所示的 LCDR2 以及 SEQ ID NO: 12 所示的 LCDR3；SEQ ID NO: 16 所示的 LCDR1、SEQ ID NO: 17 所示的 LCDR2 以及 SEQ ID NO: 18 所示的 LCDR3；SEQ ID NO: 22 所示的 LCDR1、SEQ ID NO: 23 所示的 LCDR2 以及 SEQ ID NO: 24 所示的 LCDR3。

[7] 在一些实施方式中，所述抗体或其抗原结合片段包含选自下组的三个重链互补决定区 HCDR1、HCDR2 和 HCDR3 以及三个轻链互补决定区 LCDR1、LCDR2 和 LCDR3：SEQ ID NO: 7 所示的 HCDR1、SEQ ID NO: 8 所示的 HCDR2、SEQ ID NO: 9 所示的 HCDR3、SEQ ID NO: 10 所示的 LCDR1、SEQ ID NO: 11 所示的 LCDR2 以及 SEQ ID NO: 12 所示的 LCDR3；SEQ ID NO: 13 所示的 HCDR1、SEQ ID NO: 14 所示的 HCDR2、SEQ ID NO: 15 所示的 HCDR3、SEQ ID NO: 16 所示的 LCDR1、SEQ ID NO: 17 所示的 LCDR2 以及 SEQ ID NO: 18 所示的 LCDR3；SEQ ID NO: 19 所示的 HCDR1、

SEQ ID NO: 20 所示的 HCDR2、SEQ ID NO: 21 所示的 HCDR3、SEQ ID NO: 22 所示的 LCDR1、SEQ ID NO: 23 所示的 LCDR2 以及 SEQ ID NO: 24 所示的 LCDR3。

[8] 在一些实施方式中，所述抗体或其抗原结合片段包含 SEQ ID NO: 7 所示的 HCDR1、SEQ ID NO: 8 所示的 HCDR2、SEQ ID NO: 9 所示的 HCDR3、SEQ ID NO: 10 所示的 LCDR1、SEQ ID NO: 11 所示的 LCDR2 以及 SEQ ID NO: 12 所示的 LCDR3。

[9] 在一些实施方式中，所述抗体或其抗原结合片段包含 SEQ ID NO: 13 所示的 HCDR1、SEQ ID NO: 14 所示的 HCDR2、SEQ ID NO: 15 所示的 HCDR3、SEQ ID NO: 16 所示的 LCDR1、SEQ ID NO: 17 所示的 LCDR2 以及 SEQ ID NO: 18 所示的 LCDR3。

[10] 在一些实施方式中，所述抗体或其抗原结合片段包含 SEQ ID NO: 19 所示的 HCDR1、SEQ ID NO: 20 所示的 HCDR2、SEQ ID NO: 21 所示的 HCDR3、SEQ ID NO: 22 所示的 LCDR1、SEQ ID NO: 23 所示的 LCDR2 以及 SEQ ID NO: 24 所示的 LCDR3。

[11] 在一些实施方式中，所述抗体或其抗原结合片段包含选自下组的重链可变区 V_H 和：SEQ ID NO: 25 所示的重链可变区；SEQ ID NO: 27 所示的重链可变区；或 SEQ ID NO: 29 所示的重链可变区。

[12] 在一些实施方式中，所述抗体或其抗原结合片段进一步包含选自下组的轻链可变区 V_L ：SEQ ID NO: 26 所示的轻链可变区；SEQ ID NO: 28 所示的轻链可变区；或 SEQ ID NO: 30 所示的轻链可变区。

[13] 在一些实施方式中，所述抗体或其抗原结合片段包含选自下组的重链可变区 V_H 和轻链可变区 V_L ：SEQ ID NO: 25 所示的重链可变区和 SEQ ID NO: 26 所示的轻链可变区；SEQ ID NO: 27 所示的重链可变区和 SEQ ID NO: 28 所示的轻链可变区；或 SEQ ID NO: 29 所示的重链可变区和 SEQ ID NO: 30 所示的轻链可变区。

[14] 在一些实施方式中，所述抗体或其抗原结合片段包含 SEQ ID NO: 25 所示的重链可变区和 SEQ ID NO: 26 所示的轻链可变区。

[15] 在一些实施方式中，所述抗体或其抗原结合片段包含 SEQ ID NO: 27 所示的重链可变区和 SEQ ID NO: 28 所示的轻链可变区。

[16] 在一些实施方式中，所述抗体或其抗原结合片段包含 SEQ ID NO: 29 所示的重链可变区和 SEQ ID NO: 30 所示的轻链可变区。

[17] 在一些实施方式中，所述抗体或其抗原结合片段特异性识别或结合具有 SEQ ID NO: 2 所示的氨基酸序列的蛋白。

[18] 在一些实施方式中，所述抗体或其抗原结合片段与具有 SEQ ID NO: 2 所示的氨基酸序列的蛋白的 K_d 值为 10^{-7} - 10^{-10} M。在一些实施方式中，所述 K_d 值为 10^{-7} - 10^{-10} M、 10^{-8} - 10^{-10} M 或 10^{-9} - 10^{-10} M。在一些实施方式中，所述抗体或其抗原结合片段与具有 SEQ ID NO: 2 所示的氨基酸序列的蛋白的 K_d 值小于约 10^{-7} M。在一些实施方式中，所述 K_d 值小于约 10^{-7} M、小于约 10^{-8} M、小于约 10^{-9} M 或小于约 10^{-10} M。在一些实施方式中， K_d 值是通过表面等离子共振方法检测的。

[19] 在一些实施方式中，所述抗原结合片段是选自 $F(ab')_2$ 、 Fab' 、 Fab 、 Fv 、 $scFv$ 、 $dsFv$ 或 dAb 。

[20] 在一些实施方式中，所述抗体或其抗原结合片段进一步具有重链恒定区和/或轻链恒定区。在一些实施方式中，重链恒定区源于鼠的 IgG1 或鼠的 IgG2a。在一些实施方式中，重链恒定区源于人的 IgG1。

[21] 在一些实施方式中，所述抗体或其抗原结合片段进一步具有缀合部分。在一些实施方式中，所述缀合部分是治疗剂、放射性同位素、可检测标签、药代动力学修饰部分或纯化部分。所述缀合部分直接连接或者通过连接子连接，所述缀合部分直接连接或者通过连接子连接。

[22] 一个方面，本申请还提供了一种分离的核酸，其编码本申请所述的特异性结合 TRPV6 的抗体或其抗原结合片段。

[23] 在一些实施方式中，所述核酸包含 SEQ ID NO: 31 所示的核酸序列或与 SEQ ID NO: 31 具有至少 90% 序列同一性的核酸序列，和 SEQ ID NO: 32 所示的核酸序列或与 SEQ ID NO: 32 具有至少 90% 序列同一性的核酸序列中的一者或两者。在一些实施方式中，所述核酸包含 SEQ ID NO: 33 所示的核酸序列或与 SEQ ID NO: 33 具有至少 90% 序列同一性的核酸序列，和 SEQ ID NO: 34 所示的核酸序列或与 SEQ ID NO: 34 具有至少 90% 序列同一性的核酸序列中的一者或两者。在一些实施方式中，所述核酸包含 SEQ ID NO: 35 所示的核酸序列或与 SEQ ID NO: 35 具有至少 90% 序列同一性的核

酸序列, 和 SEQ ID NO: 6 所示的核酸序列或与 SEQ ID NO: 6 具有至少 90% 序列同一性的核酸序列中的一者或两者。

[24] 一个方面, 本申请还提供了一种载体, 其包含本申请所述的核酸序列。

[25] 一个方面, 本申请还提供了一种宿主细胞, 其包含本申请所述的载体。

[26] 一个方面, 本申请还提供了一种多特异性抗体, 其包含本申请所述的抗体或其抗原结合片段, 和一个或多个与其他抗原特异性结合的抗体或其抗原结合部分。

[27] 一个方面, 本申请还提供了一种抗体偶联物, 其包含本申请所述的抗体或其抗原结合片段或本申请所述的多特异性抗体。

[28] 一个方面, 本申请还提供了分泌抗 TRPV6 单克隆抗体的杂交瘤细胞株, 所述杂交瘤细胞株为 12CT9.5.1、16CT4.1.1.2 和/或 16CT18.1.1.2, 保藏于中国典型培养物保藏中心, 其中 12CT9.5.1 的保藏编号为 CCTCC NO: C202119, 16CT4.1.1.2 的保藏编号为 CCTCC NO: C202124, 16CT18.1.1.2 的保藏编号为 CCTCC NO: C202125。

[29] 一个方面, 本申请还提供了一种药物组合物, 其包含本申请所述的抗体或其抗原结合片段、本申请所述的分离的核酸、本申请所述的载体、本申请所述的宿主细胞、本申请所述的多特异性抗体或本申请所述的抗体偶联物, 和药学上可接受的载体。

[30] 一个方面, 本申请还提供了一种用于分析和检测来自受试者的样品中的 TRPV6 的试剂, 所述试剂包含一种或多种本申请所述的抗体或其抗原结合片段。在一些实施方式中, 所述试剂用于分析和检测来自受试者的样品中的 TRPV6。

[31] 一个方面, 本申请还提供了一种检测来自受试者的样品中的 TRPV6 的方法, 所述方法包括: (1) 使所述样品与本申请所述的抗体或抗原结合片段接触; (2) 可选地, 移除未结合的抗体或抗体片段; (3) 检测与所述样品中的 TRPV6 结合的抗体或抗体片段。

[32] 在一些实施方式中, 在检测来自受试者的样品中的 TRPV6 的方法的步骤 (1) 中, 本申请所述的抗体或抗原结合片段被固定在基板上。在一些实施方式中, 在检测来自受试者的样品中的 TRPV6 的方法的步骤 (1) 中, 所述样品被固定在基板上。

[33] 在一些实施方式中, 在检测来自受试者的样品中的 TRPV6 的方法的步骤 (3) 中, 还包括使用第二抗体, 可选的, 所述第二抗体能够直接或者间接地结合所述样品

中的 TRPV6, 可选的, 所述第二抗体的表位与本申请所述的抗体或抗原结合片段的表位不同, 可选的, 所述第二抗体的表位与本申请所述的抗体或抗原结合片段的表位相同, 可选的, 所述第二抗体的表位与 TRPV6 的结合不受本申请所述的抗体或抗原结合片段的影响, 可选的, 所述第二抗体的表位与 TRPV6 的结合受本申请所述的抗体或抗原结合片段的影响。

[34] 在一些实施方式中, 在检测来自受试者的样品中的 TRPV6 的方法的步骤 (3) 中, 还包括使用第二抗体, 可选的, 所述第二抗体能够直接或间接地结合本申请所述的抗体或抗原结合片段, 可选的, 所述第二抗体能够结合本申请所述的抗体或抗原结合片段的恒定区部分。

[35] 一些实施方式中, 所述第二抗体与检测分子偶联, 可选的, 所述检测分子包括酶、荧光标记物和生物素。在一些实施方式中, 所述检测分子为酶, 可选的, 所述酶包括辣根过氧化物酶、碱性磷酸酶或其衍生物。在一些实施方式中, 所述检测分子为荧光素, 可选的, 所述荧光素包括 FITC、罗丹明、德克萨斯红、藻红蛋白或 Dylight。在一些实施方式中, 所述检测分子为生物素或其衍生物。

[36] 在一些实施方式中, 检测来自受试者的样品中的 TRPV6 的方法进一步包括对与所述样品中的 TRPV6 结合的抗体进行定量。在一些实施方式中, 所述方法为免疫组织化学 (IHC)、免疫荧光 (IF) 酶联免疫吸附 (ELISA) 化学发光 (CLIA, *chemiluminescent immunoassay*)、免疫比浊 (TIA, *Turbidimetric inhibition immuno assay*) 或免疫印迹 (Western Blot)。在一些实施方式中, 所述方法可以评估所述样品中在细胞表面上表达 TRPV6 的细胞的比例。

[37] 在一些实施方式中, 在检测来自受试者的样品中的 TRPV6 的方法中, 所述受试者为人类。

[38] 一个方面, 本申请还提供了一种判断受试者疾病的形成或形成的风险、评估受试者疾病的进展或预后、或在接受疾病治疗的受试者中预测或监测所述受试者对治疗的应答的方法, 所述方法包括通过本申请所述的检测来自受试者的样品中 TRPV6 的方法, 以检测来自所述受试者的样品中的 TRPV6。

