(19)国家知识产权局

(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 119013021 A
(43)申请公布日 2024.11.22

(21)申请号 202380029346.1
(22)申请日 2023.02.17
(30)优先权数据
63/311,757 2022.02.18 US
(85)PCT国际申请进入国家阶段日
2024.09.23
(86)PCT国际申请的申请数据
PCT/US2023/062882 2023.02.17
(87)PCT国际申请的公布数据
WO2023/159225 EN 2023.08.24
(71)申请人 弼通益生物科技公司
地址 美国
(72)发明人 罗伯特·哈迪·米尔斯
埃里克·候-简·王
艾丽莎·查维拉
(74)专利代理机构 中原信达知识产权代理有限责任公司 11219
专利代理师 辛怡 杨青
(51)Int.Cl.
A61K 31/404(2006.01)
A61K 31/395(2006.01)
A61K 31/33(2006.01)
A61K 31/405(2006.01)

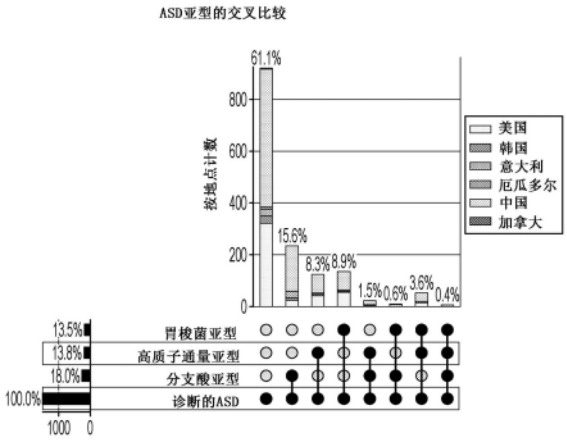
权利要求书3页 说明书38页 附图45页

(54)发明名称

自闭症谱系障碍的微生物特征

(57)摘要

本公开的方面涉及用于诊断和/或治疗具有自闭症谱系障碍(ASD)的一种或多种症状的受试者或具有发生ASD风险的受试者的方法和组合物。在一些实施方式中,方法包括确定和/或调节受试者中分支酸和/或分支酸代谢途径内的分子的水平。在一些实施方式中,方法包括确定和/或调节受试者中微生物特点(例如八叠球菌细菌)的水平。在一些实施方式中,方法包括确定和/或调节受试者胃肠道中的质子通量水平。



CN 119013021 A

1.一种辅助诊断具有自闭症的一种或多种症状的受试者的方法,所述方法包括确定从所述受试者获得的样品中分支酸和/或分支酸代谢途径内的分子的水平。

2.根据权利要求1所述的方法,其中所述分支酸代谢途径内的分子是分支酸的上游或下游代谢物。

3.根据权利要求2所述的方法,其中所述分支酸的下游代谢物是色氨酸、酪氨酸、苯丙氨酸或其代谢物。

4.根据权利要求3所述的方法,其中所述分支酸的下游代谢物是色氨酸的下游代谢物,其中所述色氨酸的下游代谢物是血清素、褪黑素、犬尿氨酸和/或吲哚。

5.根据权利要求2所述的方法,其中所述分支酸的下游代谢物是叶酸或其衍生物。

6.根据权利要求2所述的方法,其中所述分支酸的下游代谢物是铁载体。

7.根据权利要求6所述的方法,其中所述铁载体是肠杆菌素。

8.根据权利要求2所述的方法,其中所述分支酸的下游代谢物是泛醇或甲萘酚。

9.根据权利要求1-8中任一项所述的方法,其中所述样品是粪便样品。

10.根据权利要求1-8中任一项所述的方法,其中所述样品是胃肠道样品。

11.根据权利要求10所述的方法,其中所述胃肠道样品是胃吸出物、活检、肠液、内窥镜刷和/或激光捕获显微切割样品。

12.根据权利要求1-8中任一项所述的方法,其中所述样品是唾液、颊、鼻、尿液、血清或脑脊液样品。

13.根据权利要求1-12中任一项所述的方法,其中确定分支酸和/或分支酸代谢途径内的分子的水平包括扩增和/或测序所述样品中存在的一个或多个核酸的一个或多个部分。

14.根据权利要求13所述的方法,其中所述一个或多个核酸的一个或多个部分包括所述样品中存在的16S核糖体RNA的一个或多个区域。

15.根据权利要求13所述的方法,其中扩增和/或测序所述样品的一个或多个核酸的一个或多个部分包括对至少一部分所述样品进行定量PCR。

16.根据权利要求13所述的方法,其中扩增和/或测序所述样品的一个或多个核酸的一个或多个部分包括对至少一部分所述样品进行鸟枪宏基因组测序。

17.根据权利要求1-16中任一项所述的方法,其中确定分支酸和/或分支酸代谢途径内的分子的水平包括使用HPLC、LC-MS、GC-MS和/或MALDI-TOF。

18.根据权利要求1-17中任一项所述的方法,其还包括如果分支酸和/或分支酸代谢途径内的分子的水平高于或低于阈值,则确定所述受试者患有ASD或具有发生ASD的风险。

19.根据权利要求18所述的方法,其还包括调节所述受试者中分支酸和/或分支酸代谢途径内的分子的水平,以缓解ASD和/或ASD合并症的一种或多种症状或降低发生ASD的风险。

20.根据权利要求19所述的方法,其中调节分支酸和/或分支酸代谢途径内的分子的水平包括向所述受试者施用包含分支酸、分支酸和/或其任一者的盐或酯的组合物。

21.根据权利要求19-20中任一项所述的方法,其中调节分支酸和/或分支酸代谢途径内的分子的水平包括向所述受试者施用包含分支酸前药的组合物。

22.根据权利要求19-21中任一项所述的方法,其中调节分支酸和/或分支酸代谢途径内的分子的水平包括向所述受试者施用包含分支酸代谢物的组合物。

23.根据权利要求19-22中任一项所述的方法,其中调节分支酸和/或分支酸代谢途径内的分子的水平包括向所述受试者施用调节分支酸代谢途径中的一种或多种酶的表达和/或活性的组合物。

24.根据权利要求23所述的方法,其中所述组合物包含所述分支酸代谢途径中的一种或多种酶的激动剂、拮抗剂、激活剂和/或抑制剂。

25.根据权利要求23-24中任一项所述的方法,其中所述一种或多种酶包括分支酸裂解酶。

26.根据权利要求19-25中任一项所述的方法,其中调节分支酸和/或分支酸代谢途径内的分子的水平包括调节分支酸的水平。

27.根据权利要求19-26中任一项所述的方法,其中调节分支酸和/或分支酸代谢途径内的分子的水平包括调节所述分支酸代谢途径内的分子的水平。

28.一种治疗具有ASD的一种或多种症状或具有发生ASD的风险的受试者的方法,所述方法包括调节所述受试者中分支酸和/或分支酸代谢途径内的分子的水平。

29.根据权利要求28所述的方法,其中在所述受试者的肠道中调节所述水平。

30.根据权利要求28-29中任一项所述的方法,其中调节分支酸和/或分支酸代谢途径内的分子的水平包括向所述受试者施用包含分支酸、分支酸、分支酸前药和/或分支酸代谢物的组合物。

31.根据权利要求28-30中任一项所述的方法,其中调节分支酸和/或分支酸代谢途径内的分子的水平包括向所述受试者施用调节分支酸代谢途径中的一种或多种酶的表达和/或活性的组合物。

32.根据权利要求31所述的方法,其中所述一种或多种酶包括分支酸分支点酶。

33.根据权利要求32所述的方法,其中所述分支酸分支点酶包括分支酸裂解酶。

34.根据权利要求31-33中任一项所述的方法,其中所述组合物包含分支酸代谢途径中的一种或多种酶的激动剂、拮抗剂、激活剂和/或抑制剂。

35.根据权利要求28-34中任一项所述的方法,其中调节分支酸和/或分支酸代谢途径内的分子的水平包括向所述受试者施用一种组合物,所述组合物调节所述受试者的胃肠道中产生分支酸和/或分支酸代谢途径内的分子的微生物的量。

36.一种方法,其包括确定从受试者获得的样品中一种或多种微生物特点的丰度,以预测和/或诊断所述受试者的ASD状态。

37.根据权利要求36所述的方法,其中所述一种或多种微生物特点包括八叠球菌(Sarcina)细菌。

38.根据权利要求36-37中任一项所述的方法,其中所述一种或多种微生物特点包括胃梭菌(Clostridium ventriculi)。

39.根据权利要求36-38中任一项所述的方法,其还包括如果所述一种或多种微生物特点高于阈值,则确定所述受试者患有ASD或具有发生ASD的风险。

40.根据权利要求39所述的方法,其还包括降低所述受试者中所述一种或多种微生物特点的丰度,以缓解ASD和/或ASD合并症的一种或多种症状或降低发生ASD的风险。

41.根据权利要求36-40中任一项所述的方法,其中降低所述一种或多种微生物特点的丰度包括向所述受试者施用一种或多种抗生素和/或噬菌体疗法。

42.根据权利要求36-41中任一项所述的方法,其还包括如果所述一种或多种微生物特点的丰度低于阈值,则确定所述受试者患有ASD或具有发生ASD的风险。

43.根据权利要求42所述的方法,其还包括提高所述受试者中所述一种或多种微生物特点的丰度,以缓解ASD和/或ASD合并症的一种或多种症状或降低发生ASD的风险。

44.根据权利要求43所述的方法,其中提高所述一种或多种微生物特点的丰度包括向所述受试者施用一种或多种益生元和/或益生菌。

45.一种辅助诊断具有自闭症的一种或多种症状的受试者的方法,所述方法包括从所述受试者获得的样品确定所述受试者胃肠道中的质子流入水平。

46.根据权利要求45所述的方法,其还包括如果所述质子流入水平高于阈值,则确定所述受试者患有ASD或具有发生ASD的风险。

47.根据权利要求46所述的方法,其还包括调节所述受试者的胃肠pH,以缓解ASD和/或ASD合并症的一种或多种症状或降低发生ASD的风险。

48.一种鉴定患有ASD的受试者的亚型的方法,所述方法包括确定从所述受试者获得的样品中粪便微生物组的组成或一种或多种微生物特点的存在。

49.一种方法,其包括确定从受试者获得的样品中的一种或多种微生物特点,并将所述一种或多种微生物特点用作关于治疗性干预的医学决策的生物标志物。

50.一种方法,其包括训练机器学习模型,以将微生物特点与受试者中ASD的风险或风险水平和/或用于ASD的治疗的候选资格或非候选资格相关联。

51.一种非暂态计算机可读存储介质,其上编码有可执行指令,所述可执行指令当被至少一个处理器执行时,导致所述至少一个处理器执行上述方法中的任一者或任何组合。

52.一种装置,其包含至少一个处理器和至少一个其上编码有可执行指令的非暂态计算机可读存储介质,所述可执行指令当被所述至少一个处理器执行时,导致所述至少一个处理器执行上述方法中的任一者或任何组合。