[39] 在一些实施方式中, 判断受试者疾病的形成或形成的风险、评估受试者疾病的进展或预后、或在接受疾病治疗的受试者中预测或监测所述受试者对治疗的应答的

方法包括评估所述样品中在细胞表面上表达 TRPV6 的细胞的比例，若所述比例超过预定的阈值，则认为所述受试者患有所述疾病或者是更可能从治疗中获益，其中所述阈值为 10%。在一些实施方式中，所述治疗是靶向药物治疗。

[40] 在一些实施方式中，本申请所述的疾病为癌症。在一些实施方式中，癌症为乳腺癌、卵巢癌、子宫内膜癌、胆管癌、胃癌、食道癌、肺癌、肠癌、胰腺癌。

[41] 一个方面，本申请还提供了一种试剂盒，所述试剂盒包含本申请所述的抗体或其抗原结合片段，可选的，进一步包括用于检测所述抗体或其抗原结合片段与 TRPV6 结合情况的试剂。

[42] 在一些实施方式中，本申请所述的试剂盒用于诊断受试者疾病的形成或形成的风险、评估受试者疾病的进展或预后、或在接受疾病治疗的受试者中预测或监测所述受试者对治疗的应答。在一些实施方式中，本申请所述的试剂盒用于免疫组化病理诊断。在一些实施方式中，本申请所述的试剂盒用于肿瘤组织免疫组化病理诊断。在一些实施方式中，所述疾病为癌症，在一些实施方式中，癌症为乳腺癌、卵巢癌、子宫内膜癌、胆管癌、胃癌、食道癌、肺癌、肠癌、胰腺癌。

[43] 一个方面，本申请还提供了一种制备特异性结合 TRPV6 的抗体的方法，所述方法包括：(1) 将 SEQ ID NO: 3 所示的氨基酸序列与载体蛋白偶联，以获得 TRPV6 抗原肽；(2) 将通过步骤(1)获得的所述 TRPV6 抗原肽作为免疫原免疫小鼠；(3) 经细胞融合、免疫肽筛选克隆，获得高效分泌特异性结合 TRPV6 的抗体的阳性杂交瘤细胞系；(4) 获得特异性结合 TRPV6 的抗体。

[44] 在一些实施方式中，所述载体蛋白为钥孔虫血蓝素（KLH）蛋白。

[45] 在一些实施方式中，在 SEQ ID NO: 3 所示的氨基酸序列的 N 端增加一个 Cys，并通过自由巯基和所述载体蛋白偶联。

[46] 在一些实施方式中，本申请所述的杂交瘤细胞系为小鼠杂交瘤细胞系 12CT 9.5.1、16CT 18.1.1.2 和 16CT 4.1.1.2。

[47] 一个方面，本申请还提供了本申请所述抗体或其抗原结合片段、本申请所述的分离的核酸、本申请所述的载体、本申请所述的宿主细胞、本申请所述的多特异性

抗体、本申请所述的抗体偶联物以及本申请所述的药物组合物在用于治疗 and/or 预防和/或诊断与 TRPV6 水平相关的疾病的药物中的用途。

[48] 一个方面，本申请还提供了一种治疗、预防或诊断疾病的方法，所述方法包括向有需要的受试者施用本申请所述抗体或其抗原结合片段、本申请所述的多特异性抗体、本申请所述的抗体偶联物以及本申请所述的药物组合物。

附图说明

[49] 附图形成本说明书的一部分，以进一步说明本公开的某些方面。通过参考这些附图中的一个或多个，结合本公开中呈现的具体实施方式的详细描述，可以更好地理解本公开。

[50] 图 1A 示出了 CB-Anti-0001 能够通过免疫细胞化学特异地检测出 TRPV6 质粒转染的 293T 细胞中的 TRPV6 蛋白（左图），而同时非 TRPV6 质粒转染的 293T 细胞中未显示出检测到 TRPV6 蛋白（右图）。图 1B 示出了 CB-Anti-0002 能够通过免疫细胞化学特异地检测出 TRPV6 质粒转染的 293T 细胞中的 TRPV6 蛋白（左图），而同时非 TRPV6 质粒转染的 293T 细胞中未显示出检测到 TRPV6 蛋白（右图）。图 1C 示出了 CB-Anti-0003 能够通过免疫细胞化学特异地检测出 TRPV6 质粒转染的 293T 细胞中的 TRPV6 蛋白（左图），而同时非 TRPV6 质粒转染的 293T 细胞中未显示出检测到 TRPV6 蛋白（右图）。

[51] 图 2A 示出了 CB-Anti-0001 抗体的免疫组织化学检测结果。图 2B 示出了 CB-Anti-0002 抗体的免疫组织化学检测结果。图 2C 示出了 CB-Anti-0003 抗体的免疫组织化学检测结果。

[52] 图 3 显示了 ACC-028 抗体、MABN839 抗体和 CB-Anti-0001 抗体针对人膀胱移行细胞乳头瘤细胞（RT4）的 IHC 对比结果实验。其中附图 3A 为 ACC-028 抗体的 IHC 结果，附图 3B 为 MABN839 抗体的 IHC 结果，附图 3C 为 CB-Anti-0001 抗体的 IHC 结果。可以看到，附图 3C 中细胞膜有清晰、显著的染色效果。

[53] 图 4 显示了在不同条件下保存的抗体的组织染色强度和染色比例均未出现显著改变。其中附图 4A 为在 4℃ 下保存 14 天的 CB-Anti-0001 抗体原液的 IHC 结果，

附图 4B 为在 37℃下保存 14 天的 CB-Anti-0001 抗体原液的 IHC 结果，附图 4C 为在 37℃下保存 14 天的 CB-Anti-0001 抗体工作液的 IHC 结果。

发明详述

[54] 以下描述只为说明本申请的多种实施方式。因此，此处的具体实施方式不应理解为对申请范围的限制。本领域的技术人员基于本发明的宗旨和本文的描述，可很容易地得出多种等同方式和修改，应理解这样的等同实施方式包含在本发明范围内。在本申请中引用的所有文献，包含公开出版物、专利和专利申请都通过引用的方式全文并入本申请。

[55] 除非上下文另外明确指出，否则本文所使用的单数形式“一”、“一个”、“一种”和“该”或“所述”包括复数引用。

[56] 用于本申请的诸如“包括”、“包含”、“含有”、“含有”和“具有”等术语是包括性的或开放式的，并且不排除额外的、未叙述的要素或方法步骤。用于本申请的术语“由……组成”是封闭式的。

[57] 申请人已将杂交瘤细胞株（系）12CT9.5.1、16CT4.1.1.2 和 16CT18.1.1.2 提交至中国典型培养物保藏中心进行保藏。12CT9.5.1 的保藏编号为 CCTCC NO: C202119，16CT4.1.1.2 的保藏编号为 CCTCC NO: C202124，16CT18.1.1.2 的保藏编号为 CCTCC NO: C202125，三杂交瘤细胞株的保藏地址为中国武汉大学，保藏时间为 2021 年 1 月 13 日，保藏单位为中国典型培养物保藏中心。

[58] 本申请的一个方面公开了一种特异性结合 TRPV6 的抗体或其抗原结合片段，其中所述抗体或其抗原结合片段包含如下重链可变区所包括的三个重链互补决定区 HCDR1、HCDR2 和 HCDR3：SEQ ID NO: 25 所示的重链可变区；SEQ ID NO: 27 所示的重链可变区；或 SEQ ID NO: 29 所示的重链可变区。在一些实施方式中，所述抗体或其抗原结合片段包含选自下组的三个重链互补决定区 HCDR1、HCDR2 和 HCDR3：SEQ ID NO: 7 所示的 HCDR1、SEQ ID NO: 8 所示的 HCDR2、SEQ ID NO: 9 所示的 HCDR3；SEQ ID NO: 13 所示的 HCDR1、SEQ ID NO: 14 所示的 HCDR2、SEQ ID NO: 15 所示的 HCDR3；或 SEQ ID NO: 19 所示的 HCDR1、SEQ ID NO: 20 所示的 HCDR2、SEQ ID NO: 21 所示的 HCDR3。在一些实施方式中，本申请的抗体或其抗原结合片段进一步

包含所述抗体或其抗原结合片段进一步包含如下轻链可变区所包括的三个轻链互补决定区 LCDR1、LCDR2 和 LCDR3；SEQ ID NO: 26 所示的轻链可变区；SEQ ID NO: 28 所示的轻链可变区；或 SEQ ID NO: 30 所示的轻链可变区。在一些实施方式中，本申请的抗体或其抗原结合片段进一步包含选自下组的三个轻链互补决定区 LCDR1、LCDR2 和 LCDR3：SEQ ID NO: 10 所示的 LCDR1、SEQ ID NO: 11 所示的 LCDR2 以及 SEQ ID NO: 12 所示的 LCDR3；SEQ ID NO: 16 所示的 LCDR1、SEQ ID NO: 17 所示的 LCDR2 以及 SEQ ID NO: 18 所示的 LCDR3；SEQ ID NO: 22 所示的 LCDR1、SEQ ID NO: 23 所示的 LCDR2 以及 SEQ ID NO: 24 所示的 LCDR3。

[59] 在一些实施方式中，本申请的抗体或其抗原结合片段包含 SEQ ID NO: 7 所示的 HCDR1、SEQ ID NO: 8 所示的 HCDR2、SEQ ID NO: 9 所示的 HCDR3、SEQ ID NO: 10 所示的 LCDR1、SEQ ID NO: 11 所示的 LCDR2 以及 SEQ ID NO: 12 所示的 LCDR3。在一些实施方式中，本申请的抗体或其抗原结合片段包含 SEQ ID NO: 13 所示的 HCDR1、SEQ ID NO: 14 所示的 HCDR2、SEQ ID NO: 15 所示的 HCDR3、SEQ ID NO: 16 所示的 LCDR1、SEQ ID NO: 17 所示的 LCDR2 以及 SEQ ID NO: 18 所示的 LCDR3。在一些实施方式中，本申请的抗体或其抗原结合片段包含 SEQ ID NO: 19 所示的 HCDR1、SEQ ID NO: 20 所示的 HCDR2、SEQ ID NO: 21 所示的 HCDR3、SEQ ID NO: 22 所示的 LCDR1、SEQ ID NO: 23 所示的 LCDR2 以及 SEQ ID NO: 24 所示的 LCDR3。

[60] 在一些实施方式中，本申请的抗体或其抗原结合片段包含选自下组的重链可变区 V_H 和：SEQ ID NO: 25 所示的重链可变区；SEQ ID NO: 27 所示的重链可变区；或 SEQ ID NO: 29 所示的重链可变区。在一些实施方式中，所述抗体或其抗原结合片段进一步包含选自下组的轻链可变区 V_L ：SEQ ID NO: 26 所示的轻链可变区；SEQ ID NO: 28 所示的轻链可变区；或 SEQ ID NO: 30 所示的轻链可变区。

[61] 在一些实施方式中，本申请的抗体或其抗原结合片段包含 SEQ ID NO: 25 所示的重链可变区和 SEQ ID NO: 26 所示的轻链可变区。在一些实施方式中，本申请的抗体或其抗原结合片段包含 SEQ ID NO: 27 所示的重链可变区和 SEQ ID NO: 28 所示的轻链可变区。在一些实施方式中，本申请的抗体或其抗原结合片段包含 SEQ ID NO: 29 所示的重链可变区和 SEQ ID NO: 30 所示的轻链可变区。

[62] 用于本申请的术语“抗体”包括任意免疫球蛋白、单克隆抗体、多价抗体、多特异性抗体或双特异性（双价）抗体。一个天然的完整抗体包含通过二硫链相互结合的两条重链和两条轻链。抗体的每条重链由一个可变区（V_H）以及第一、第二和第三恒定区（分别为 C_{H1}、C_{H2}、C_{H3}）组成，而抗体的每条轻链由一个可变区（V_L）以及一个恒定区（C_L）组成。轻链和重链的可变区负责抗原结合。每条链中的可变区大致细分为3个高变区，称为互补决定区（CDR）（其中轻链 CDR 包括 LCDR1、LCDR2、LCDR3。重链 CDR 包括 HCDR1、HCDR2、HCDR3）。