53.一种方法,其包括:

确定从受试者获得的样品中一种或多种分子或微生物特点的丰度;和

基于所述一种或多种分子或微生物特点的不存在和/或低丰度施用一种或多种疗法,以缓解ASD和/或ASD合并症的一种或多种症状或降低发生ASD的风险。

54.一种方法,其包括基于一种或多种微生物特点的不存在和/或低丰度施用一种或多种益生菌和/或益生元,以缓解自闭症合并症和表型。

55.一种方法,其包括基于一种或多种微生物特点的存在和/或过量来靶向一种或多种微生物特点,以在受试者中缓解ASD和/或ASD合并症的一种或多种症状或降低所述受试者发生ASD的风险。

56.根据权利要求56所述的方法,其中靶向所述一种或多种微生物特点包括向所述受试者施用一种或多种抗生素和/或噬菌体疗法。

57.一种方法,其包括靶向与一种或多种微生物特点相关的一种或多种微生物分子,以在受试者中缓解ASD和/或ASD合并症的一种或多种症状。

58.根据权利要求57所述的方法,其中所述一种或多种分子包括一种或多种毒素。

59.根据权利要求1-58中任一项所述的方法,其中所述受试者具有ASD的一种或多种体征或症状,或具有发生ASD的风险。

自闭症谱系障碍的微生物特征

[0001] 相关申请

[0002] 本申请要求2022年2月18日提交的题为“自闭症谱系障碍的微生物特征”(Microbial Signatures of Autism Spectrum Disorder)的美国临时申请第63/311,757号在35 U.S.C. § 119(e)下的利益,所述临时申请为所有目的整体通过引用并入本文。

背景技术

[0003] 自闭症谱系障碍(ASD)代表了以一系列行为、言语和社交缺陷为特征的一组神经发育障碍。最近的报告表明,在美国诊断率已增加到每44名儿童中的1名(2.3%),突显了ASD是一种患病率越来越高的障碍。自闭症的确切病因尚不清楚,但被认为是多因素的。

[0004] 人类肠道微生物群已成为包括神经系统病症例如ASD在内的一系列疾病的重要因素。从机制上讲,微生物如何参与ASD有多种假设,包括母体免疫激活模型、神经递质例如血清素或GABA的产生、迷走神经信号传导的调节以及诸如4-乙基苯基硫酸盐或短链脂肪酸的分子的产生。然而,目前尚不清楚这些机制中哪一种(如果有的话)驱动ASD的发生。因此,需要用于诊断和/或治疗ASD的改进的方法和组合物。

发明内容

[0005] 在一些实施方式中,本发明的方面涉及用于在受试者中鉴定与自闭症谱系障碍(ASD)相关的一种或多种分子和/或微生物特点的系统和方法。在一些实施方式中,本发明的方面涉及用于在受试者中治疗ASD和/或ASD合并症的一种或多种症状或降低所述受试者发生ASD的风险的方法和组合物。

[0006] 剖测患有ASD的个体的肠道微生物组的研究的系统荟萃分析表明,在某些方面,患有ASD的个体的肠道微生物组所代表的通常丰度有差异的代谢途径与共同的前体分子分支酸有关。

[0007] 因此,在一些实施方式中,用于治疗ASD的方法和组合物包括调节分支酸相关途径(例如分支酸代谢途径)内的分子。在一些实施方式中,治疗具有ASD和/或ASD合并症的一种或多种症状的受试者的方法包括调节所述受试者中的分支酸水平。在一些实施方式中,治疗具有ASD和/或ASD合并症的一种或多种症状的受试者的方法包括调节所述受试者中分支酸代谢途径中的一种或多种分子的水平。在一些实施方式中,治疗具有ASD和/或ASD合并症的一种或多种症状的受试者的方法包括调节分支酸代谢途径中的一种或多种酶或代谢物(例如表1或表2中列出的分子的非限制性实例中的一者或多者)的活性或水平。在一些实施方式中,调节包括提高酶的水平和/或活性(例如施用激动剂)。在一些实施方式中,调节包括降低酶的水平和/或活性(例如施用拮抗剂)。在一些实施方式中,调节分支酸变位酶。在一些实施方式中,调节(例如抑制)分支酸裂解酶。在一些实施方式中,调节(例如抑制)异分支酸合酶。在一些实施方式中,调节(例如抑制)氨基脱氧分支酸合酶(也被称为PABA合酶)。在一些实施方式中,调节邻氨基苯甲酸合酶。

[0008] 在一些实施方式中,将调节剂(例如分支酸代谢途径中的一种或多种酶或其他分

子的激动剂或拮抗剂)施用到具有ASD和/或ASD合并症的一种或多种症状的受试者或具有发生自闭症风险的受试者。

[0009] 在一些实施方式中,调节受试者的肠道中(例如受试者的微生物群内)分支酸或分支酸相关途径(例如分支酸代谢途径)中的一种或多种分子的水平。在一些实施方式中,调节受试者的血液或组织(例如脑、结肠和/或小肠)中分支酸或分支酸相关途径(例如分支酸代谢途径)中的一种或多种分子的水平。

[0010] 在一些实施方式中,分支酸或分支酸相关途径(例如分支酸代谢途径)中的一种或多种分子的水平通过施用调节分支酸代谢途径中(例如所述受试者肠道中的微生物内或所述受试者的血液或组织内)的一种或多种酶的表达和/或活性的组合物来调节。在一些实施方式中,所述组合物包含分支酸代谢途径中的一种或多种酶的一种或多种激动剂和/或拮抗剂。

[0011] 在一些实施方式中,分支酸或分支酸相关途径(例如分支酸代谢途径)中的一种或多种分子的水平通过施用调节所述受试者的肠道内微生物体的水平的组合物来调节。在某些实施方式中,所述微生物体产生分支酸和/或一种或多种分支酸代谢物。在一些实施方式中,所述组合物是微生物组合物。在一些实施方式中,所述组合物包含一种或多种可以调节受试者肠道中不同微生物体的相对量的抗生素、益生菌和/或益生元。

[0012] 在一些实施方式中,用于在具有ASD和/或ASD合并症的一种或多种症状或具有发生ASD的风险的受试者中辅助诊断ASD的方法和组合物包括确定从所述受试者获得的样品中分支酸和/或分支酸代谢途径中的一种或多种分子的水平。在一些实施方式中,例如在来自被诊断为患有ASD的受试者的数据分析的基础上,如果一种或多种此类分子的水平与ASD在统计上相关,则受试者被鉴定为患有ASD或具有ASD的风险。

[0013] 在一些实施方式中,样品是粪便样品。在一些实施方式中,样品是血清样品。在一些实施方式中,样品是唾液、颊、鼻、尿液、脑脊液或胃肠样品(例如拭子或活检)。

[0014] 在一些实施方式中,受试者是人。在一些实施方式中,受试者是儿童。在一些实施方式中,受试者是成年人。在一些实施方式中,受试者具有发生ASD和/或一种或多种ASD合并症的风险。在一些实施方式中,受试者被诊断为具有ASD和/或一种或多种ASD合并症的一种或多种体征或症状。

[0015] 当结合附图考虑时,本发明的其他优点和新颖特征将从下面本发明的各种非限制性实施方式的详细描述中变得显而易见。在本说明书和通过引用并入的文件包括冲突和/或不一致的公开内容的情况下,应以本说明书为准。

附图说明

[0016] 将参考附图以实例描述本发明的非限制性实施方式,所述附图是示意性的,并且不打算按比例绘制。在附图中,示出的每个相同或几乎相同的组件通常由单个数字表示。为清楚起见,在不需要图示即可使本领域普通技术人员理解本发明的情况下,不是每个组件都在每张图中被标记,也没有示出本发明的每个实施方式的每个组件。在所述附图中:

[0017] 图1示出了莽草酸途径的示意图;

[0018] 图2示出了分支代谢途径的示意图;

[0019] 图3示出了根据一些实施方式,ASD状态与微生物组α和β多样性的关联。图3A示出

了来自1740个样品的未加权UniFrac距离矩阵的主坐标分析(PCoA)。图3B示出了来自1740个样品的加权UniFrac距离矩阵的PcoA。图3C示出了来自未加权和加权UniFrac距离指标的ASD相比于对照的PERMANOVA β组显著性检验的伪F统计量。具有全彩色不透明度的条是指具有P < 0.05的PERMANOVA检验。图3D示出了每个队列的ASD与对照相比α多样性值的Log2倍数变化,并按显著性确定大小。箱线图示出了数据分布的中位数、四分位数和1.5x四分位距。P值从未调整双尾t检验产生。

[0020] 图4示出了根据一些实施方式,ASD与对照之间的分类和功能差异。图4A示出了最显著的门的ASD/对照的相对丰度的Log2倍数变化。各个点按队列着色,大小指示了ASD与对照之间的显著差异(未调整双尾t检验p值 < 0.05)。图4B示出了最显著的属的ASD/对照的相对丰度的Log2倍数变化,各个点的颜色和大小确定与图4A相同。图4C-4E示出了按ASD状态分层的各个纲和属的每个样品的log10转换的相对丰度的逐个样品图。箱线图示出了数据分布的中位数、四分位数和1.5x四分位距。图4C示出了ASD相比于对照儿童中放线菌纲的相对丰度。图4D示出了ASD相比于对照儿童中普氏菌属(Prevotella)的相对丰度。图4E示出了ASD相比于对照儿童中双歧杆菌属(Bifidobacterium)的相对丰度。图4F示出了在比较ASD和对照时显著的微生物途径。绘制了单独处理的每个队列的最常见的显著细菌代谢途径的ASD/对照中归一化途径丰度值的log2倍数变化。使用欧几里德距离进行研究和途径的层次聚类。点按log2倍数变化着色,并按显著性确定大小(未调整双尾t检验 P < 0.05)。图4G示出了在单独或总体处理的每个队列中,涉及甲萘醌和泛醌的每个途径的ASD/对照的归一化log2倍数变化值。各个点按Log2 ASD/对照倍数变化着色,并确定大小以指示ASD与对照之间的统计显著性(不等方差的未调整双尾t检验p值 < 0.05)。图4H示出了来自单独或总体处理的每个队列的分支酸、芳香族氨基酸和维生素B途径的ASD/对照的归一化log2倍数变化值。各个点按Log2 ASD/对照倍数变化着色,并确定大小以指示ASD与对照之间的统计显著性(不等方差的未调整双尾t检验p值 < 0.05)。L-酪氨酸、L-色氨酸生物合成的超级途径、L-色氨酸生物合成、L-酪氨酸生物合成的超级途径和L-苯丙氨酸生物合成途径的超级途径与芳香族氨基酸有关。腺苷钴胺素生物合成和四氢叶酸生物合成的超级途径是维生素B相关途径。

[0021] 图5示出了根据一些实施方式,关于ASD状态预测的机器学习性能的评估。图5A示出了来自50次迭代的平均AUC ± SEM的条形图。使用聚合的ASV水平数据集测试了11种分类算法。梯度提升分类器和AdaBoost模型表现最佳,并进行了进一步测试。图5B示出了在聚合数据上和对不同分类水平上折叠的读取计数单独进行的每个研究上训练和测试的梯度提升分类器模型的平均准确性。误差条示出了来自重复10次的5倍交叉验证的标准误差。图5C示出了根据在ASV水平的聚合数据上训练的梯度提升分类器模型,以特点重要性递减的方式作图的前25个特点在每个样品中的相对丰度和SHAP值。图5D是由来自梯度提升分类器模型的前25个特点的SHAP值生成并着色的聚类热图,所述模型在聚合数据和每个队列上独立地训练和测试。使用欧几里德距离的层次聚类进行队列和特点的聚类。

[0022] 图6示出了根据一些实施方式,对影响机器学习模型性能和分类丰度的研究设计因素的评估。图6A-6D示出了(顶部)分别从V4和V3-V4高变区测序的数据的普氏菌属(Prevotella)(图6A)、普氏菌属(Prevotella)与拟杆菌的比率(图6B)、脱硫弧菌目(图6C)和δ变形菌纲(图6D)的ASD相比于对照的log2倍数变化,以及(底部)按ASD状态分割的来自

V4和V3-V4区的每个样品(V4 n=1024,V3-V4 n=352)中普氏菌属(Prevotella)(图6A)、普氏菌属(Prevotella)与拟杆菌的比率(图6B)、脱硫弧菌目(图6C)和δ变形菌纲(图6D)的log10转化的相对丰度。P值通过未调整Wilcoxon双尾t检验计算。箱线图示出了数据分布的中位数、四分位数和1.5x四分位距。图6E示出了梯度提升分类器模型的机器学习AUC、准确性和F1评分,所述模型经过训练以从按测序深度和可变区分割的样品预测ASD状态(测序深度:> 140000 n=851,> 6000 n=640,可变区:V3-V4 n=356,V4 n=1032,V1-V2 n=103)。图6F示出了在从按对照关系、国家和性别分割的样品预测ASD状态时梯度提升分类器模型的AUC、准确性和F1评分(对照关系:相关对照n=462,无关对照n=1029;国家:美国n=761,厄瓜多尔n=46,中国n=684;性别:未知n=168,男性n=1021,女性n=302)。条形图示出了平均值±SEM。图6G示出了GBC模型的平均AUC的热图,所述模型在1-16岁的每个潜在年龄范围处拣选的样品上进行训练和测试。

[0023] 图7示出了根据一些实施方式的分支酸分支点酶丰度。图7A示出了来自五种主要分支酸分支点酶的ASD/对照样品的归一化酶编号丰度的逐个研究的log2倍数变化。图7B示出了按队列和ASD状态分层的样品的预测和归一化的分支酸裂解酶EC编号的箱线图。在组之间进行Wilcoxon双尾t检验,显著差异被指示在每个队列右侧(*,p < 0.05;**,p < 0.01,***p < 0.001)。箱线图示出了数据分布的中位数、四分位数和1.5x 四分位距。图7C示出了逐个样品和按队列和ASD状态分层的样品的预测和归一化的menF基因丰度的箱线图。在组之间进行Wilcoxon双尾t检验(*,p < 0.05;**,p < 0.01,***p < 0.001)。图7D示出了热图,其描绘了含有menF基因的细菌特点的存在或不存在,突出了在最大数量的研究中存在的细菌特点。所述热图指示了每个队列中细菌的存在(1)或不存在(0)。

[0024] 图8A示出了根据一些实施方式,ASD与对照受试者之间通常改变的属的Log2倍数变化的图。

[0025] 图8B示出了根据一些实施方式的直方图和KDE曲线,显示了ASD和对照受试者的肠道微生物组中八叠球菌(Sarcina)的组成丰度的分布。

[0026] 图8C示出了根据一些实施方式的热图,描述了按队列和研究因素划分的ASD或对照受试者中八叠球菌的分数丰度。

[0027] 图9A示出了根据一些实施方式的气泡图,显示了与对照相比,在ASD受试者的肠道微生物组中发现的通常显著的途径。

[0028] 图9B示出了根据一些实施方式的直方图和KDE曲线,显示了ASD和对照受试者的肠道微生物组中分支酸代谢的超级途径的组成丰度的分布。

[0029] 图9C示出了根据一些实施方式的热图,描述了按队列和研究因素划分的ASD或对照受试者中分支酸代谢的超级途径的分数丰度。

[0030] 图9D示出了根据一些实施方式的维恩图,描述了分支酸代谢的超级途径与ASD相关的各种特点之间的重叠。

[0031] 图10A示出了根据一些实施方式的气泡图,显示了与对照相比,在ASD受试者的肠道微生物组中发现的通常显著的代谢流入差异。

[0032] 图10B示出了根据一些实施方式的直方图和KDE曲线,显示了ASD和对照受试者的肠道微生物组的质子流入的分布。

[0033] 图10C示出了根据一些实施方式的热图,描述了按队列和研究因素划分的含有肠

道微生物组的超过阈值的质子流入的ASD或对照受试者的分数丰度。

[0034] 图11示出了根据一些实施方式,对三种ASD亚型的患者群体进行交叉比较的UpSet图。

[0035] 图12A示出了根据一些实施方式,当给予增加的分支酸时分支酸代谢基因增加的ASD受试者中改变的前30种代谢物的条形图。

[0036] 图12B示出了根据一些实施方式的箱线图,显示了当在模拟饮食中给予增加的分支酸时,分支酸亚型的ASD受试者的L-酪氨酸的流入差异。

[0037] 图12C示出了根据一些实施方式的箱线图,显示了当在模拟饮食中给予增加的分支酸时,分支酸亚型的ASD受试者的叶酸的流入差异。

[0038] 图12D示出了根据一些实施方式的箱线图,显示了当在模拟饮食中给予增加的分支酸时,分支酸亚型的ASD受试者的吲哚的流入差异。

[0039] 图12E示出了根据一些实施方式的箱线图,显示了当在模拟饮食中给予增加的分支酸时,分支酸亚型的ASD受试者的甲萘醌8的流入差异。

具体实施方式

[0040] 本发明的方面涉及用于诊断和/或治疗具有自闭症谱系障碍(ASD)的一种或多种症状的受试者和/或具有发生ASD的风险的受试者的方法和组合物。在一些实施方式中,调节受试者中分支酸水平的组合物可用于治疗ASD。在一些实施方式中,调节受试者中分支酸代谢(例如分支酸下游分子的生物合成)的组合物可用于治疗ASD。在一些实施方式中,调节受试者中(例如受试者肠道中)微生物体(例如八叠球菌细菌、胃梭菌(Clostridium ventriculi))的相对丰度的组合物可用于治疗ASD。在一些实施方式中,调节受试者胃肠(GI)道中的质子通量水平的组合物可用于治疗ASD。

[0041] 根据本发明的方面,评估人类肠道微生物群中分支酸代谢超级途径内的一个或多个基因的丰度可以帮助确定施用一种或多种治疗干预对自闭症的一种或多种核心症状的效用。在一些实施方式中,治疗干预可以包括单一治疗干预或两种或更多种治疗干预的组合。

[0042] 在一些实施方式中,通过评估(例如确定和/或监测)来自受试者的样品中微生物群(例如肠道微生物群)内分支酸代谢超级途径内的一个或多个基因(例如所有基因或基因的子集)的丰度,来协助受试者中ASD的诊断。在一些实施方式中,基因的丰度可以通过确定所述基因的DNA和/或RNA水平(例如使用DNA和/或RNA序列数据)来评估。在一些实施方式中,基因的丰度可以通过确定样品中一种或多种基因产物的水平来评估。

[0043] 在一些实施方式中,通过评估(例如确定和/或监测)来自受试者的样品中分支酸代谢超级途径的一种或多种代谢物(例如此类代谢物的组合)的水平,来协助受试者中ASD的诊断。

[0044] 在一些实施方式中,治疗具有ASD风险的受试者或具有ASD和/或ASD合并症的一种或多种症状的受试者的方法包括向所述受试者施用益生菌和/或益生元,以例如调节含有分支酸代谢超级途径内的一种或多种基因的微生物体的丰度。因此,在一些实施方式中,益生菌和/或益生元可以用作治疗干预,或者与一种或多种额外的治疗干预联合,以治疗自闭症的一种或多种核心症状。