[63] 用于本申请的抗体的“抗原结合片段”、抗体的“抗原结合部分”等包括任何天然存在的、可酶促获得的、合成的或基因改造的多肽，所述多肽特异性结合抗原形成复合物。抗体的抗原结合片段可以，例如，通过使用任何合适的标准技术从完整的抗体分子衍生出，所述合适的标准技术例如蛋白水解消化或涉及操纵和表达编码抗体可变结构域和任选地恒定结构域的 DNA 的重组基因工程技术。DNA 可以通过化学方法或通过使用分子生物学技术进行测序和操作，从而例如，将一个或多个可变和/或恒定结构域排列成合适的构型，或引入密码子，产生半胱氨酸残基，修饰、添加或删除氨基酸等。抗原结合片段的非限制性实例包括：（i）Fab 片段；（ii）F(ab')₂ 片段；（iii）Fd 片段；（iv）Fv 片段；（v）单链 Fv（scFv）分子；（vi）dAb 片段；和（vii）模拟抗体高变区的氨基酸残基组成的最小识别单位（例如，分离的互补决定区（CDR）如 CDR3 肽）或 FR3-CDR3-FR4 肽。其他改造的分子，如结构域特异性抗体、单域抗体、域缺失抗体、嵌合抗体、CDR 嫁接抗体、双抗体、三抗体、四抗体、微抗体、纳米抗体（例如，单价纳米抗体、二价纳米抗体等）、小模块化免疫药物（SMIP）和鲨鱼变体 IgNAR 结构域也包括在本文所用的“抗原结合片段”表述内。

[64] 本申请中公开的抗体和抗原结合片段的 CDR 边界可通过 Kabat、Chothia 或 Al-Lazikani 命名法命名或识别。（Al-Lazikani, B., Chothia, C., Lesk, A. M., J. Mol. Biol., 273(4), 927 (1997); Chothia, C 等, J Mol Biol. Dec 5;186(3):651-63 (1985); Chothia, C. 和 Lesk, A.M., J.Mol.Biol., 196, 901 (1987); Chothia, C 等, Nature. Dec 21-28;31(6252):877-83 (1989); Kabat E.A.等, National Institutes of Health, Bethesda, Md. (1991)）。在一些实施方式中，根据 Kabat 数据库确定抗体的 CDR 边界。三个 CDR 由被称为框架区（FR，其中重链 FR 包括 HFR1、HFR2、HFR3 和 HFR4，轻链 FR 包括 LFR1、LFR2、LFR3 和 LFR4）的侧面连续部分间隔开，框架区比 CDR 更加高度保守

并形成一个支架支撑超变环。因此， V_H 和 V_L 各包含按以下顺序排布的 3 个 CDR 和 4 个 FR（人氨基酸残基 N 末端到 C 末端）：FR1、CDR1、FR2、CDR2、FR3、CDR3、FR4。重链和轻链的恒定区不参与抗原结合，但表现出多种效应功能。哺乳动物重链分为 α 、 δ 、 ϵ 、 γ 和 μ ，哺乳动物轻链分为 λ 或 κ 。抗体根据其重链恒定区的氨基酸序列，根据是否分别存在 α 、 δ 、 ϵ 、 γ 和 μ ，可分为 5 大类：IgA、IgD、IgE、IgG 和 IgM。几个主要的抗体分类的亚类如 IgG1（ $\gamma 1$ 重链）、IgG2（ $\gamma 2$ 重链）、IgG3（ $\gamma 3$ 重链）、IgG4（ $\gamma 4$ 重链）、IgA1（ $\alpha 1$ 重链）或 IgA2（ $\alpha 2$ 重链）。

[65] 在一些实施方式中，本申请的抗体或其抗原结合片段特异性识别或结合具有 SEQ ID NO: 2 所示的氨基酸序列的蛋白。

[66] SEQ ID NO: 2:

MGPLQGDGGPALGGADVAPRLSPVRVWPRPQAPKEPALHPMGLSLPKEKGLILCLWS
KFCRWFQRRESWAQSRDEQNLLQQKRIWESPLLLAAKDNDVQALNKLKLYEDCKV
HQRGAMGETALHIAALYDNLEAAMVLMEAAPELVFEPMTSELYEGQTALHIAVVNQ
NMNLVRALLARRASVSARAIGTAFRRSPCNLIYFGEHPLSFAACVNSEEIVRLLEHG
ADIRAQDSLGNLTVLHILILQPNKTFACQMYNLLLSYDRHGDHLQPLDLVPNHQGLTPF
KLAGVEGNTVMFQHLMQKRKHTQWTYGPLTSTLYDLTEIDSSGDEQSLELIITTKK
REARQILDQTPVKELVSLKWKRYGRPYFCMLGAIYLLYHICFTMCCIRPLKPRNTNR
TSPRDNTLLQQKLLQEAYMTPKDDIRLVGELVTVIGAIHLLVEVPDIFRMGVTRFFGQ
TILGGPFHVLITYAFMVLVTMVMRLISASGEVVPMSFALVLGWCNVMYFARGFQML
GPFTIMIQKMIFGDLMRFCWLMVAVILGFASAFYIIFQTEDPEELGHFYDYPMALFSTF
ELFLTIIDGPANYNVLDLPFMYSITYAAFAHATLLMLNLLIAMMGDTHWRVAHERDEL
WRAQIVATTVMLEKRLPRCLWPRSGICGREYGLGDRWFLRVEDRQDLNRQRIQRYA
QAFHTRGSEDLDKDSVEKLELGCPFSPHLSLPMPSSVSRSTSRSSANWERLRQGTLLRR
DLRGIINRGLEDGESWEYQI

[67] 在一些实施方式中，本申请的抗体或其抗原结合片段与具有 SEQ ID NO: 2 所示的氨基酸序列的蛋白的 K_d 值为 10^{-7} - 10^{-10} M。在一些实施方式中，所述 K_d 值为 10^{-7} - 10^{-10} M、 10^{-8} - 10^{-10} M 或 10^{-9} - 10^{-10} M。在一些实施方式中，所述抗体或其抗原结合片段与具有 SEQ ID NO: 2 所示的氨基酸序列的蛋白的 K_d 值小于约 10^{-7} M。在一些实施方式中，所述 K_d 值小于约 10^{-7} M、小于约 10^{-8} M、小于约 10^{-9} M 或小于约 10^{-10} M。在一些实施方式中， K_d 值是通过表面等离子共振方法检测的。

[68] 在一些实施方式中，本申请的抗原结合片段是选自 $F(ab')_2$ 、Fab'、Fab、Fv、scFv、dsFv 或 dAb。在一些实施方式中，本申请的抗体或其抗原结合片段进一步具有重链恒定区和/或轻链恒定区。在一些实施方式中，重链恒定区源于鼠的 IgG1 或鼠的 IgG2a。在一些实施方式中，重链恒定区源于人的 IgG1。

[69] 在一些实施方式中，本申请的抗体或其抗原结合片段进一步具有缀合部分。在一些实施方式中，所述缀合部分是治疗剂、放射性同位素、可检测标签、药代动力学修饰部分或纯化部分。所述缀合部分直接连接或者通过连接子连接。

[70] 用于本申请的术语“治疗剂”可以是用于治疗或预防受试者中的疾病的任意药物化合物，包括分子量小于 500 小分子、核苷酸（例如，DNA、质粒 DNA、RNA、siRNA、反义寡核苷酸、适体等）、短肽、蛋白（例如，酶）。

[71] 在一些实施方式中，放射性同位素可以选自下组： ^3H 、 ^{11}C 、 ^{14}C 、 ^{18}F 、 ^{32}P 、 ^{33}P 、 ^{35}S 、 ^{45}Ti 、 ^{47}Sc 、 ^{52}Fe 、 ^{59}Fe 、 ^{62}Cu 、 ^{64}Cu 、 ^{67}Cu 、 ^{67}Ga 、 ^{68}Ga 、 ^{75}Se 、 ^{77}As 、 ^{86}Y 、 ^{89}Sr 、 ^{89}Zr 、 ^{90}Y 、 ^{90}Nb 、 ^{94}Tc 、 ^{99}Tc 、 ^{99}Mo 、 ^{105}Pd 、 ^{105}Rh 、 ^{111}Ag 、 ^{111}In 、 ^{123}I 、 ^{124}I 、 ^{125}I 、 ^{131}I 、 ^{133}Xe 、 ^{142}Pr 、 ^{143}Pr 、 ^{149}Pm 、 ^{153}Sm 、 ^{154}Gd 、 ^{155}Gd 、 ^{156}Gd 、 ^{157}Gd 、 ^{158}Gd 、 ^{161}Tb 、 ^{166}Dy 、 ^{169}Er 、 ^{175}Lu 、 ^{177}Lu 、 ^{186}Re 、 ^{188}Re 、 ^{189}Re 、 ^{194}Ir 、 ^{198}Au 、 ^{199}Au 、 ^{211}At 、 ^{211}Pb 、 ^{212}Bi 、 ^{212}Pb 、 ^{213}Bi 、 ^{223}Ra 和 ^{225}Ac 。

[72] 用于本申请的术语“可检测标签”可以是与本发明的抗体直接或间接地偶联、同时适用于或有助于检测 TRPV6 的水平 of 的任何检测分子。在一些实施方式中，所述检测分子包括酶、荧光标记物和生物素。所述酶包括过氧化酶（例如，辣根过氧化酶）、碱性磷酸酶、 β -半乳糖苷酶、葡萄糖淀粉酶、糖氧化酶、尿素酶、杂环氧化酶（例如，黄嘌呤氧化酶）、苹果酸脱氢酶或它们的衍生物。所述荧光标记物可以是荧光素，可选的，所述荧光素包括异硫氰酸荧光素（FITC）、罗丹明、德克萨斯红、藻红蛋白、绿色荧光蛋白（GFP）、Dylight、Cy3 或 Cy5。

[73] 另一个方面，本申请还公开了一种分离的核酸，其编码本申请所述的特异性结合 TRPV6 的抗体或其抗原结合片段。在一些实施方式中，所述核酸包含 SEQ ID NO: 31 所示的核酸序列或与 SEQ ID NO: 31 具有至少 90% 序列同一性的核酸序列，和 SEQ ID NO: 32 所示的核酸序列或与 SEQ ID NO: 32 具有至少 90% 序列同一性的核酸序列中的一者或两者。在一些实施方式中，所述核酸包含 SEQ ID NO: 33 所示的核酸序列

或与 SEQ ID NO: 33 具有至少 90% 序列同一性的核酸序列, 和 SEQ ID NO: 34 所示的核酸序列或与 SEQ ID NO: 34 具有至少 90% 序列同一性的核酸序列中的一者或两者。在一些实施方式中, 所述核酸包含 SEQ ID NO: 35 所示的核酸序列或与 SEQ ID NO: 35 具有至少 90% 序列同一性的核酸序列, 和 SEQ ID NO: 6 所示的核酸序列或与 SEQ ID NO: 6 具有至少 90% 序列同一性的核酸序列中的一者或两者。

[74] 另一个方面, 本申请还公开了一种载体, 其包含本申请所述的核酸序列。

[75] 另一个方面, 本申请还公开了一种宿主细胞, 其包含本申请所述的载体。

[76] 另一个方面, 本申请还公开了一种多特异性抗体, 其包含本申请所述的抗体或其抗原结合片段, 和一个或多个与其他抗原特异性结合的抗体或其抗原结合部分。

[77] 另一个方面, 本申请还公开了一种抗体偶联物, 其包含本申请所述的抗体或其抗原结合片段或本申请所述的多特异性抗体。

[78] 另一个方面, 本申请还公开了分泌抗 TRPV6 单克隆抗体的杂交瘤细胞株, 所述杂交瘤细胞株为 12CT9.5.1、16CT4.1.1.2 和/或 16CT18.1.1.2, 保藏于中国典型培养物保藏中心, 其中 12CT9.5.1 的保藏编号为 CCTCC NO: C202119, 16CT4.1.1.2 的保藏编号为 CCTCC NO: C202124, 16CT18.1.1.2 的保藏编号为 CCTCC NO: C202125。

[79] 另一个方面, 本申请还公开了一种药物组合物, 其包含本申请所述的抗体或其抗原结合片段、本申请所述的分离的核酸、本申请所述的载体、本申请所述的宿主细胞、本申请所述的多特异性抗体或本申请所述的抗体偶联物, 和药学上可接受的载体。

[80] 用于本申请的术语“药学上可接受的”指的是在合理的医学判断范围内, 其适用于与人和其他动物的细胞接触而没有不适当的毒性、刺激性、过敏反应等, 并且与合理的效益/风险比是相称的。

[81] 用于本申请的术语“药学上可接受的载体”指的是用于向受试者递送本申请提供的抗体或其抗原结合片段、分离的核酸、载体、宿主细胞、多特异性抗体或抗体偶联物的药学上可接受的溶剂、混悬剂或任意其他药学上惰性的载剂, 其不干扰抗体或其抗原结合片段、分离的核酸、载体、宿主细胞、多特异性抗体或抗体偶联物的结构、形态和性质。某些这样的载体能够将抗体或其抗原结合片段、分离的核酸、载体、宿主细胞、多特异性抗体或抗体偶联物配制成例如片剂、丸剂、胶囊剂、液体、凝胶剂、糖