[0045] 在一些实施方式中,提高或降低肠道微生物群内分支酸分支点酶之一或其组合的活性的分子的施用,可用作自闭症的一种或多种核心症状的治疗干预。

[0046] 在一些实施方式中,含有活性水平已被调节的分支酸分支点酶的益生菌的施用,可用作自闭症的一种或多种核心症状的治疗干预。

[0047] 在一些实施方式中,诸如分支酸(chorismate)、分支酸(chorismic acid)和/或其任一者的盐或酯的分子的施用,可用作自闭症的一种或多种核心症状的治疗干预。在一些实施方式中,分支酸代谢超级途径内的其他分子的施用,可用作自闭症的一种或多种核心症状的治疗干预。在一些实施方式中,分支酸(chorismate)、分支酸(chorismic acid)和/或其任一者的盐或酯与分支酸代谢超级途径内的一种或多种其他分子的组合的施用,可用作自闭症的一种或多种核心症状的治疗干预。

[0048] 在一些实施方式中,评估(例如确定和/或监测)受试者的肠道微生物群内分支酸分支点酶的活性,可作为辅助用于在所述受试者中诊断ASD。

[0049] 在一些实施方式中,评估(例如确定和/或监测)受试者的肠道微生物群内分支酸分支点酶的活性,可作为辅助用于确定适合于向受试者施用的治疗干预或治疗干预的组合。

[0050] 本发明的这些和其他方面在下文中更详细描述。

[0051] 本文所使用的“ASD”是指自闭症谱系障碍。

[0052] 本文所使用的“自闭症的核心症状”包括但不限于易怒、失眠、言语和沟通问题、攻击性、消化问题、社交问题、行为和兴趣的有限重复模式、焦虑发作、自我攻击和情绪障碍。

[0053] 本文所使用的“分支酸代谢的超级途径”是指从D-赤藓糖4-磷酸和磷酸烯醇式丙酮酸产生分支酸的途径(即莽草酸途径)以及将分支酸转变为下游代谢物(例如芳香族氨基酸及其衍生物、泛醇、甲萘酚、四氢叶酸、肠杆菌素)的途径。本文所使用的 “分支酸代谢途径”是指分支酸代谢的超级途径或分支酸代谢超级途径内的途径。

[0054] 本文所使用的分支酸代谢超级途径中的基因包括但不限于来自人类肠道微生物群的任何微生物内的基因,这些基因参与从D-赤藓糖4-磷酸和磷酸烯醇式丙酮酸生产分支酸,以及将分支酸转变为泛醇、甲萘酚、四氢叶酸、肠杆菌素、L-色氨酸、L-酪氨酸、L-苯丙氨酸以及L-色氨酸的代谢产物包括但不限于血清素、褪黑素、犬尿氨酸、吲哚和任何中间分子。基因名称的非限制性列表可以在表1中找到。

[0055] 本文所使用的分支酸代谢超级途径的代谢物包括但不限于参与从D-赤藓糖4-磷酸和磷酸烯醇式丙酮酸产生分支酸的中间分子,或衍生自分支酸的任何分子。代谢物名称的非限制性列表可以在表2中找到。

[0056] 本文所使用的“分支酸分支点酶”包括但不限于分支酸变位酶、邻氨基苯甲酸合酶、氨基脱氧分支酸合酶(也被称为对氨基苯甲酸(PABA)合酶)、异分支酸合酶、甲萘醌特异性异分支酸合酶、分支酸脱水酶和分支酸裂解酶。

[0057] 本文所使用的“治疗干预”包括但不限于褪黑素补充剂、叶酸补充剂、益生菌、粪便移植、维生素K补充剂、色氨酸补充剂,或调节血清素、犬尿氨酸或吲哚、低聚果糖、莽草酸(shikimate)或莽草酸(shikimic acid)或其任何盐或酯、分支酸(chorismate)或分支酸(chorismic acid)或其任何盐或酯的任何干预,以及分支酸分支点酶和/或表1或表2中的一种或多种基因或蛋白质的调节剂(例如抑制剂或激动剂)。

[0058] 本文描述了用于评估受试者患有或发生自闭症谱系障碍(ASD)的风险、用于鉴定提供给受试者以降低发生ASD的风险或减轻或缓解ASD和/或ASD合并症的一种或多种症状的治疗和/或使用所鉴定的治疗来治疗所述受试者的方法和组合物的实施方式。

[0059] 根据一些实施方式，本文描述的方法包括从受试者获得样品。在一些实施方式中,所述受试者是人类受试者。在某些实施方式中,所述受试者是男性。在某些实施方式中,所述受试者是女性。所述受试者可能来自任何地理位置。在某些实施方式中,所述受试者来自北美洲(例如美国)、亚洲(例如中国、韩国)、欧洲(例如意大利)和/或南美洲(例如厄瓜多尔)。

[0060] 所述受试者可以具有任何年龄。在某些实施方式中,所述受试者是儿童(例如17岁或以下)。在某些实施方式中,所述受试者是成年人(例如18岁或以上)。在一些实施方式中,所述受试者的年龄在1-5岁、1-7岁、1-10岁、1-15岁、1-17岁、1-18岁、1-21岁、1-50岁、1-70岁、1-100岁、2-7岁、2-10岁、2-15岁、2-17岁、2-18岁、2-21岁、2-50岁、2-70岁、2-100岁、5-10岁、5-15岁、5-17岁、5-18岁、5-21岁、5-50岁、5-70岁、5-100岁、10-15岁、10-17岁、10-18岁、10-21岁、10-50岁、10-70岁、10-100岁、15-21岁、15-50岁、15-70岁、15-100岁、18-50岁、18-70岁、18-100岁、21-50岁、21-70岁、21-100岁、50-70岁、50-100岁或70-100岁的范围内。

[0061] 在一些实施方式中,所述样品是粪便样品。在某些实施方式中,获得所述样品包括收集粪便样品(例如收集粪便样品、擦拭直肠腔)。在一些实施方式中,所述样品是胃肠道样品。在某些情况下,胃肠道样品包括胃吸出物、活检(例如黏膜活检、胃组织活检)、肠液、内窥镜刷和/或激光捕获显微切割样品。在一些实施方式中,从受试者获得样品包括对所述受试者进行活检、内窥镜和/或结肠镜检查。在一些实施方式中,所述样品是血清、脑脊液(CSF)、尿液、颊、鼻或唾液样品。在一些实施方式中,从受试者获得样品包括收集血清样品,对所述受试者进行脊椎穿刺,收集尿液样品和/或擦拭所述受试者的脸颊、喉咙和/或鼻腔。

[0062] 在一些实施方式中,本文描述的方法包括分析从受试者获得的样品,以评估所述受试者的微生物组的一个或多个特征。在某些情况下,所述一个或多个特征包括在所述微生物组内检测到的一种或多种微生物的身份和/或在所述微生物组中检测到的一种或多种微生物的量或相对量。

[0063] 在某些情况下,所述微生物组可能是所述受试者胃肠道的微生物组(例如包含肠道微生物群的肠道微生物组)。在一些实施方式中,所述样品可以代表所述受试者胃肠道的特征。在某些情况下,所述样品是粪便样品。在某些情况下,所述样品是胃肠道样品。在某些情况下,所述胃肠道样品取自胃肠道(例如下胃肠道、上胃肠道)。所述样品可以在任何适合的程序中获得,包括但不限于结肠镜检查、内窥镜检查、拭子检查或刷擦胃肠道的一部分。

[0064] 尽管本文描述的一些实例侧重于胃肠道微生物组(上和/或下胃肠道),但实施方式并不局限于此,其他实施方式可能涉及受试者解剖结构的其他部分(例如鼻窦、皮肤、肺、口腔黏膜或其他)的微生物组。在医学上适当的情况下,可以使用任何先前描述的用于获取样品的技术从受试者解剖结构的这些其他部分获取样品。获得的样品可以被制备,然后分析其中的微生物以确定微生物特点。在某些情况下,实施方式可能涉及受试者解剖结构的其他部分(例如血液、脑等)中存在的微生物组产物(例如分支酸及其代谢物)。

[0065] 在一些实施方式中,本文描述的方法包括确定来自受试者的样品中分子(例如分支酸、分支酸代谢途径内的分子)和/或微生物特点(例如微生物体)的水平(例如丰度)。

[0066] 在一些实施方式中,确定所述分子和/或微生物特点的水平包括确定来自所述受试者的样品中存在的一个或多个基因(例如分支酸代谢超级途径内的一个或多个基因,包括但不限于表1中列出的一个或多个基因)的丰度。在一些实施方式中,确定样品中存在的一个或多个基因的丰度包括从所述样品的至少一部分中提取DNA和/或RNA。可以使用本领域中已知的任何核酸提取方法。在一些实施方式中,确定样品中存在的一个或多个基因的丰度还包括扩增所述DNA和/或RNA的至少一部分以产生多个扩增子。可以使用本领域中已知的任何核酸扩增方法。适合的核酸扩增方法的非限制性实例包括聚合酶链反应(PCR)和等温扩增方法(例如环介导的等温扩增(LAMP)、滚环扩增(RCA)、基于核酸序列的扩增(NASBA))。在一些实施方式中,确定样品中存在的一个或多个基因的丰度包括进行定量核酸扩增方法。适合的定量核酸扩增方法的非限制性实例是定量PCR(qPCR)。在一些实施方式中,确定样品中存在的一个或多个基因的丰度还包括对一个或多个扩增子进行测序。可以使用任何适合的核酸测序方法。在某些实施方式中,所述核酸测序方法是长读出测序方法。在某些实施方式中,所述核酸测序方法是短读出测序方法。在一些实施方式中,所述核酸测序方法是下一代测序方法。在一些实施方式中,所述核酸测序方法使用Illumina、Pacific Biosciences、Oxford Nanopore和/或Roche 454测序平台进行。

[0067] 在一些实施方式中,确定样品中存在的一个或多个基因的丰度包括对所述样品中存在微生物的16S核糖体RNA(rRNA)的至少一部分进行测序(例如进行16S rRNA基因扩增子(16S)测序)。在一些情况下,进行16S测序包括扩增所述样品中存在的微生物的16S rRNA基因组的一个或多个区域的至少一部分,以产生多个扩增子。可以使用任何核酸扩增方法(例如PCR)。在一些实施方式中,所述16S rRNA基因组的一个或多个区域包含至少一个高变区(例如V4、V3-V4、V1-V2)。在一些情况下,进行16S测序还包括对所述多个扩增子中的一个或多个扩增子进行测序。可以使用任何适合的核酸测序方法。

[0068] 在一些实施方式中,确定样品中存在的一个或多个基因的丰度包括进行鸟枪宏基因组测序,以对所述样品的宏基因组含量进行测序。在某些情况下,鸟枪宏基因组测序方法包括从样品提取DNA,将提取的DNA片段化为DNA片段,并对所述DNA片段进行测序。可以使用任何适合的核酸测序方法。在某些情况下,可以分析所述DNA片段的得到的序列,以鉴定所述样品中存在的微生物。

[0069] 在一些实施方式中,确定样品中存在的一个或多个基因的丰度包括确定样品中一个或多个基因产物(例如酶)的水平。所述一个或多个基因产物的水平可以根据本领域中已知的任何方法来确定,包括但不限于酶联免疫吸附测定法(ELISA)和其他基于抗体的测定法,以及基于液相色谱-质谱(LC-MS)的蛋白质组学和其他基于蛋白质的定量测定法。在一些实施方式中,确定样品中存在的一个或多个基因的丰度包括确定与代谢途径中的一个或多个基因产物(例如酶)直接或间接相互作用的一种或多种分子(例如分支酸和/或其代谢物)(例如作为底物或产物)的水平。所述一种或多种分子(例如底物、产物)的水平可以根据本领域中已知的任何方法来确定,包括但不限于高效液相色谱(HPLC)、液相色谱-质谱(LC-MS)、气相色谱-质谱(GC-MS)和基于荧光的测定法。

[0070] 在一些实施方式中,确定来自受试者的样品中所述分子和/或微生物特点的水平包括测量所述样品中所述分子和/或者微生物特点的水平。所述样品中所述分子和/或微生物特点的水平可以根据本领域中已知的任何方法来测量。适合的方法的非限制性实例包括

HPLC、LC-MS、GC-MS和基质辅助激光解吸电离飞行时间质谱(MALDI-TOF)。在某些实施方式中,所述样品中所述微生物特点的水平可以通过将所述样品的至少一部分铺在不同培养基上和/或在不同条件下来测量,以评估微生物生长并鉴定所述样品中存在的一种或多种微生物体。

[0071] 根据一些实施方式,一种方法包括如果分子或微生物特点的水平高于或低于阈值,则确定所述受试者患有至少一种ASD亚型或具有发生至少一种ASD亚型的风险。在某些情况下,所述阈值可以基于一个或多个神经典型的个体(例如未被诊断为ASD的个体)中所述分子或微生物特点的水平来确定。在某些情况下,所述阈值可以通过鉴定被诊断为ASD的个体的第一群体与神经典型个体的第二群体之间的最佳判别边界来确定。

[0072] 根据一些实施方式,一种方法包括鉴定受试者患有或有患病风险的ASD亚型。在一些实施方式中,所述方法包括确定从所述受试者获得的样品中粪便微生物组的组成或一种或多种分子和/或微生物特点的存在或水平。在一些实施方式中,所述ASD亚型是分支酸亚型。在某些情况下,所述分支酸亚型的特征可能是所述样品中分支酸和/或分支酸代谢途径(例如莽草酸途径、用于将分支酸转变为芳香族氨基酸及其衍生物、叶酸及其衍生物、泛醇、甲萘酚和肠杆菌素的途径)内的分子的改变的水平(例如相对于一个或多个神经典型个体)。在某些情况下,所述分支酸和/或分支酸代谢途径中的分子的改变的水平可能高于或低于某个阈值。在一些实施方式中,所述ASD亚型是八叠球菌亚型。在某些情况下,所述八叠球菌亚型的特征可能是所述样品中八叠球菌细菌的改变(例如升高)的水平(例如相对于一个或多个神经典型个体)。在一些实施方式中,所述ASD亚型是质子流入亚型。在某些情况下,所述质子流入亚型的特征可能是所述受试者的胃肠道中质子流入的改变(例如升高)的水平。

[0073] 分支酸

[0074] 自闭症的分支酸假说

[0075] 在某些方面,受试者中(例如受试者的微生物群内)分支酸和/或分支酸代谢途径内的一种或多种分子的水平的评估和调节可用于ASD的治疗和/或诊断应用。在本文中使用分支酸的任何地方,除非上下文另有规定,否则也可以使用分支酸(chorismic acid)和/或分支酸(chorismate)或分支酸(chorismic acid)的任何盐或酯。通常应该理解,除非上下文另有规定,否则对采取离子、质子化、盐或酯形式的化合物的指称可能涵盖其他形式。

[0076] 在某些方面,在具有ASD的一种或多种症状的受试者中,可以检测到分支酸和/或分支酸代谢途径内的一种或多种分子的相对缺失或丰富。在某些方面,在具有ASD的一种或多种症状的受试者中,可以检测到可能具有调节分支酸及其相关分子的水平能力的细菌的相对缺失或丰富。

[0077] 分支酸是存在于微生物和植物中但不存在于动物中的莽草酸途径的最终产物。莽草酸途径的示例图示出在图1中。如图1中所示,莽草酸途径包含七个酶促步骤:(1)3-脱氧-D-阿拉伯糖基-庚酮糖酸-7-磷酸合酶(DAHPS)将D-赤藓糖-4-磷酸(例如戊糖磷酸循环的中间体)和磷酸烯醇式丙酮酸(例如糖酵解的中间体)转变为3-脱氧-D-阿拉伯糖基-庚酮糖酸-7-磷酸(DAHP);(2)3-脱氢奎尼酸合酶(DHQS)将DAHP转变为3-脱氢奎尼酸;(3)3-脱氢奎尼酸脱水酶(DHQ)将3-脱氢奎尼酸转变为3-脱氢莽草酸;(4)莽草酸5-脱氢酶(SDH)将3-脱氢莽草酸转变为莽草酸;(5)莽草酸激酶(SK)将莽草酸转变为莽草酸3-磷酸;(6)5-烯醇式

丙酮酸基莽草酸-3-磷酸合酶(EPSPS)将莽草酸3-磷酸转变为5-O-羧基乙烯基-3-磷酸莽草酸(也被称为5-烯醇式丙酮酸基莽草酸-3-磷酸(EPSP));和(7)分支酸合酶(CS)将5-O-羧基乙烯基-3-磷酸莽草酸转变为分支酸。

[0078] 然后,分支酸可以被转化成几种生物相关的芳香族分子,包括但不限于芳香族氨基酸(例如苯丙氨酸、酪氨酸、色氨酸)及其衍生物、叶酸及其衍生物(例如四氢叶酸)、铁载体(例如肠杆菌素)、泛醇(例如辅酶Q)和甲萘酚。图2示出了五个分支酸依赖性途径的示例性表示。在一个途径中,分支酸变位酶将分支酸转变为预苯酸,其是苯丙氨酸和酪氨酸的前体。在另一个途径中,邻氨基苯甲酸合酶将分支酸转变为邻氨基苯酸,其是色氨酸的前体。在另一个途径中,氨基脱氧分支酸合酶(也被称为对氨基苯甲酸(PABA)合酶)将分支酸转变为对氨基苯甲酸,其是叶酸的前体。在另一个途径中,异分支酸合酶将分支酸转变为异分支酸,其是肠杆菌素的前体。在另一个途径中,分支酸裂解酶将分支酸转变为对羟基苯甲酸,其是泛醇和/或甲萘酚的前体。根据本发明的方面,在患有ASD或具有ASD风险的受试者中,分支酸的一种或多种下游代谢物的水平可能会改变。

[0079] 由于在人类中不存在莽草酸途径,因此沿着莽草酸途径以及依赖于分支酸的途径上的每个分子的水平取决于通过饮食摄入的每个分子的量或由肠道微生物产生的量。

[0080] 靶向莽草酸途径的一种或多种酶的某些化合物可能与ASD有关。一个实例是草甘膦(也被称为农达)。草甘膦靶向酶EPSPS,阻止5-O-(羧基乙烯基)-3-磷酸莽草酸(其可以被分支酸合酶转变为分支酸)的产生。一项研究发现,自闭症儿童数量的增加与施用到玉米和大豆的草甘膦量的增加相对应。参见Shaw,患有自闭症谱系障碍或疑似癫痫发作障碍的三胞胎中尿液草甘膦和梭菌代谢物升高并且多巴胺代谢改变:病例研究(Elevated urinary glyphosate and clostridia metabolites with altered dopamine metabolism in triplets with autistic spectrum disorder or suspected seizure disorder: A case study),Integr Med(Encinitas), 16(1): 50-57(2017)。在某些情况下,草甘膦可能杀死有益细菌,留下可以产生有害分子(例如毒素)的细菌(例如梭菌属)。在某些情况下,草甘膦可能与I类EPSPS酶竞争,但不与II类EPSPS酶类竞争。因此,在某些情况下,受试者暴露于草甘膦可能导致依赖I类EPSPS酶的物种减少(例如在所述受试者的胃肠道中)。在一些实施方式中,受试者暴露于草甘膦可能导致分支酸水平降低(例如在所述受试者的胃肠道中)。

[0081] 在一些实施方式中,受试者暴露于草甘膦可能导致所述受试者表现出ASD的一种或多种症状和/或发生ASD的风险更高。在某些实施方式中,一种方法包括基于受试者中草甘膦水平的升高(例如相对于一个或多个神经典型个体)来确定所述受试者患有ASD亚型(例如ASD的分支酸亚型)或具有患ASD亚型的风险。

[0082] 在某些情况下,受试者暴露于草甘膦可能造成非霍奇金淋巴瘤、成熟B细胞淋巴瘤、成熟T细胞和自然杀伤细胞淋巴瘤、乳糜泻、谷蛋白不耐受、致病菌过度生长、有益微生物减少、血清素信号传导受损、不孕、流产、出生缺陷、肥胖、炎症性肠病、神经性厌食症、阿兹海默氏病、帕金森氏病、多发性硬化症、肝病、ADHD、肌萎缩性脊髓侧索硬化(ALS)、癌症和/或恶病质。

[0083] 芳香族氨基酸(及其下游产物)