浆剂、浆剂、混悬剂和软锭剂，供受试者口服摄入。某些这样的载体能够将抗体或其抗原结合片段、分离的核酸、载体、宿主细胞、多特异性抗体或抗体偶联物制成注射、输注或局部施用的制剂。

[82] 用于本申请提供的药物组合物中的药学上可接受的载体包括但不限于，例如药学上可接受的液体、凝胶或固体载体、水性载剂（例如，氯化钠注射液、林格氏注射液、等渗右旋糖注射液、无菌水注射液或者右旋糖和乳酸林格氏注射液）、非水性载剂（例如，植物来源的固定油、棉籽油、玉米油、芝麻油或花生油）、抗微生物剂、等渗剂（例如，氯化钠或右旋糖）、缓冲剂（例如，磷酸或柠檬酸缓冲剂）、抗氧剂（例如，硫酸氢钠）、麻醉剂（例如，盐酸普鲁卡因）、混悬剂/分散剂（例如，羧甲基纤维素钠、羟丙基甲基纤维素或聚乙烯吡咯烷酮）、螯合剂（例如，EDTA（乙二胺四乙酸）或EGTA（乙二醇四乙酸））、乳化剂（例如，聚山梨醇酯 80（吐温-80））、稀释剂、佐剂、赋形剂、或无毒性辅助物质、本领域公知的其他成分或其各种组合。适宜的成分可以包括例如填充剂、粘合剂、缓冲剂、防腐剂、润滑剂、调味剂、增稠剂、着色剂或乳化剂。

[83] 在一些实施方式中，药物组合物是注射制剂。注射制剂包括无菌水溶液或分散剂、混悬剂或乳剂。在所有情况下，注射制剂应该是无菌的并且应该是流体以便于注射。注射制剂应在生产和储存条件下保持稳定，并且必须防止细菌和真菌等微生物的污染。载体可以是含有例如水、乙醇、多元醇（例如，甘油、丙二醇和液体聚乙二醇等）及其适宜的混合物和/或植物油的溶剂或分散介质。注射制剂应保持适当的流动性。例如，可以通过使用诸如卵磷脂的包衣、通过使用表面活性剂等保持适当的流动性。可以通过各种抗细菌剂和抗真菌剂实现阻止微生物的作用，例如对羟基苯甲酸酯、氯丁醇、苯酚、山梨酸、硫柳汞等。

[84] 在一些实施方式中，药物组合物是口服制剂。口服制剂包括但不限于胶囊、扁胶囊、丸剂、片剂、锭剂（使用调味基质，通常为蔗糖和阿拉伯胶或黄蓍胶）、粉剂、颗粒剂、或在水性或非水性液体中的溶液剂或混悬剂、或者作为水包油或油包水液体乳剂、或者作为酏剂或糖浆、或者作为软锭剂（使用惰性基质，如明胶和甘油，或者蔗糖和阿拉伯胶）和/或作为漱口剂等。

[85] 在用于口服施用的固体剂型（例如，胶囊、片剂、丸剂、糖衣丸、散剂、颗粒剂等）中，将抗体或其抗原结合片段、分离的核酸、载体、宿主细胞、多特异性抗

体或抗体偶联物的与一种或多种药学上可接受的载体混合，如柠檬酸钠或磷酸氢二钙，和/或下述中的任意一种：（1）填充剂或增量剂，例如，淀粉、乳糖、蔗糖、葡萄糖、甘露醇和/或硅酸；（2）粘合剂，例如，羧甲基纤维素、藻酸盐、明胶、聚乙烯吡咯烷酮、蔗糖和/或阿拉伯胶；（3）保湿剂，例如，甘油；（4）崩解剂，例如，琼脂、碳酸钙、马铃薯或木薯淀粉、海藻酸、某些硅酸盐和碳酸钠；（5）溶液阻滞剂，例如，石蜡；（6）吸收促进剂，例如，季铵化合物；（7）润湿剂，例如，乙酰基醇和单硬脂酸甘油酯；（8）吸收剂，例如，高岭土和膨润土；（9）润滑剂，例如，滑石、硬脂酸钙、硬脂酸镁、固体聚乙二醇、月桂基硫酸钠及其混合物；以及（10）着色剂。

[86] 在用于口服施用的液体剂型中，将抗体或其抗原结合片段、分离的核酸、载体、宿主细胞、多特异性抗体或抗体偶联物与下述中的任意一种混合：药学上可接受的乳剂、微乳、溶液、混悬剂、糖浆剂和酏剂。除了抗体或其抗原结合片段、分离的核酸、载体、宿主细胞、多特异性抗体或抗体偶联物以外，液体剂型可以含有本领域常用的惰性稀释剂，例如，水或其他溶剂、增溶剂和乳化剂，例如，乙醇、异丙醇、碳酸乙酯、乙酸乙酯、苯甲醇、苯甲酸苄酯、异丙醇、1,3-丁二醇、油（特别是，棉籽油、花生油、玉米油、橄榄油、蓖麻油和芝麻油）、甘油、四氢糠醇、聚乙二醇和脱水山梨醇脂肪酸酯及其混合物。除了惰性稀释剂以外，口服组合物还可以包含佐剂，例如，润湿剂、乳化剂和混悬剂、甜味剂、调味剂、着色剂、增香剂和防腐剂。

[87] 在一些实施方式中，药物组合物是口腔喷雾制剂或鼻喷雾制剂。喷雾制剂包括但不限于水性气雾剂、非水性混悬剂、脂质体制剂或固体颗粒制剂等。水性气雾剂通过将药剂的水溶液或混悬液与常规药学上可接受的载体和稳定剂混合制备。载体和稳定剂根据具体药物成分的要求而改变，但是在通常情况下，其包括非离子表面活性剂（吐温或聚乙二醇）、油酸、卵磷脂、氨基酸，例如，甘氨酸、缓冲溶液、盐、糖或糖醇。气雾剂通常由等渗溶液制备，并且能够通过喷雾递送。

[88] 在一些实施方式中，药物组合物可以通过与一种或多种其他药物混合使用。在一些实施方式中，药物组合物包含至少一种其他药物。在一些实施方式中，其他药物是抗肿瘤药、心血管药、抗炎药、抗病毒药、消化系统药、神经系统药、呼吸系统药、免疫系统药、皮肤病药、代谢药等。

[89] 在一些实施方式中，可以通过适宜的途径向有需要的受试者施用药物组合物，包括但不限于口服、注射（例如，静脉内、肌肉内、皮下、皮内、心内、鞘内、胸膜

内、腹膜内注射等)、粘膜(例如,鼻内、口内施用等)、舌下、直肠、经皮、眼内和肺部施用。在一些实施方式中,药物组合物可以静脉内、皮下、口服、肌内或心室内施用。

[90] 另一个方面,本申请还公开了一种用于分析和检测来自受试者的样品中的 TRPV6 的试剂,所述试剂包含一种或多种本申请所述的抗体或其抗原结合片段。在一些实施方式中,所述试剂用于分析和检测来自受试者的样品中的 TRPV6。

[91] 另一个方面,本申请还公开了一种检测来自受试者的样品中的 TRPV6 的方法,所述方法包括:(1)使所述样品与本申请所述的抗体或抗原结合片段接触;(2)可选地,移除未结合的抗体或抗体片段;(3)检测与所述样品中的 TRPV6 结合的抗体或抗体片段。

[92] 用于本申请的术语“检测”可以通过确定和测定分子(例如,多肽、蛋白或核酸分子)的存在或不存在,或是确定和测定分子之间的相互作用(例如,结合、激动或拮抗等作用),例如蛋白质-蛋白质相互作用(例如,抗体和抗原之间的相互作用)、蛋白-核酸相互作用、或核酸-核酸相互作用。在一些实施方案中,“检测”和“测定”包括定量检测和测定。在一些实施方式中,检测是通过确定和测定与抗体直接或间接偶联的检测分子的信号进行的。可以通过本领域技术人员熟悉的方法进行检测。在一些实施方式中,使用免疫组织化学(IHC)、酶联免疫吸附(ELISA)、免疫荧光(IF)、化学发光(CLIA)、免疫比浊(TIA)或免疫印迹(Western Blot)进行检测。

[93] 在一些实施方式中,在检测来自受试者的样品中的 TRPV6 的方法的步骤(1)中,本申请所述的抗体或抗原结合片段被固定在基板上。在一些实施方式中,在检测来自受试者的样品中的 TRPV6 的方法的步骤(1)中,所述样品被固定在基板上。在一些实施方式中,样品是细胞或组织。样品包括但不限于细胞离心制备物、细胞学涂片、核心活检、细针穿刺和/或组织切片(例如,低温恒温器组织切片、石蜡包埋组织切片)。在一些实施方式中,样品包含活细胞。在一些实施方式中,样品包含肿瘤细胞。在一些实施方式中,使用化学固定剂进行所述固定。可以使用交联固定剂(例如醛类,包括例如甲醛、多聚甲醛和戊二醛)制备组织学样品。组织样品可以经甲醛固定并包埋在石蜡中。还可以使用多聚甲醛固定,包埋在温度敏感的低温材料中,并使用液氮速冻。其他类化学固定剂还包括氧化剂和酒精固定剂。还可以通过物理方法进行固定。

[94] 在一些实施方式中，在检测来自受试者的样品中的 TRPV6 的方法的步骤 (3) 中，还包括使用第二抗体，可选的，所述第二抗体能够直接或者间接地结合所述样品中的 TRPV6，可选的，所述第二抗体的表位与本申请所述的抗体或抗原结合片段的表位不同，可选的，所述第二抗体的表位与本申请所述的抗体或抗原结合片段的表位相同，可选的，所述第二抗体的表位与 TRPV6 的结合不受本申请所述的抗体或抗原结合片段的影响，可选的，所述第二抗体的表位与 TRPV6 的结合受本申请所述的抗体或抗原结合片段的影响。

[95] 用于本申请的术语“表位”是指与抗体分子可变区中的特定抗原结合位点（称为互补位）相互作用的抗原决定簇。单一抗原可以具有超过一个表位。因此，不同抗体可以结合至一个抗原上的不同区域并且可以具有不同的生物作用。表位可以是构象表位或线性表位。构象表位是通过空间并列的来自线性多肽链不同区段的氨基酸产生的。线性表位是由多肽链中的相邻氨基酸残基产生的表位。在某些情况中，表位可以包含抗原上的糖、磷酸基或磺酰基部分。

[96] 在一些实施方式中，在检测来自受试者的样品中的 TRPV6 的方法的步骤 (3) 中，还包括使用第二抗体，可选的，所述第二抗体能够直接或间接地结合本申请所述的抗体或抗原结合片段，可选的，所述第二抗体能够结合本申请所述的抗体或抗原结合片段的恒定区部分。本文所使用的“第二抗体”旨在于更好地检测抗 TRPV6 抗体，第二抗体一般可以通过商购获得。一些实施方式中，本申请所述的第二抗体与检测分子偶联，可选的，所述检测分子包括酶、荧光标记物和生物素。在一些实施方式中，所述检测分子为酶，可选的，所述酶包括过氧化酶（例如，辣根过氧化酶）、碱性磷酸酶、 β -半乳糖苷酶、葡糖淀粉酶、糖氧化酶、尿素酶、杂环氧化酶（例如，黄嘌呤氧化酶）、苹果酸脱氢酶或其衍生物。在一些实施方式中，所述检测分子为荧光素，可选的，所述荧光素包括 FITC、罗丹明、德克萨斯红、藻红蛋白、GFP、Cy3、Cy5 或 Dylight。在一些实施方式中，所述检测分子为生物素或其衍生物。

[97] 在一些实施方式中，检测来自受试者的样品中的 TRPV6 的方法进一步包括对与所述样品中的 TRPV6 结合的抗体进行定量。在一些实施方式中，所述方法为免疫组织化学（IHC）、酶联免疫吸附（ELISA）、免疫荧光（IF）、化学发光（CLIA）、免疫比浊（TIA）或免疫印迹（Western Blot）。在一些实施方式中，所述方法可以评估所述样品中在细胞表面上表达 TRPV6 的细胞的比例。