[0084] 在一些实施方式中,某些芳香族氨基酸(例如色氨酸、酪氨酸、苯丙氨酸)是分支酸

代谢途径内的分子的非限制性实例。

[0085] 在一些实施方式中,分支酸可以通过色氨酸生物合成途径转变为色氨酸。在色氨酸生物合成途径的第一步中,邻氨基苯甲酸合酶可以将分支酸转变为邻氨基苯甲酸,其是色氨酸的上游代谢物(即前体)。在某些情况下,色氨酸生物合成途径的改变可能与个体中的ASD有关。因此,在某些情况下,色氨酸和/或色氨酸生物合成途径内的分子水平的改变(例如相对于神经典型个体)可能与ASD有关。在某些情况下,色氨酸和/或色氨酸生物合成途径内的分子的较低水平(例如相对于神经典型个体)可能与ASD有关。在某些情况下,色氨酸和/或色氨酸生物合成途径内的分子的较高水平(例如相对于神经典型个体)可能与ASD有关。因此,在一些实施方式中,一种方法包括基于来自受试者的样品中色氨酸和/或色氨酸生物合成途径内的分子的水平相对于一个或多个神经典型个体中的水平发生改变(例如增加、减少),来确定所述受试者患有至少一种ASD亚型(例如分支酸亚型)或具有发生至少一种ASD亚型的风险。所述样品可以是本文描述的任何样品(例如粪便样品、胃肠道样品、血清样品、CSF样品)。

[0086] 在某些情况下,色氨酸的一种或多种下游代谢物水平的改变可能与ASD有关。色氨酸可能通过至少三种主要途径进一步转变为下游代谢物。在某些情况下,色氨酸可能通过犬尿氨酸途径转变为犬尿氨酸或其衍生物。在某些情况下,色氨酸可能通过血清素途径转变为血清素或其衍生物。在某些情况下,色氨酸可能通过吲哚途径转变为吲哚。这些途径中的每一者都可能对ASD具有潜在重要性。

[0087] 在所述血清素途径中,色氨酸羟化酶(TPH)将色氨酸转变为5-羟色氨酸(5-HTP),然后由芳香族氨基酸脱羧酶(AAAD)将其转变为血清素(5-HT)。血清素这种神经递质通过激活5-HT受体而在大脑和外周具有广泛的生理功能。然后血清素本身可以转变为几种分子,包括褪黑素。

[0088] 在某些情况下,相对于一个或多个神经典型个体,患有ASD的个体可能具有改变(例如更高、更低)的血清素水平。在某些情况下,相对于一个或多个神经典型个体,患有ASD的个体可能具有更高的血清素水平(例如在血清样品中)。在某些实施方式中,受试者中的血清素水平可以通过施用益生菌和/或低聚果糖来降低。

[0089] 在某些情况下,相对于一个或多个神经典型个体,患有ASD的个体可能具有改变(例如更高、更低)的褪黑素水平。在某些情况下,相对于一个或多个神经典型个体,患有ASD的个体可能具有更低的褪黑素水平。在某些情况下,褪黑素水平较低可能导致睡眠困难。在某些实施方式中,受试者中的褪黑素水平可以通过施用褪黑素补充剂来提高。

[0090] 在所述犬尿氨酸途径中,色氨酸被色氨酸双加氧酶或吲哚胺双加氧酶转变为犬尿氨酸。然后,犬尿氨酸可以被转变为几种分子,包括但不限于犬尿喹啉酸、黄尿酸、喹啉酸、吡啶甲酸和羟基氨茴酸。

[0091] 在某些情况下,患有ASD的个体中的犬尿氨酸水平可能提高。在肠道中,犬尿氨酸和其他相关分子的水平由细菌和宿主IDO1酶的活性介导。犬尿氨酸及其下游代谢物(包括犬尿喹啉酸、黄尿酸、喹啉酸和吡啶甲酸)具有各种已知的生物过程,包括神经传递、炎症免疫应答和肠道中的黏膜保护作用。包括羟基氨茴酸在内的犬尿氨酸的其他下游代谢物具有神经毒性作用。

[0092] 在某些情况下,相对于一个或多个神经典型个体,患有ASD的个体可能具有改变

(例如更高、更低)的犬尿氨酸和/或其一种或多种代谢物(例如下游代谢物)的水平。在某些情况下,相对于一个或多个神经典型个体,患有ASD的个体可能具有更高的犬尿氨酸和/或其一种或多种代谢物(例如下游代谢物)的水平。在某些情况下,相对于一个或多个神经典型个体,患有ASD的个体可能具有更低的犬尿氨酸和/或其一种或多种代谢物(例如下游代谢物)的水平。

[0093] 吲哚是从色氨酸衍生的第三大类分子。就吲哚而言,微生物群在产生吲哚中发挥主要作用。例如,在某些情况下,细菌生孢梭菌(Clostridium sporogenes)将色氨酸转变为神经递质色胺。在某些情况下,吲哚可能触发来自AhR的信号传导,其可以触发各种免疫应答。

[0094] 在某些情况下,相对于一个或多个神经典型个体,患有ASD的个体可能具有改变(如更高、更低)的吲哚和/或其一种或多种代谢物(例如下游代谢物)的水平。在某些情况下,相对于一个或多个神经典型个体,患有ASD的个体可能具有更高的吲哚和/或其一种或多种代谢物(例如下游代谢物)的水平。在某些情况下,相对于一个或多个神经典型个体,患有ASD的个体可能具有更低的吲哚和/或其一种或多种代谢物(例如下游代谢物)的水平。

[0095] 在一些实施方式中,分支酸可以被转变为酪氨酸和/或苯丙氨酸。在某些情况下,分支酸变位酶可以将分支酸转变为预苯酸,其是酪氨酸和苯丙氨酸的前体。在某些情况下,酪氨酸生物合成和/或苯丙氨酸生物合成的改变可能与个体中的ASD有关。因此,在某些情况下,相对于一个或多个神经典型个体,酪氨酸、苯丙氨酸和/或其一种或多种代谢物(例如下游代谢物)的水平变化可能与ASD有关。在某些情况下,相对于一个或多个神经典型个体,酪氨酸、苯丙氨酸和/或其一种或多种代谢物(例如下游代谢物)的水平较低可能与ASD有关。在某些情况下,相对于一个或多个神经典型个体,酪氨酸、苯丙氨酸和/或其一种或多种代谢物(例如下游代谢物)的水平较高可能与ASD有关。因此,在一些实施方式中,一种方法包括基于来自受试者的样品中酪氨酸、苯丙氨酸和/或其一种或多种代谢物(例如下游代谢物)的水平相对于一个或多个神经典型个体中的水平发生了改变(例如增加、减少),来确定所述受试者患有至少一种ASD亚型(例如分支酸亚型)或具有发生至少一种ASD亚型的风险。所述样品可以是本文描述的任何样品(例如粪便样品、胃肠道样品、血清样品、CSF样品)。

[0096] 因此,在一些实施方式中,可以在来自受试者的样品中评估或在所述受试者中调节芳香族氨基酸(和/或其下游产物)的水平,以便辅助所述受试者中ASD的诊断和/或治疗。

[0097] 叶酸

[0098] 在一些实施方式中,叶酸是分支酸代谢途径内的分子的非限制性实例。在某些情况下,氨基脱氧分支酸合酶(也被称为PABA合酶)将分支酸转向叶酸生物合成。叶酸(也被称为维生素B9)为DNA和RNA合成以及氨基酸代谢所需。叶酸缺乏会导致神经管缺陷,因此,历史上在一些转基因食品中已补充叶酸。人类肠道微生物群的一部分具有能够产生和修饰叶酸的基因。有12种酶参与将分支酸转变为叶酸,其中二氢叶酸还原酶(DHFR)的活性是限速步骤。叶酸还依赖于维生素B12(钴胺素)将N5-甲基四氢叶酸转变为叶酸的活性形式四氢叶酸(THF)。钴胺素通过作为重要转录调控物的辅因子,在叶酸和泛醌生物合成中也发挥重要的调控作用。

[0099] 在某些情况下,与神经典型个体相比,患有ASD的个体中叶酸、其一种或多种衍生物(例如四氢叶酸)和/或参与叶酸生物合成的一种或多种分子(例如钴胺素)的水平被改变

(例如增加、减少)。在某些情况下,患有ASD的个体可能具有提高的针对叶酸受体的循环自身抗体,所述叶酸受体是运输叶酸跨过血脑屏障所需的。这可能导致大脑对叶酸的摄取减少,以及与ASD病理生理学相关的下游后果。在某些情况下,一种治疗患有ASD的个体的方法包括施用叶酸、其衍生物之一和/或参与叶酸生物合成的一种或多种分子,所述方法可能缓解ASD的一种或多种症状(例如语言和沟通困难)。

[0100] 因此,在一些实施方式中,可以在来自受试者的样品中评估和/或在所述受试者中调节叶酸的水平,以辅助所述受试者中ASD的诊断和/或治疗。

[0101] 泛醇和甲萘酚

[0102] 在一些实施方式中,泛醇和甲萘酚是分支酸代谢途径内的分子的非限制性实例。在某些情况下,分支酸当被分支酸裂解酶转变为对羟基苯甲酸时,可能向泛醇和甲萘酚的生产分支。这些分子通常存在于细胞膜中,是电子传递链的一部分。泛醌(也被称为辅酶Q)被用于有氧呼吸,而甲萘醌通常被细菌用于厌氧呼吸和乳酸发酵。甲萘醌也被称为维生素K2,并且可以随着其类异戊二烯碳链的长度而变。甲萘醌-4(MK4)是大脑中维生素K的主要形式,并且在患有ASD的儿童中MK4的血清浓度可能较低。约75%的MK4在肠道中产生,并且据报道在男性中比女性中更高。鉴于MK4在神经发育中的作用,有一些假说认为它可能对ASD的病理生理学是重要的。也有报道称维生素K水平与自闭症严重程度的改善之间存在相关性。在某些相同情况下,由肠道微生物群产生的泛醇和/或甲萘酚水平的改变可能对男性大脑发育具有不成比例的影响。