[98] 在一些实施方式中，在检测来自受试者的样品中的 TRPV6 的方法中，所述受试者为人类。

[99] 另一个方面，本申请还公开了一种判断受试者疾病的形成或形成的风险、评估受试者疾病的进展或预后、或在接受疾病治疗的受试者中预测或监测所述受试者对治疗的应答的方法，所述方法包括通过本申请所述的检测来自受试者的样品中 TRPV6 的方法，以检测来自所述受试者的样品中的 TRPV6。

[100] 在一些实施方式中，判断受试者疾病的形成或形成的风险、评估受试者疾病的进展或预后、或在接受疾病治疗的受试者中预测或监测所述受试者对治疗的应答的方法包括评估所述样品中在细胞表面上表达 TRPV6 的细胞的比例，若所述比例超过预定的阈值，则认为所述受试者患有所述疾病或者是更可能从治疗中获益，其中所述阈值为 10%。在一些实施方式中，所述治疗是靶向药物治疗。

[101] 用于本申请的术语“获益”、“受益”或“有益”指任何期望的效果，包括但不限于：(1) 在某种程度上抑制（如减少、减慢或完全停止）疾病的发展，包括减慢速度和完全停滞；(2) 减少疾病发作和/或症状的数量；(3) 缩小病变尺寸；(4) 抑制疾病细胞浸润到邻近的周围器官和/或组织中；(5) 抑制疾病传播；(6) 在一定程度上缓解与该疾病有关的一种或多种症状；(7) 治疗后无病表现的时间增加；(8) 自身免疫反应降低，可能但不一定导致疾病病变消退或消融，例如无进展生存期；(9) 增加总生存率；(10) 应答率更高；和/或 (11) 治疗后给定时间点死亡率降低。

[102] 在一些实施方式中，预测或监测所述受试者对治疗的应答涉及评估受试者的肿瘤是否减轻或加重。在一些实施方式中，预测或监测所述受试者对治疗的应答可能涉及评估受试者在接受治疗（例如，用特定的药物进行治疗）后是否好转和/或好转的可能性。本申请的预测或监督的方法可以被用于在临床上做出治疗决定。在施用治疗方案（例如，给定的治疗方案，包括例如给定的治疗药物或组合的施用、手术干预等）后，本申请的预测或监督的方法在评价特定受试者能否长期存活的可能性上是有价值的工具。

[103] 在一些实施方式中，本申请所述的疾病为癌症。在一些实施方式中，癌症为乳腺癌、卵巢癌、子宫内膜癌、胆管癌、胃癌、食道癌、肺癌、肠癌、胰腺癌。在一些实施方式中，癌症为 HER2⁺乳腺癌、三阴乳腺癌或结直肠癌。

[104] 另一个方面，本申请还公开了一种试剂盒，所述试剂盒包含本申请所述的抗体或其抗原结合片段，可选的，进一步包括用于检测所述抗体或其抗原结合片段与 TRPV6 结合情况的试剂。

[105] 在一些实施方式中，本申请所述的试剂盒用于诊断受试者疾病的形成或形成的风险、评估受试者疾病的进展或预后、或在接受疾病治疗的受试者中预测或监测所述受试者对治疗的应答。在一些实施方式中，本申请所述的试剂盒用于免疫组化病理诊断。在一些实施方式中，本申请所述的试剂盒用于肿瘤组织免疫组化病理诊断。在一些实施方式中，所述疾病为癌症，在一些实施方式中，癌症为乳腺癌、卵巢癌、子宫内膜癌、胆管癌、胃癌、食道癌、肺癌、肠癌、胰腺癌。在又一些实施方式中，所述癌症是 HER2+乳腺癌、三阴乳腺癌或结直肠癌。

[106] 另一个方面，本申请还公开了一种制备特异性结合 TRPV6 的抗体的方法，所述方法包括：(1) 将 SEQ ID NO: 3 所示的氨基酸序列与载体蛋白偶联，以获得 TRPV6 抗原肽；(2) 将通过步骤(1)获得的所述 TRPV6 抗原肽作为免疫原免疫小鼠；(3) 经细胞融合、免疫肽筛选克隆，获得高效分泌特异性结合 TRPV6 的抗体的阳性杂交瘤细胞系；(4) 获得特异性结合 TRPV6 的抗体。

[107] 在一些实施方式中，所述载体蛋白为钥孔虫碱血蓝素 (KLH) 蛋白。

[108] 在一些实施方式中，在 SEQ ID NO: 3 所示的氨基酸序列的 N 端增加一个 Cys，并通过自由巯基和所述载体蛋白偶联。

[109] SEQ ID NO: 3: PLKPRTNNRTSPRDNTLLQKLLQEAYMTPK。

[110] 在一些实施方式中，本申请所述的杂交瘤细胞系为小鼠杂交瘤细胞系 12CT9.5.1、16CT18.1.1 或 16CT4.1.1.2。其中，细胞系 12CT9.5.1 产生的抗体包括 CB-Anti-0001 抗体，细胞系 16CT4.1.1.2 产生的抗体包括 CB-Anti-0002 抗体，细胞系 16CT18.1.1 产生的抗体包括 CB-Anti-0003 抗体。

[111] 另一个方面，本申请还公开了本申请所述抗体或其抗原结合片段、本申请所述的多特异性抗体、本申请所述的抗体偶联物以及本申请所述的药物组合物在用于治疗/或预防和/或诊断与 TRPV6 相关的疾病的药物中的用途。

[112] 另一个方面，本申请还公开了一种治疗、预防或诊断疾病的方法，所述方法包括向有需要的受试者施用本申请所述抗体或其抗原结合片段、本申请所述的多特异性抗体、本申请所述的抗体偶联物以及本申请所述的药物组合物。

实施例

[113] 以下实施例旨在更好地说明本发明，且不应理解为限制本发明的范围。所有下述的特定组合物、材料和方法，其整体或部分，都在本发明的范围内。这些特定的组合物、材料和方法不是为了限制本发明，而只是为说明特定的实施方式在本发明的范围内。本领域技术人员可不添加创造性及不偏离本发明范围而开发出等同的组合物、材料和方法。应理解，在对本发明的方法作出的多种改动可以仍然包含在本发明范围内。发明人意在将这样的变动包含在本发明的范围内。

实施例 1 抗原多肽的合成和重组抗原的制备

[114] 1. 抗原多肽选择

[115] 针对 Uniprot 及 Genbank 中登录号为 Q9H1D0 和 GI: 1918017293 的蛋白质序列（如 SEQ ID NO: 2 所示）进行序列和二级结构分析。该 TRPV6 蛋白全长为 765 个氨基酸，其分子量约为 87kDa 左右。通过在线服务器 <http://www.cbs.dtu.dk/services/NetSurfP/> 预测该蛋白的二级结构和表面可及性（Surface Accessibility）参数，并通过针对其抗原性指数的分析结果，选择氨基酸序列 IFQTEDPEELGHF（SEQ ID NO: 4）、DGPANYNVDLPF（SEQ ID NO: 5）或 PLKPRTNNRTSPRDNTLLQKLLQEAYMTPK（SEQ ID NO: 3）作为抗原并进行化学合成。为便于偶联，在该多肽的氨基端添加了一个半胱氨酸，用于提供巯基。

[116] 2. 多肽的偶联及纯化

[117] 选择 Thermo Scientific 的马来酰胺活化的钥孔虫碱血蓝素蛋白试剂盒，按照试剂盒提供的流程操作。

[118] 对于待偶联的多肽，首先以 Ellman 试剂检测多肽中自由巯基：在 96 孔板中加入 100 μ L Ellman 试剂储备液，再加入 10 μ L 多肽溶液，用 Nano Drop 分光光度计在 $\lambda=412$ nm 下测其紫外吸收值，如果 OD 值 >0.15 ，则进行下一步；若 OD 值 <0.15 且 >0.05 ，则补加多肽，直至达到要求；若 OD 值 <0.05 ，则返回多肽合成步骤重新质控。

[119] 开始偶联时，在每个 mcKLH 包装中加入 200 μ L 去离子水，配制成 10 mg/mL 的 KLH 溶液，在 500 μ L 的 Imject EDC 偶联缓冲液中溶解 2mg 半抗原，将 500 μ L 多肽溶液加入到 200 μ L 的载体蛋白溶液中。将 1 mL 去离子水加入到一个包装的 EDC (10 mg) 中，缓慢摇动至完全溶解，取 50 μ L 加入到 mcKLH 多肽溶液中，反应 2 小时后，经脱盐柱处理除去未偶联的交联剂和盐类。

实施例 2 杂交瘤细胞系的建立

[120] 1. 免疫

[121] 将实施例 1 中交联的多肽用弗氏完全佐剂乳化，免疫 4~6 周龄雌性 Balb/c 小鼠（购自北京维通利华实验动物技术有限公司），腹部皮下注射，每只小鼠 6 点，剂量为 60 μ g/只。每 14 天加强免疫一次，抗原使用弗氏非完全佐剂乳化，剂量为 30 μ g/只。第 3 次加强免疫后 7 天，以间接 ELISA（波长 450nm）检测小鼠血清中抗免疫原的多抗效价，效价最高的小鼠以尾静脉注射冲击免疫，抗原用生理盐水混匀，剂量为 50 μ g/只。

[122] 2. 细胞融合

[123] 制备免疫达标的小鼠脾细胞悬液，与小鼠骨髓瘤细胞 F0 以 5:1 比例混合，离心 1500rpm，5 分钟。弃上清后，离心管放入 37°C 水浴中，在 1 分钟内缓慢加入 1 mL 的 PEG1500（Roche 公司），并搅动细胞。在温水中静置 1 分钟后，加入 10 mL 无血清的 IMDM（Sigma 公司），混匀，离心 1000rpm，5 分钟。弃上清后，加入 10 mL 血清（PAA 公司），小心的将细胞吹打起来，并加入 5 mL 混合 10XHAT（Sigma 公司）的胸腺细胞，混匀。再加入 25 mL 含有 2.1% 硝基纤维素（Sigma 公司）的半固体培养基，充分混匀，然后均匀的倒入 20 个细胞培养皿中。将细胞培养皿放入到湿盒中，放入 37°C、5% CO₂ 培养箱中培养。

[124] 3. 克隆化及 ELISA 筛选阳性杂交瘤细胞

[125] 融合后 7 天，克隆细胞团大小密度适中，在解剖镜下，吸取圆、实、大的克隆团，打入事先准备好培养基的 96 孔培养板中，放入 37°C、5% CO₂ 培养箱中培养。

[126] 3 天后，细胞量大约占底面积 2/3，取 100 μ L 上清，用免疫原和合成多肽分别进行 ELISA 筛选。阳性克隆完全换液，加入 200 μ L 的含饲养细胞和 1% HT（Sigma 公司）的完全培养基。两天后进行第二次 ELISA 筛选，阳性克隆转入事先准备好培养

基（含饲养细胞和 HT）的 24 孔板培养。五天后取 100 μ L 上清，进行第三次 ELISA 筛选，筛选得到 12CT 9.5.1、16CT 18.1.1.2 和 16CT 4.1.1.2 三株效价较高的阳性克隆，并逐次转入 6 孔板和细胞培养瓶扩大培养并冻存。

实施例 3 腹水诱生法制备单克隆抗体

[127] 1. 腹水制备

[128] 对数生长期细胞用无血清培养基洗涤并悬起，计数 $\sim 5 \times 10^5/\text{mL}$ ，1 mL 悬浮的细胞腹腔注射事先用石蜡油致敏的小鼠。7 天后开始收集腹水。取出的腹水于 4°C 下离心 4000rpm，10 分钟。小心吸出中间的腹水收集于离心管中，4°C 或 -20°C 保存。

[129] 2. 单克隆抗体的纯化

[130] 用 Protein G（GE 公司）亲和层析法按说明书从腹水中纯化抗体。SDS-PAGE 胶鉴定纯度，Bradford 法测定浓度。纯化的抗体保存于 -20°C。

实施例 4 单克隆抗体特性鉴定

[131] 1. 亚型鉴定

[132] 用 100 mL MPBS (pH 7.4) 稀释包被羊抗鼠 IgG 至 0.5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ ，每孔加 100 μL ，4°C，过夜。倾空液体，用含 0.05% Tween 的 PBS 洗 3 次，每孔加入 200 μL 封闭液（含 2% BSA 和 3% 蔗糖的 PBS），37°C 下孵育 1 小时，倾空液体，用 PBST 清洗 3 次。每孔加入 0.1 mL 杂交瘤上清，37°C 下孵育 1 小时，倾空液体，用 PBST 清洗 3 次。用封闭液 1:1000 稀释 HRP 标记的羊抗鼠 (κ , λ) 抗体或 1:2000 稀释 HRP 标记的羊抗鼠 (IgM、IgG1、IgG2a、IgG2b、IgG3、IgA) 抗体，0.1 mL 每孔分别加入适当的孔中，37°C 下孵育 1 小时，倾空液体，用 PBST 清洗 3 次。每孔加 50 μL 含 0.15% ABTS 和 0.03% H_2O_2 的柠檬酸缓冲液 (pH 4.0) 进行显色反应，10-20 分钟内测定 405 nm 波长下的 OD 值。结果显示，获得的 CB-Anti-0001 和 CB-Anti-0002 抗体为 IgG1 型鼠源单克隆抗体，CB-Anti-0003 抗体为 IgG2a 型鼠源单克隆抗体。

[133] 2. 亲和常数测定

[134] 首先，在 SPR 芯片上固定获得的抗 TRPV6 抗体，之后用 1 $\times$ PBST 作为稀释液，将免疫肽稀释至 11.52 nM，之后以 1.3 倍稀释，最后一个浓度为 4.04 nM，共

计 5 个浓度梯度。利用 SPR 仪器进行亲和力检测，经仪器自动分析，计算出 CB-Anti-0001 的亲合常数为 5.19×10^{-10} 。

[135] 3. 单抗反应特异性和应用效果

[136] 选择转染 TRPV6 蛋白的 293T 细胞，用免疫细胞化学的方法检测本发明的单克隆抗体的识别特异性，免疫细胞化学实验过程如下：在 293T 细胞中转染 TRPV6 质粒，转染后的细胞铺在含爬片的 24 孔板中，在 IMDM+10% FBS 培养基中培养细胞 72 小时，去除上清，PBS 清洗一遍，加入甲醇固定 30 秒，PBS 清洗两遍。用抗体稀释液按照适当稀释比配制抗 TRPV6 抗体工作液，去除 24 孔板中的 PBS，加入抗体工作液，4 度孵育过夜，PBS 清洗三遍，滴加二抗（Elivision™ plus Polymer HRP (Mouse/Rabbit) IHC Kit，购自福州迈新生物技术开发有限公司，产品编号 KIT-9903），室温孵育 15-20 分钟，PBS 冲洗 3X3 分钟（即，冲洗 3 次，每次持续 3 分钟），甩去 PBS，用新鲜配置的 DAB 显色液显色 3 分钟。苏木素复染 25 秒，PBS 返蓝 30 秒。按照 75%、95%、100%、100% 的酒精梯度依次脱水，最后二甲苯透明 3 分钟，中性树胶封片。

[137] 如图 1A-1C 所示，CB-Anti-0001 抗体、CB-Anti-0002 抗体和 CB-Anti-0003 抗体分别能够在转染了 TRPV6 质粒的 293T 细胞中通过免疫细胞化学特异地检测出 TRPV6 蛋白，而同时未转染 TRPV6 质粒的 293T 细胞中未显示出检测到 TRPV6 蛋白。该结果表明获得的抗 TRPV6 抗体能特异地识别 TRPV6 蛋白，即具有识别特性。

实施例 5 抗体的可变区序列测定

[138] 取培养的杂交瘤细胞系 1×10^6 ，离心取上清，将细胞沉淀委托苏州金唯智生物科技有限公司进行抗体重链和轻链可变区序列测定，如下示出示例性的抗体重链可变区序列和抗体轻链可变区序列。

表 1 抗体 CDR 氨基酸序列

抗体		CDR1	CDR2	CDR3
CB-Anti-0001	HCDR	SEQ ID NO: 7	SEQ ID NO: 8	SEQ ID NO: 9
		GYTFTSYW	IDPSDGYT	GWAGDF
	LCDR	SEQ ID NO: 10	SEQ ID NO: 11	SEQ ID NO: 12
		QSLDSDGKTY	LVS	WQGTDFPQT
	HCDR	SEQ ID NO: 13	SEQ ID NO: 14	SEQ ID NO: 15

CB-Anti-0002		GFTFSYYW	IRLKSHNYAT	ARLAYDGERYYY ALDY
	LCDR	SEQ ID NO: 16	SEQ ID NO: 17	SEQ ID NO: 18
		QSLLYSNNQKNY	WAS	QQYYSYPFT
CB-Anti-0003	HCDR	SEQ ID NO: 19	SEQ ID NO: 20	SEQ ID NO: 21
		AFTFSHYW	IRLKSYNYAT	TRLGYFGSLYYAM DY
	LCDR	SEQ ID NO: 22	SEQ ID NO: 23	SEQ ID NO: 24
		QSLLYSTNQKNY	WAS	QQYYSYPWT

表 2 抗体可变区氨基酸序列

抗体 (杂交瘤细胞株)	重链可变区	轻链可变区
CB-Anti-0001 抗体 (12CT9.5.1)	SEQ ID NO: 25	SEQ ID NO: 26
	QVQVQQPGAELVKPGTSVKLS CKASGYTFTSYWMHWVKQRP GQGLEWIGEIDPSDGYTNYNQ KFRGKATLSVDKSSTTAYMQL SSLTSEDSAVYYCGWAGDFWG QGTTTLTVSS	DVVLTSQPLTSLVTIGQPASISC KSSQSLLDSDGKTYLNWLLQR PGQSPKRLIYLVSKLDSAAPDR FAGSGSGTDFTLKISRVEAEDL GIYYCWQGTHFPQTFGGGTKL EIK
CB-Anti-0002 (16CT4.1.1.2)	SEQ ID NO: 27	SEQ ID NO: 28
	EVKLEESGGGLVQPGGSMKLS CVASGFTFSYYWMNWVRQSPE KGLEWVAEIRLKSHNYATHYA ESVKGRFTISRDDSKSSVYLQM NNLRSEDGTGIYYCARLAYDGE RYYYALDYWGQGTSTVTVSS	DIVMSQSPSSLAVSVGEKFTMS CKSSQSLLYSNNQKNYLAWY QQKPGQSPKLLIYWASTRESG VPDRFTGSGYGTDFLTITSSVK AEDLAVYYCQQYYSYPFTFGS GTKLEIK
CB-Anti-0003 (16CT18.1.1)	SEQ ID NO: 29	SEQ ID NO: 30
	EVMLEESGGGLVQPGGSMKLS CVASAFTHSHYWMNWVRQSPE KGLEWVAEIRLKSYNYATHYA ESVKGRFTISRDDSKSSVYLQM	DIVMSQSPSSLAVSVGEKVTM SCKSSQSLLYSTNQKNYLAWY QQKPGQSPKLLIYWASTESGVP DRFTGSGSGTDFTLTITSSVKA

	NSLRPEDTGIYYCTRLGYFGSL YYAMDYWGQGTSVTVSS	DLAVYYCQYYSPWTFGGG TKLEIK
--	---	------------------------------

表 3 编码抗体可变区的核酸序列

	重链可变区	轻链可变区
CB-0001 抗体	SEQ ID NO: 31 CAGGTCCAAGTGCAGCAGCCTGG GGCTGAGCTTGTGAAGCCTGGGA CTTCAGTGAAGCTGICCTGCAAG GCTTCTGGCTACACCTTCACCAGC TACTGGATGCACTGGGTGAAGCA GAGGCCTGGACAAGGCCTTGAGT GGATCGGAGAGATTGATCCTTCT GATGGTTATACTAACTACAATCA AAAGTTCAGGGGCAAGGCCACAT TGTCTGTAGACAAATCCTCCACCA CAGCCTACATGCAGCTCAGCAGC CTGACATCTGAGGACTCTGCGGT CTATTACTGTGGGTGGGCGGGGG ACTTCTGGGGCCAAGGCACCACT CTCACAGTCTCCTCA	SEQ ID NO: 32 GATGTTGTGCTGACCCAGAGTCCAC TCACTTTGTCGGTTACCATTGGACA ACCAGCCTCCATCTCTTGCAAGTCA AGTCAGAGCCTCTTAGATAGTGATG GAAAGACATATTTGAATTGGTTGTT ACAGAGGCCAGGCCAGTCTCCAAAG CGCCTAATCTATCTGGTGTCTAAGCT GGACTCTGCAGCCCCTGACAGGTTC GCTGGCAGTGGATCAGGGACAGATT TCACACTGAAAATCAGCAGAGTGGA GGCTGAAGATTGGGAATTTACTAT TGCTGGCAAGGTACACATTTTCCTC AGACGTTTCGGTGGAGGCACCAAGCT GGAAATCAAA
CB-0002 抗体	SEQ ID NO: 33 GAAGTGAAGCTTGAGGAGTCTGG AGGAGGCTTGGTGCAACCTGGAG GATCCATGAACTCTCCTGTGTTG CCTCTGGATTCACTTTCAGTTACT ACTGGATGAACTGGGTCCGCCAG TCTCCAGAGAAGGGGCTTGAGTG GGTTGCTGAAATTAGATTGAAAT CTCATAATTATGCAACACATTATG CGGAGTCTGTGAAAGGGAGGTTC ACCATCTCAAGAGATGATTCCAA	SEQ ID NO: 34 GACATTGTGATGTCACAGTCTCCAT CCTCCCTAGCTGTGTGTCAGTTGGAGA GAAGTTTACTATGAGCTGCAAGTCC AGTCAGAGCCTTTTATATAGTAACA ATCAAAAGAACTACTTGGCCTGGTA CCAGCAGAAACCAGGGCAGTCTCCT AACTGCTGATTTACTGGGCATCCA CTAGGGAATCTGGGGTCCCTGATCG CTTCACAGGCAGTGGATATGGGACA GATTTCACTCTCACCATCAGCAGTG

	AAGTAGTGTCTACCTGCAAATGA ACAACTTAAGATCTGAAGACACT GGCATTATTACTGTGCCAGGCTT GCTTACGACGGGGAGCGGTATTA CTATGCTCTGGACTACTGGGGTCA AGGAACCTCAGTCACCGTCTCCTC A	TGAAGGCTGAAGACCTGGCAGTTTA TTACTGTCAGCAATATTATAGCTATC CATTACGTTTCGGCTCGGGGACAAA GTTGGAAATAAAA
CB- Anti- 0003	SEQ ID NO: 35 GAAGTGATGCTTGAGGAGTCTGG AGGAGGCTTAGTGCAACCTGGAG GATCCATGAAGCTCTCCTGTGTTG CCTCTGCATTCACTTTTCAGTCACT ACTGGATGAACTGGGTCCGCCAG TCTCCAGAGAAGGGGCTTGAGTG GGTTGCTGAAATTAGATTGAAAT CTTATAATTATGCAACACATTATG CGGAGTCTGTGAAAGGGAGGTTC ACCATCTCCAGAGATGATTCCAA GAGTAGTGTCTACCTGCAAATGA ACAGCCTAAGGCCTGAAGACACT GGCATTATTACTGTACCAGGCTT GGTTACTTCGGTAGCCTCTACTAT GCTATGGACTACTGGGGTCAAGG AACCTCAGTCACCGTCTCCTCA	SEQ ID NO: 6 GACATTGTGATGTCACAGTCTCCAT CCTCCCTAGCTGTGTCAGTTGGAGA GAAGGTTACTATGAGCTGCAAGTCC AGTCAGAGCCTTTTATATAGTACCA ATCAAAAGAACTACTTGGCCTGGTC CCAGCAGAAACCAGGGCAGTCTCCT AAACTGCTGATTTACTGGGCATCCA CTAGGGAATCTGGGGTCCCTGATCG CTTCACAGGCAGTGGATCTGGGACA GATTTCACTCTCACCATCAGCAGTG TGAAGGCTGAAGACCTGGCAGTTTA TTACTGTCAGCAATATTATAGCTATC CGTGGACGTTTCGGTGGAGGCACCAA GCTGGAAATCAAA

实施例 6 组织切片染色和鉴定

[139] 1. 切片制备过程

[140] 组织蜡块在修片后进行连续切片，厚度定为 5 μm ，将连续切片在 45°C 的温水中展开，用正电子防脱载玻片裱贴切片，室温风干过夜后，放入 -20°C 中长期保存。