[0103] 在某些情况下,泛醇和/或甲萘酚生物合成的改变可能与个体中的ASD有关。因此,在某些情况下,相对于一个或多个神经典型个体,泛醇(例如辅酶Q,一种6-13个碳的类异戊二烯链的泛醇)和/或其一种或多种代谢物(例如下游代谢物)水平的改变可能与ASD有关。在某些情况下,相对于一个或多个神经典型个体,甲萘酚(例如甲萘醌-4,一种6-13个碳的类异戊二烯链的甲萘酚)和/或其一种或多种代谢物(例如下游代谢物)水平的改变可能与ASD有关。在某些情况下,泛醇、甲萘酚和/或其代谢产物的水平较低(例如相对于神经典型个体)可能与ASD有关。在某些情况下,泛醇、甲萘酚和/或其代谢产物的水平较高(例如相对于神经典型个体)可能与ASD有关。因此,在一些实施方式中,一种方法包括基于来自受试者的样品中泛醇、甲萘酚和/或其代谢物的水平相对于一个或多个神经典型个体中的水平发生改变(例如增加、减少),来确定所述受试者患有至少一种ASD亚型(例如分支酸亚型)或具有发生至少一种ASD亚型的风险。所述样品可以是本描述的任何样品(例如粪便样品、胃肠道样品、血清样品、CSF样品)。

[0104] 因此,在一些实施方式中,可以在来自受试者的样品中评估和/或在所述受试者中调节泛醇和甲萘酚的水平,以辅助所述受试者中ASD的诊断和/或治疗。

[0105] 铁载体

[0106] 在一些实施方式中,铁载体是分支酸代谢途径内的分子的非限制性实例。铁载体的一个非限制性实例是肠杆菌素。在某些情况下,异分支酸合酶(例如EntC)在从分支酸生产肠杆菌素的第一步中将分支酸转变为异分支酸。铁载体通常被认为是人类和细菌之间争夺金属中的毒力因子。然而,一些研究显示肠杆菌素对秀丽隐杆线虫(C. elegans)的生长具有有益作用。秀丽隐杆线虫中的这种表型与线粒体功能有关,并且在ASD儿童中已观察到线粒体功能障碍。

[0107] 在某些情况下,相对于神经典型个体,在患有ASD的个体中铁载体(例如肠杆菌素)水平可能改变(例如增加、减少)。在某些情况下,相对于神经典型个体铁载体(例如肠杆菌素)的水平较低可能与ASD有关。在某些情况下,相对于神经典型个体铁载体(例如肠杆菌素)的水平较高可能与ASD有关。因此,在一些实施方式中,一种方法包括基于来自受试者的样品中铁载体(例如肠杆菌素)的水平相对于一个或多个神经典型个体中的水平发生改变(例如增加、减少),来确定所述受试者患有至少一种ASD亚型(例如分支酸亚型)或具有发生至少一种ASD亚型的风险。所述样品可以是本文描述的任何样品(例如粪便样品、胃肠道样品、血清样品)。

[0108] 因此,在一些实施方式中,可以在来自受试者的样品中评估和/或在所述受试者中调节铁载体的水平,以辅助所述受试者中ASD的诊断和/或治疗。

[0109] 分支酸亚型和干预

[0110] 一些实施方式涉及用于诊断和/或治疗ASD的分支酸亚型的方法和组合物。

[0111] 根据一些实施方式,一种辅助诊断具有ASD和/或ASD合并症的一种或多种症状的受试者的方法包括确定从所述受试者获得的样品中分支酸和/或分支酸代谢途径内的分子的水平。在一些实施方式中,所述方法还包括如果分支酸和/或所述分支酸代谢途径内的分子的水平高于或低于阈值,则确定所述受试者患有ASD(例如ASD的分支酸亚型)或具有发生ASD的风险。

[0112] 在一些实施方式中,所述分支酸代谢途径内的分子是分支酸的上游或下游代谢物。分支酸的上游代谢物的非限制性实例包括D-赤藓糖4-磷酸、磷酸烯醇式丙酮酸、3-脱氧-D-阿拉伯糖基-庚酮糖酸-7-磷酸、3-脱氢奎尼酸、3-脱氢莽草酸、莽草酸、莽草酸3-磷酸和5-O-(羧基乙烯基)-3-磷酸莽草酸。分支酸的下游代谢物的非限制性实例包括芳香族氨基酸(例如色氨酸、酪氨酸、苯丙氨酸)及其代谢物(例如血清素、褪黑素、犬尿氨酸、吲哚)、叶酸及其衍生物(例如四氢叶酸)、泛醇(例如辅酶Q)、甲萘酚和铁载体(例如肠杆菌素)。

[0113] 在一些实施方式中,确定分支酸和/或所述分支酸代谢途径内的分子的水平包括确定从所述受试者获得的样品中存在的分支酸代谢超级途径内的一个或多个基因的丰度。在某些实施方式中,确定所述一个或多个基因的丰度包括扩增所述样品中存在的一个或多个核酸的至少一部分,以形成多个扩增子。所述一个或多个核酸可以根据本领域中已知的任何核酸扩增方法(例如PCR、qPCR)扩增,以形成多个扩增子。在一些实施方式中,确定所述一个或多个基因的丰度还包括对所述多个扩增子中的一个或多个扩增子进行测序。所述一个或多个扩增子可以根据本领域中已知的任何核酸测序方法(例如长读出测序方法、短读出测序方法)进行测序。

[0114] 在某些情况下,确定从所述受试者获得的样品中存在的分支酸代谢超级途径内的一个或多个基因的丰度包括对所述样品中存在的微生物的16S核糖体RNA(rRNA)的至少一部分进行测序(例如进行16S rRNA基因扩增子(16S)测序)。在某些情况下,确定从所述受试者获得的样品中存在的分支酸代谢超级途径内的一个或多个基因的丰度包括进行鸟枪宏基因组测序,以对所述样品的宏基因组含量进行测序。

[0115] 在一些实施方式中,确定分支酸和/或分支酸代谢途径内的分子的水平包括测量分支酸和/或分支酸代谢途径内的分子的水平(例如使用HPLC、LC-MS、GC-MS和/或MALDI-TOF)。

[0116] 一些实施方式涉及治疗具有ASD和/或ASD合并症的一种或多种症状或具有发生ASD的风险的受试者的方法。ASD合并症的实例包括但不限于强迫症(OCD)、注意力缺陷障碍(ADD)、注意力缺陷多动障碍(ADHD)、癫痫、精神分裂症、睡眠障碍、胃肠道障碍、肥胖症、易怒、焦虑、抑郁和饮食障碍。

[0117] 在某些实施方式中,所述受试者患有ASD的分支酸亚型。在某些情况下,从所述受试者获得的样品可能包含表明所述受试者可能对基于分支酸的干预有响应的一种或多种分子和/或微生物特点的组成丰度。在某些情况下,所述一种或多种分子和/或微生物特点包括肠杆菌目、L-精氨酸降解产物和/或肠杆菌素。在某些情况下,所述一种或多种分子和/或微生物特点包含分支酸代谢超级途径的一种或多种代谢物,包括但不限于莽草酸、分支酸、色氨酸、血清素、褪黑素、苯丙氨酸、酪氨酸、叶酸(例如四氢叶酸)、泛醇(例如辅酶Q)和甲萘酚。在某些情况下,从所述受试者获得的样品可能包含表明所述受试者可能对基于分支酸的干预有响应的一个或多个基因(例如分支酸代谢超级途径内的一个或多个基因)的丰度。

[0118] 在一些实施方式中,所述治疗受试者的方法包括在所述受试者中调节分支酸和/或分支酸代谢途径内的分子的水平,以缓解ASD和/或ASD合并症的一种或多种症状,或降低发生ASD的风险。在一些实施方式中,调节所述水平包括提高所述水平。在一些实施方式中,调节所述水平包括降低所述水平。在某些情况下,调节所述受试者的肠道中的所述水平。

[0119] 在一些实施方式中,调节分支酸和/或分支酸代谢途径内的分子的水平包括向所述受试者施用包含分支酸(chorismate)、分支酸(chorismic acid)和/或其任一者的盐或酯的组合物。在一些实施方式中,调节分支酸和/或分支酸代谢途径内的分子的水平包括向所述受试者施用包含分支酸前药的组合物。在一些实施方式中,调节分支酸和/或分支酸代谢途径内的分子的水平包括向所述受试者施用包含分支酸代谢物(和/或参与分支酸代谢途径的另一种分子)的组合物。在某些实施方式中,所述组合物包含分支酸(chorismate)、分支酸(chorismic acid)和/或其任一者的盐或酯,以及一种或多种分支酸前药。在某些实施方式中,所述组合物包含分支酸(chorismate)、分支酸(chorismic acid)和/或其任一者的盐或酯,以及一种或多种分支酸代谢物(和/或参与分支酸代谢途径的一种或多种其他分子)。在某些实施方式中,所述组合物包含一种或多种分支酸前药和一种或多种分支酸代谢物(和/或参与分支酸代谢途径的一种或多种其他分子)。所述一种或多种分支酸代谢物可以包括一种或多种上游分支酸代谢物(例如莽草酸)和/或一种或多种下游分支酸代谢物(例如色氨酸、苯丙氨酸、酪氨酸、血清素、褪黑素、吲哚、泛醇、甲萘酚例如甲萘醌-4、四氢叶酸、肠杆菌素)。所述参与分支酸代谢途径的一种或多种其他分子可以包括一种或多种酶(例如一种或多种分支酸分支点酶)和/或参与分支酸代谢途径调控的一种或多种分子(例如腺苷钴胺素、钴胺素(也被称为维生素B12))。

[0120] 在一些实施方式中,所述组合物可以作为药物组合物提供,其包含一种或多种药学上可接受的缓冲剂、盐、添加剂或其他药剂。在一些实施方式中,所述组合物(例如药物组合物)可以肠内、肠胃外或通过任何其他适合的途径施用。在一些实施方式中,所述组合物(例如药物组合物)可以口服、直肠、静脉内、肌肉内、通过吸入和/或局部施用。在一些情况下,所述组合物(例如药物组合物)可以采取片剂形式、凝胶胶囊形式、胶囊形式、液体形式或适合口服施用的任何其他形式。在某些情况下,所述组合物(例如药物组合物)可以包括

包衣或被配置以提供所述组合物的活性成分的pH依赖性和/或时间依赖性释放的其他系统。在某些情况下,所述组合物(例如药物组合物)可以包括包含pH依赖性结肠释放包衣的胶囊。在某些情况下,所述组合物(例如药物组合物)被配置为用于静脉内施用。