[141] 2. IHC 染色及分析

[142] 常规二甲苯脱蜡 2 次，每次 15 分钟，100%、100%、95%、75%梯度乙醇中水化，每次 3 分钟，最后自来水冲洗。进行抗原修复，然后将切片放入湿盒中，PBS 冲洗 3X3 分钟。滴加 3% H₂O₂ 孵育 10 分钟，PBS 冲洗 3X3 分钟。甩去 PBS，滴加封闭液（动物非免疫血清）室温孵育 60 分钟。甩干切片，滴加适当比例稀释的一抗，4℃ 下孵育过夜，PBS 冲洗 3X3 分钟，滴加二抗（Elivision™ plus Polyer HRP (Mouse/Rabbit) IHC Kit，购自福州迈新生物技术开发有限公司，产品编号 KIT-9903），室温孵育 15-20 分钟，PBS 冲洗 3X3 分钟，甩去 PBS，用新鲜配置的 DAB 显色液显色 3 分钟。苏木素复染 25 秒，PBS 返蓝 30 秒。按照 75%、95%、100%、100%的酒精梯度依次脱水，最后二甲苯透明 3 分钟，中性树胶封片。

[143] 3. 数据统计

[144] 如图 2A-2C 所示，CB-Anti-0001 抗体、CB-Anti-0002 抗体和 CB-Anti-0003 抗体分别能够通过免疫组织化学检测组织切片中的 TRPV6 蛋白。

[145] 此外，发明人还通过采用 H-score 计分方法记录肿瘤细胞细胞膜染色情况，将 H-score 为 60 分以上记录为强染色，H-score 为 1-60 分记录为弱染色，强染色以及弱染色合计为阳性；H-score 为 0 记为阴性。分别统计 IHC 检测的各肿瘤组织中 TRPV6 的水平，并于 TCGA 数据库中 TRPV6 mRNA 水平进行对比验证，以评估抗体特异性，记录信息列于表 4。结果显示，使用本发明的抗体检测 TRPV6 蛋白水平，阳性率较高（特别是强染色比例较高）的癌种对应地在肿瘤基因组图谱数据库（the Cancer Genome Atlas Program，即 TCGA 数据库）中统计的 TRPV6 mRNA 水平也较高（例如，TPM 大于 1）。由此可见，使用本发明的抗体能够准确的评估细胞表面表达 TRPV6 的情况，进而判断被检测的样品是否为表达 TRPV6 的癌细胞。

表 4 IHC 检测的肿瘤组织中 TRPV6 的水平

组织类型	样本数	强染色	弱染色	阳性	阴性	TCGA 数据库中 TRPV6 mRNA 表达水平 (TPM, Transcript per milliom)
胆管癌	20	10%	30%	40%	60%	5
食道癌	20	0%	0%	0%	100%	0.35
胃癌	20	0%	10%	10%	90%	0.2
Hcr2+乳腺癌	90	32%	21%	53%	47%	26
三阴乳腺癌	100	48%	26%	74%	26%	9
卵巢癌	100	36%	35%	71%	29%	2
肺腺癌	30	6%	21%	27%	73%	0.1

实施例 7 IHC 对比实验

[146] 将市售抗体“Anti-Human TRPV6 (extracellular) Antibody”（货号 ACC-028，购于 Alomone Labs，RRID: AB_2756545，本文简称“ACC-028 抗体”）、抗体“Anti-TrpV6 Antibody, clone 4A5.1”（货号 MABN839，购于 Sigma-Aldrich 公司，本文简称“MABN839 抗体”）和 CB-Anti-0001 抗体进行对比实验。

[147] 使用与实施例 6 第 2 部分相同的步骤，获取 CDX 肿瘤模型 RT4（人膀胱移行细胞乳头瘤细胞）的切片。滴加 ACC-028 抗体（稀释比例为 1: 50）、MABN839 抗体（稀释比例为 1: 50）和 CB-Anti-0001 抗体（稀释比例为 1: 2000），4℃ 下孵育过夜，PBS 冲洗 3X3 分钟，滴加二抗（Elivision™ plus Polyer HRP (Mouse/Rabbit) IHC Kit，购自福州迈新生物技术开发有限公司，产品编号 KIT-9903），室温孵育 15-20 分钟，PBS 冲洗 3X3 分钟，甩去 PBS，用新鲜配置的 DAB 显色液显色 3 分钟。苏木素复染 25 秒，PBS 返蓝 30 秒。按照 75%、95%、100%、100% 的酒精梯度依次脱水，最后二甲苯透明 3 分钟，中性树胶封片，读取染色结果。结果表明，ACC-028 抗体检测灵敏度偏低，仅在少量 RT4 细胞膜上检测到特异性信号（参见附图 3A）；MABN839 抗体特异性较差，在所有组织细胞和间质细胞都检测到信号（参见附图 3B）；相比之下，CB-Anti-0001 抗体检测信号定位准确清晰、特异性好、灵敏度高（参见附图 3C），是理想的 IHC 应用抗体。

实施例 8 稳定性实验

[148] 采用加速破坏方法对 CB-Anti-0001 抗体进行稳定性验证，即分别（1）将抗体原液在 4℃ 下保存 14 天；（2）将抗体原液放置在 37℃ 恒温孵育箱中孵育 14 天；以及（3）将抗体工作液（使用中杉金桥 ZLI-9028 抗体稀释液以 1:2000 的比例稀释抗体原液后获得该抗体工作液）放置在 37℃ 恒温孵育箱中孵育 14 天。在相同实验条件下，使用前述三类抗体液进行 IHC 检测，以评估三种处理方式下抗体的稳定性。

[149] 经检测，在不同条件下保存的抗体的组织染色强度和染色比例均未出现显著改变（参见附图 4，其中附图 4A 为在 4℃ 下保存 14 天的 CB-Anti-0001 抗体原液的 IHC 结果，附图 4B 为在 37℃ 下保存 14 天的 CB-Anti-0001 抗体原液的 IHC 结果，附图 4C 为在 37℃ 下保存 14 天的 CB-Anti-0001 抗体工作液的 IHC 结果）。可见，CB-Anti-0001 抗体工作液在 37℃ 温度下保存 14 天后，抗体依旧稳定，且保留好的检测能力。

PCT

打印件(原件为电子形式)

0-1	PCT/R0/134表(SAFE)有关保藏的微生物或其他生物材料的说明(PCT细则第13条之二)	
0-1-1	软件版本	CEPCT 版本 10. 25. 43 (20220101) MT/FOP 20140331/0. 20. 5. 21
0-2	国际申请号	PCT/CN2022/071976
0-3	申请人或代理人的档案号	0661388006W2
1	下面的说明与本申请说明书中此处提到的保藏的微生物或其他生物材料相关:	
1-1	页码	第28, 57, 78段
1-2	行号:	
1-3	保藏事项	
1-3-1	保藏单位名称	中国典型培养物保藏中心
1-3-2	保藏单位地址	中国湖北省武汉市武汉大学, 邮政编码: 430072, Hubei (CN)。
1-3-3	保藏日期	2021年 1月 13日 (13. 01. 2021)
1-3-4	保藏号	CCTCC C202119
1-4	补充说明	培养物1名称(分类命名): 杂交瘤细胞株12CT 9. 5. 1
1-5	本说明是对下列指定国	所有指定国
1-6	单独提交的说明 这些说明将随后提交给国际局	
2	下面的说明与本申请说明书中此处提到的保藏的微生物或其他生物材料相关:	
2-1	页码	第28, 57, 78段
2-2	行号:	
2-3	保藏事项	
2-3-1	保藏单位名称	中国典型培养物保藏中心
2-3-2	保藏单位地址	中国湖北省武汉市武汉大学, 邮政编码: 430072, Hubei (CN)。
2-3-3	保藏日期	2021年 1月 13日 (13. 01. 2021)
2-3-4	保藏号	CCTCC C202124
2-4	补充说明	培养物2名称(分类命名): 杂交瘤细胞株16CT 4. 1. 1. 2
2-5	本说明是对下列指定国	所有指定国
2-6	单独提交的说明 这些说明将随后提交给国际局	

PCT

打印件(原件为电子形式)

3	下面的说明与本申请说明书中此处提到的保藏的微生物或其他生物材料相关:	
3-1	页码	第28, 57, 78段
3-2	行号:	
3-3	保藏事项	
3-3-1	保藏单位名称	中国典型培养物保藏中心
3-3-2	保藏单位地址	中国湖北省武汉市武汉大学, 邮政编码:430072, Hubei (CN)。
3-3-3	保藏日期	2021年 1月 13日 (13. 01. 2021)
3-3-4	保藏号	CCTCC C202125
3-4	补充说明	培养物3名称(分类命名): 杂交瘤细胞株16CT 18. 1. 1. 2
3-5	本说明是对下列指定国	所有指定国
3-6	单独提交的说明	
	这些说明将随后提交给国际局	

由受理局填写

0-4	本表格与国际申请一起收到: (是或否)	
0-4-1	授权官员	

由国际局填写

0-5	国际局收到本表格日期:	
0-5-1	授权官员	

权 利 要 求 书

1. 一种特异性结合 TRPV6 的抗体或其抗原结合片段，其中所述抗体或其抗原结合片段包含如下重链可变区所包括的三个重链互补决定区 HCDR1、HCDR2 和 HCDR3：

- (a) SEQ ID NO: 25 所示的重链可变区；
- (b) SEQ ID NO: 27 所示的重链可变区；或
- (c) SEQ ID NO: 29 所示的重链可变区。

2. 根据权利要求 1 所述的抗体或其抗原结合片段，其中所述抗体或其抗原结合片段包含选自下组的三个重链互补决定区 HCDR1、HCDR2 和 HCDR3：

- (a) SEQ ID NO: 7 所示的 HCDR1、SEQ ID NO: 8 所示的 HCDR2、SEQ ID NO: 9 所示的 HCDR3；
- (b) SEQ ID NO: 13 所示的 HCDR1、SEQ ID NO: 14 所示的 HCDR2、SEQ ID NO: 15 所示的 HCDR3；或
- (c) SEQ ID NO: 19 所示的 HCDR1、SEQ ID NO: 20 所示的 HCDR2、SEQ ID NO: 21 所示的 HCDR3。

3. 根据权利要求 1 所述的抗体或其抗原结合片段，其中所述抗体或其抗原结合片段进一步包含如下轻链可变区所包括的三个轻链互补决定区 LCDR1、LCDR2 和 LCDR3：

- (a) SEQ ID NO: 26 所示的轻链可变区；
- (b) SEQ ID NO: 28 所示的轻链可变区；或
- (c) SEQ ID NO: 30 所示的轻链可变区。

4. 根据权利要求 3 所述的抗体或其抗原结合片段，其中所述抗体或其抗原结合片段进一步包含选自下组的三个轻链互补决定区 LCDR1、LCDR2 和 LCDR3：

- (a) SEQ ID NO: 10 所示的 LCDR1、SEQ ID NO: 11 所示的 LCDR2 以及 SEQ ID NO: 12 所示的 LCDR3；
- (b) SEQ ID NO: 16 所示的 LCDR1、SEQ ID NO: 17 所示的 LCDR2 以及 SEQ ID NO: 18 所示的 LCDR3；或

(c) SEQ ID NO: 22 所示的 LCDR1、SEQ ID NO: 23 所示的 LCDR2 以及 SEQ ID NO: 24 所示的 LCDR3。

5. 根据权利要求 1 所述的抗体或其抗原结合片段，其中所述抗体或其抗原结合片段包含选自下组的三个重链互补决定区 HCDR1、HCDR2 和 HCDR3 以及三个轻链互补决定区 LCDR1、LCDR2 和 LCDR3：

(a) SEQ ID NO: 7 所示的 HCDR1、SEQ ID NO: 8 所示的 HCDR2、SEQ ID NO: 9 所示的 HCDR3、SEQ ID NO: 10 所示的 LCDR1、SEQ ID NO: 11 所示的 LCDR2 以及 SEQ ID NO: 12 所示的 LCDR3；

(b) SEQ ID NO: 13 所示的 HCDR1、SEQ ID NO: 14 所示的 HCDR2、SEQ ID NO: 15 所示的 HCDR3、SEQ ID NO: 16 所示的 LCDR1、SEQ ID NO: 17 所示的 LCDR2 以及 SEQ ID NO: 18 所示的 LCDR3；或

(c) SEQ ID NO: 19 所示的 HCDR1、SEQ ID NO: 20 所示的 HCDR2、SEQ ID NO: 21 所示的 HCDR3、SEQ ID NO: 22 所示的 LCDR1、SEQ ID NO: 23 所示的 LCDR2 以及 SEQ ID NO: 24 所示的 LCDR3。

6. 根据权利要求 1 所述的抗体或其抗原结合片段，其中所述抗体或其抗原结合片段包含选自下组的重链可变区 V_H ：

(a) SEQ ID NO: 25 所示的重链可变区；

(b) SEQ ID NO: 27 所示的重链可变区；或

(c) SEQ ID NO: 29 所示的重链可变区。

7. 根据权利要求 6 所述的抗体或其抗原结合片段，其中所述抗体或其抗原结合片段进一步包含选自下组的轻链可变区 V_L ：

(a) SEQ ID NO: 26 所示的轻链可变区；

(b) SEQ ID NO: 28 所示的轻链可变区；或

(c) SEQ ID NO: 30 所示的轻链可变区。

8. 根据权利要求 1 所述的抗体或其抗原结合片段，其中所述抗体或其抗原结合片段包含选自下组的重链可变区 V_H 和轻链可变区 V_L ：

- (a) SEQ ID NO: 25 所示的重链可变区和 SEQ ID NO: 26 所示的轻链可变区；
- (b) SEQ ID NO: 27 所示的重链可变区和 SEQ ID NO: 28 所示的轻链可变区；或
- (c) SEQ ID NO: 29 所示的重链可变区和 SEQ ID NO: 30 所示的轻链可变区。

9. 根据权利要求 1 至 8 任一项所述的抗体或其抗原结合片段，其中所述抗体或其抗原结合片段特异性识别或结合具有 SEQ ID NO: 2 所示的氨基酸序列的蛋白。

10. 根据权利要求 9 所述的抗体或其抗原结合片段，其中所述抗体或其抗原结合片段与具有 SEQ ID NO: 2 所示的氨基酸序列的蛋白的 K_d 值小于 10^{-7} M。

11. 根据权利要求 10 所述的抗体或其抗原结合片段，其中所述 K_d 值是通过表面等离子共振方法检测的。

12. 根据权利要求 1 至 11 中任一项所述的抗体或其抗原结合片段，其中所述抗原结合片段是选自 F(ab')₂、Fab'、Fab、Fv、scFv、dsFv 或 dAb。

13. 根据权利要求 1 至 12 中任一项所述的抗体或其抗原结合片段，其中所述抗体或其抗原结合片段进一步具有重链恒定区和/或轻链恒定区。

14. 根据权利要求 13 所述的抗体或其抗原结合片段，其中所述重链恒定区源于鼠的 IgG1 或鼠的 IgG2a。

15. 根据权利要求 13 所述的抗体或其抗原结合片段，其中所述重链恒定区源于人的 IgG1。

16. 根据权利要求 1 至 15 中任一项所述的抗体或其抗原结合片段，其中所述抗体或其抗原结合片段进一步具有缀合部分。

17. 根据权利要求 16 所述的抗体或其抗原结合片段，其中所述缀合部分是治疗剂、放射性同位素、可检测标签、药代动力学修饰部分或纯化部分。

18. 根据权利要求 15 或 16 所述的抗体或其抗原结合片段，其中所述缀合部分直接连接或者通过连接子连接。

19. 一种分离的核酸，其编码权利要求 1 至 18 中任一项所述的抗体或其抗原结合片段。

20. 根据权利要求 19 所述的核酸，其包含：

(a) SEQ ID NO: 31 所示的核酸序列或与 SEQ ID NO: 31 具有至少 90% 序列同一性的核酸序列，和 SEQ ID NO: 32 所示的核酸序列或与 SEQ ID NO: 32 具有至少 90% 序列同一性的核酸序列中的一者或两者；

(b) SEQ ID NO: 33 所示的核酸序列或与 SEQ ID NO: 33 具有至少 90% 序列同一性的核酸序列，和 SEQ ID NO: 34 所示的核酸序列或与 SEQ ID NO: 34 具有至少 90% 序列同一性的核酸序列中的一者或两者；或

(c) SEQ ID NO: 35 所示的核酸序列或与 SEQ ID NO: 35 具有至少 90% 序列同一性的核酸序列，和 SEQ ID NO: 6 所示的核酸序列或与 SEQ ID NO: 6 具有至少 90% 序列同一性的核酸序列中的一者或两者。

21. 一种载体，其包含根据权利要求 19 或 20 所述的核酸序列。

22. 一种宿主细胞，其包含根据权利要求 21 所述的载体。

23. 一种多特异性抗体，其包含权利要求 1 至 18 任一项所述的抗体或其抗原结合片段，和一个或多个与其他抗原特异性结合的抗体或其抗原结合部分。

24. 一种抗体偶联物，其包含权利要求 1 至 18 任一项所述的抗体或其抗原结合片段或权利要求 23 所述的多特异性抗体。

25. 分泌抗 TRPV6 单克隆抗体的杂交瘤细胞株，所述杂交瘤细胞株为 12CT9.5.1、16CT4.1.1.2 或 16CT18.1.1.2，保藏于中国典型培养物保藏中心，其中所述 12CT9.5.1 保藏编号为 CCTCC NO: C202119，所述 16CT4.1.1.2 保藏编号为 CCTCC NO: C202124，所述 16CT18.1.1.2 保藏编号为 CCTCC NO: C202125。

26. 一种药物组合物,其包含权利要求 1 至 18 中任一项所述的抗体或其抗原结合片段、权利要求 19-20 任一项所述的分离的核酸、权利要求 21 所述的载体、权利要求 22 所述的宿主细胞、权利要求 23 所述的多特异性抗体或权利要求 24 所述的抗体偶联物,和药学上可接受的载体。

27. 一种用于分析和检测来自受试者的样品中的 TRPV6 的试剂,所述试剂包含一种或多种如权利要求 1 至 18 所述的抗体或其抗原结合片段。

28. 根据权利要求 27 所述的试剂,所述试剂用于分析和检测来自受试者的样品中的 TRPV6。

29. 一种检测来自受试者的样品中的 TRPV6 的方法,所述方法包括:

- (1) 使所述样品与根据权利要求 1 至 18 中任一项所述的抗体或抗原结合片段接触;
- (2) 可选地,移除未结合的抗体或抗体片段;
- (3) 检测与所述样品中的 TRPV6 结合的抗体或抗体片段。

30. 根据权利要求 29 所述的方法,其中所述步骤(1)中的所述根据权利要求 1 至 18 中任一项所述的抗体或抗原结合片段被固定在基板上。

31. 根据权利要求 29 所述的方法,其中所述步骤(1)中的所述样品被固定在基板上。

32. 根据权利要求 29 至 31 中任一项所述的方法,其中所述步骤(3)包括使用第二抗体,可选的,所述第二抗体能够直接或者间接地结合所述样品中的 TRPV6,可选的,所述第二抗体的表位与根据权利要求 1 至 18 中任一项所述的抗体或抗原结合片段的表位不同,可选的,所述第二抗体的表位与根据权利要求 1 至 18 中任一项所述的抗体或抗原结合片段的表位相同,可选的,所述第二抗体的表位与 TRPV6 的结合不受根据权利要求 1 至 18 中任一项所述的抗体或抗原结合片段的影响,可选的,所述第二抗体的表位与 TRPV6 的结合受根据权利要求 1 至 18 中任一项所述的抗体或抗原结合片段的影响。

33. 根据权利要求 29 至 31 中任一项所述的方法，其中所述步骤(3)包括使用第二抗体，可选的，所述第二抗体能够直接或间接地结合根据权利要求 1 至 18 中任一项所述的抗体或抗原结合片段，可选的，所述第二抗体能够结合根据权利要求 1 至 18 中任一项所述的抗体或抗原结合片段的恒定区部分。
34. 根据权利要求 32 或 33 所述的方法，其中所述第二抗体与检测分子偶联，可选的，所述检测分子包括酶、荧光标记物和生物素。
35. 根据权利要求 34 所述的方法，其中所述检测分子为酶，可选的，所述酶包括辣根过氧化物酶、碱性磷酸酶或其衍生物。
36. 根据权利要求 34 所述的方法，其中所述检测分子为荧光素，可选的，所述荧光素包括 FITC、罗丹明、德克萨斯红、藻红蛋白或 Dylight。
37. 根据权利要求 34 所述的方法，其中所述检测分子为生物素或其衍生物。
38. 根据权利要求 29 至 37 中任一项所述的方法，其进一步包括对与所述样品中的 TRPV6 结合的抗体进行定量。
39. 根据权利要求 38 所述的方法，其中所述方法为免疫组织化学 (IHC)、酶联免疫吸附 (ELISA)、免疫荧光 (IF)、化学发光 (CLIA)、免疫比浊 (TIA) 或免疫印迹 (Western Blot)。
40. 根据权利要求 29 至 39 中任一项所述的方法，其中所述受试者为人类。
41. 根据权利要求 29 至 40 中任一项所述的方法，其用于评估所述样品中在细胞表面上表达 TRPV6 的细胞的比例。
42. 一种判断受试者疾病的形成或形成的风险、评估受试者疾病的进展或预后、或在接受疾病治疗的受试者中预测或监测所述受试者对治疗的应答的方法，所述方法包括使用根据权利要求 29 至 41 中任一项所述的方法检测来自所述受试者的样品中的 TRPV6。

43. 根据权利要求 41 所述的方法，所述方法包括评估所述样品中在细胞表面上表达 TRPV6 的细胞的比例，若所述比例超过预定的阈值，则认为所述受试者患有所述疾病或者更可能从治疗中获益，其中所述阈值为 10%，优选的，所述治疗为靶向药物治疗。
44. 根据权利要求 42 或 43 所述的方法，其中所述疾病为癌症。
45. 根据权利要求 44 所述的方法，其中所述癌症为乳腺癌、卵巢癌、子宫内膜癌、胆管癌、胃癌、食道癌、肺癌、肠癌、胰腺癌；优选的，所述癌症为 HER2⁺乳腺癌、三阴乳腺癌或结直肠癌。
46. 一种试剂盒，所述试剂盒包含权利要求 1 至 18 中任一项所述的抗体或其抗原结合片段，可选的，进一步包括用于检测所述抗体或其抗原结合片段与 TRPV6 结合情况的试剂。
47. 根据权利要求 46 所述的试剂盒，其用于诊断受试者疾病的形成或形成的风险、评估受试者疾病的进展或预后、或在接受疾病治疗的受试者中预测或监测所述受试者对治疗的应答。
48. 根据权利要求 46 所述的试剂盒，其用于免疫组化病理诊断。
49. 根据权利要求 48 所述的试剂盒，其用于肿瘤组织免疫组化病理诊断。
50. 根据权利要求 47 所述的试剂盒，其中所述疾病为癌症。
51. 根据权利要求 48 所述的试剂盒，其中所述疾病为乳腺癌、卵巢癌、子宫内膜癌、胆管癌、胃癌、食道癌、肺癌、肠癌、胰腺癌；优选的，所述疾病为 HER2⁺乳腺癌、三阴乳腺癌或结直肠癌。
52. 一种制备特异性结合 TRPV6 的抗体的方法，所述方法包括：

- (1) 将 SEQ ID NO: 3 所示的氨基酸序列与载体蛋白偶联, 以获得 TRPV6 抗原肽;
- (2) 将通过步骤(1)获得的所述 TRPV6 抗原肽作为免疫原免疫小鼠;
- (3) 经细胞融合、免疫肽筛选克隆, 获得高效分泌特异性结合 TRPV6 的抗体的阳性杂交瘤细胞系; 和
- (4) 获得特异性结合 TRPV6 的抗体。

53. 根据权利要求 52 所述的方法, 其中所述载体蛋白为钥孔虫血蓝素 (KLH) 蛋白。

54. 根据权利要求 52 或 53 所述的方法, 其中通过在 SEQ ID NO: 3 所示的氨基酸序列的 N 端增加一个 Cys, 并通过自由巯基和所述载体蛋白偶联。

55. 根据权利要求 52 至 54 中任一项所述的方法, 其中所述杂交瘤细胞系为小鼠杂交瘤细胞系 12CT 9.5.1、16CT 18.1.1.2 或 16CT 4.1.1.2。

56. 如权利要求 1-18 中任一项所述的抗体或其抗原结合片段、权利要求 19-20 任一项所述的分离的核酸、权利要求 21 所述的载体、权利要求 22 所述的宿主细胞、权利要求 23 所述的多特异性抗体、权利要求 24 所述的抗体偶联物以及权利要求 25 所述的药物组合物在用于治疗 and/或预防和/或诊断与 TRPV6 相关的疾病的药物中的用途。

57. 一种治疗、预防或诊断疾病的方法, 所述方法包括向有需要的受试者施用如权利要求 1-18 中任一项所述的抗体或其抗原结合片段、权利要求 19-20 任一项所述的分离的核酸、权利要求 21 所述的载体、权利要求 22 所述的宿主细胞、权利要求 23 所述的多特异性抗体、权利要求 24 所述的抗体偶联物以及权利要求 25 所述的药物组合物。