[0121] 在一些实施方式中,组合物(例如药物组合物)包含药学上可接受的载体(例如与所述组合物一起施用的稀释剂、佐剂、赋形剂或溶媒)。此类药物载体可以是无菌液体例如水和油,包括石油例如矿物油、植物油例如花生油、大豆油和芝麻油、动物油或合成来源的油。盐水溶液以及葡萄糖和甘油水溶液也可以用作液体载体。

[0122] 在一些实施方式中,组合物(例如药物组合物)以有效量,例如以足以缓解(例如延迟或减少发作、进展和/或严重程度)ASD和/或ASD合并症的一种或多种症状的量施用到受试者。在一些实施方式中,所述组合物(例如药物组合物)以足以降低受试者发生ASD的风险的量施用到受试者。在某些情况下,调节分支酸和/或分支酸代谢途径内的分子的水平包括改变所述受试者的饮食以增加分支酸摄入。

[0123] 在某些实施方式中,调节分支酸和/或分支酸代谢途径内的分子的水平包括向所述受试者施用调节(例如增加、减少)分支酸代谢途径中的一种或多种酶的表达和/或活性的组合物(例如药物组合物)。在一些实施方式中,所述组合物(例如药物组合物)包含所述一种或多种酶的激动剂、拮抗剂、激活剂和/或抑制剂。在一些实施方式中,所述一种或多种酶包括分支酸分支点酶。在一些实施方式中,分支酸变位酶被调节。在一些实施方式中,分支酸裂解酶被调节(例如抑制)。在一些实施方式中,异分支酸合酶被调节(例如抑制)。在一些实施方式中,氨基脱氧分支酸合酶(也被称为PABA合酶)被调节(例如抑制)。在一些实施方式中,邻氨基苯甲酸合酶被调节。

[0124] 在某些实施方式中,调节分支酸和/或分支酸代谢途径内的分子的水平包括向所述受试者施用调节(例如增加、减少)所述受试者的胃肠道中产生分支酸和/或分支酸代谢途径内的分子的微生物的量的组合物(例如药物组合物)。在一些实施方式中,所述组合物(例如药物组合物)包含一种或多种抗生素、益生元化合物和/或益生菌化合物。在某些情况下,所述一种或多种抗生素包括万古霉素、非达霉素和/或甲硝唑。

[0125] 在一些实施方式中,降低发生ASD的风险和/或治疗ASD和/或ASD合并症的一种或多种症状的方法包括提供模拟分支酸相关基因的典型代表性和/或以恢复分支酸相关基因的典型代表性的方式调节微生物组的微生物。在一些实施方式中,提供一种或多种分支酸相关分子的补充剂可用于将微生物组导向分支酸相关基因的典型表现,从而有助于治疗自闭症的一种或多种症状。

[0126] 所述组合物(例如药物组合物)可以施用到任何年龄的受试者(例如儿童、成年人)。在一些实施方式中,所述组合物(例如药物组合物)可以长期施用。在某些实施方式中,所述组合物(例如药物组合物)可以在超过30天、3个月、6个月、9个月、1年、3年、5年、10年或20年的时间段内施用。在某些实施方式中,所述组合物(例如药物组合物)可以在1-3个月、1-6个月,1-9个月、1个月至1年、1个月至3年、1个月至5年、1个月至10年、1个月至20年、3-6个月、3-9个月、3个月至1年、3个月至3年、3个月至5年、3个月至10年、3个月至20年、6-9个月、6个月至1年、6个月至3年、6个月至5年、6个月至10年、6个月至20年、1-3年、1-5年、1-10年、1-20年、3-5年、3-10年、3-20年、5-10年、5-20年或10-20年的时间段内施用。在一些实施方式中,组合物(例如药物组合物)每天、每周、每月或以更短或更长的时间间隔施用。在一

些实施方式中,组合物(例如药物组合物)被施用直到指示ASD风险的一种或多种生物标志物降低。在一些实施方式中,组合物(例如药物组合物)以足以缓解ASD和/或ASD合并症的一种或多种症状或降低发生ASD的风险的量施用。

[0127] 微生物体

[0128] 根据一些实施方式,一种辅助诊断具有ASD和/或ASD合并症的一种或多种症状的受试者的方法包括确定从所述受试者获得的样品中一种或多种微生物特点(例如微生物体)和/或其副产物(例如毒素)的丰度。在一些实施方式中,所述方法还包括如果一种或多种微生物特点(例如微生物体)和/或其副产物(例如毒素)的丰度高于或低于阈值,则确定所述受试者患有ASD(例如ASD的八叠球菌亚型)或具有发生ASD的风险。

[0129] 微生物体的非限制性实例包括八叠球菌(Sarcina)、普氏菌(Prevotella)(例如粪普氏菌(P. stercorea))、双歧杆菌(Bifidobacteria)、放线菌(Actinobacteria)、拟杆菌(Bacteroidetes)、变形杆菌(Proteobacteria)、迟缓埃格特菌(Eggerthella lenta)、肠杆菌(Enterobacteriaceae)、气单胞菌(Aeromonas)、土壤杆菌(Agrobacterium)、肠球菌(Enterococcus)、放线杆菌(Actinobacillus)、乳酸杆菌(Lactobacillus)和/或链球菌(Streptococcus)。在某些实施方式中,所述微生物体是八叠球菌细菌。在某些实施方式中,所述微生物体包括胃八叠球菌(Sarcina ventriculi)(也被称为胃梭菌(Clostridium ventriculi))。在某些实施方式中,所述微生物体包括产气荚膜梭菌(Clostridium perfringens)。在某些情况下,样品具有升高水平的八叠球菌细菌(例如相对于神经典型个体)的受试者可以被称为患有ASD的八叠球菌亚型。

[0130] 一些实施方式涉及治疗具有ASD和/或ASD合并症的一种或多种症状或具有发生ASD的风险的受试者的方法。在某些实施方式中,所述受试者患有ASD的八叠球菌亚型。在一些实施方式中,所述方法包括调节所述受试者中一种或多种微生物体(例如胃八叠球菌(S. ventriculi)和/或其他八叠球菌细菌)的水平,以缓解ASD和/或ASD合并症的一种或多种症状或降低发生ASD的风险。在某些情况下,在所述受试者的肠道中调节所述一种或多种微生物体的水平。在一些实施方式中,调节所述一种或多种微生物体的水平包括降低所述水平。在某些情况下,调节所述水平包括向所述受试者施用包含一种或多种抗生素和/或噬菌体疗法的组合物。在一些实施方式中,调节所述水平包括提高所述水平。在某些情况下,调节所述一种或多种微生物体的水平包括向所述受试者施用包含一种或多种益生元和/或益生菌的组合物。

[0131] 在一些实施方式中,所述组合物(例如包含一种或多种抗生素、噬菌体、益生元化合物和/或益生菌化合物的组合物)可以作为药物组合物提供,所述药物组合物包含一种或者多种药学上可接受的缓冲剂、盐、添加剂或其他药剂。在一些实施方式中,所述组合物(例如药物组合物)可以肠内、肠胃外或通过任何其他适合的途径施用。在一些实施方式中,所述组合物(例如药物组合物)可以口服、直肠、静脉内、肌肉内、通过吸入和/或局部施用。在一些情况下,所述组合物(例如药物组合物)可以采取片剂形式、凝胶胶囊形式、胶囊形式、液体形式或适合口服施用的任何其他形式。在某些情况下,所述组合物(例如药物组合物)可以包括包衣或被配置以提供所述组合物的活性成分的pH依赖性和/或时间依赖性释放的其他系统。在某些情况下,所述组合物(例如药物组合物)可以包括包含pH依赖性结肠释放包衣的胶囊。在某些情况下,所述组合物(例如药物组合物)被配置为用于静脉内施用。

[0132] 在一些实施方式中,组合物(例如药物组合物)包含药学上可接受的载体(例如与所述组合物一起施用的稀释剂、佐剂、赋形剂或溶媒)。此类药物载体可以是无菌液体例如水和油,包括石油例如矿物油、植物油例如花生油、大豆油和芝麻油、动物油或合成来源的油。盐水溶液以及葡萄糖和甘油水溶液也可以用作液体载体。

[0133] 在一些实施方式中,组合物(例如药物组合物)以有效量,例如以足以缓解(例如延迟或减少发作、进展和/或严重程度)ASD和/或ASD合并症的一种或多种症状的量施用到受试者。在一些实施方式中,所述组合物(例如药物组合物)以足以降低受试者发生ASD的风险的量施用到受试者。

[0134] 所述组合物(例如药物组合物)可以施用到任何年龄的受试者(例如儿童、成年人)。在一些实施方式中,所述组合物(例如药物组合物)可以长期施用。在某些实施方式中,所述组合物(例如药物组合物)可以在超过30天、3个月、6个月、9个月、1年、3年、5年、10年或20年的时间段内施用。在某些实施方式中,所述组合物(例如药物组合物)可以在1-3个月、1-6个月,1-9个月、1个月至1年、1个月至3年、1个月至5年、1个月至10年、1个月至20年、3-6个月、3-9个月、3个月至1年、3个月至3年、3个月至5年、3个月至10年、3个月至20年、6-9个月、6个月至1年、6个月至3年、6个月至5年、6个月至10年、6个月至20年、1-3年、1-5年、1-10年、1-20年、3-5年、3-10年、3-20年、5-10年、5-20年或10-20年的时间段内施用。在一些实施方式中,组合物(例如药物组合物)每天、每周、每月或以更短或更长的时间间隔施用。在一些实施方式中,组合物(例如药物组合物)被施用直到指示ASD风险的一种或多种生物标志物(例如八叠球菌细菌的水平)降低。在一些实施方式中,组合物(例如药物组合物)以足以缓解ASD和/或ASD合并症的一种或多种症状或降低发生ASD的风险的量施用。

[0135] 质子通量

[0136] 根据一些实施方式,一种辅助诊断具有ASD和/或ASD合并症的一种或多种症状的受试者的方法包括从所述受试者获得的样品确定所述受试者的胃肠道中质子通量的水平。在一些实施方式中,所述方法还包括如果质子通量的水平高于阈值,则确定所述受试者患有ASD(例如ASD的质子通量亚型)或具有发生ASD的风险。

[0137] 一些实施方式涉及治疗具有ASD和/或ASD合并症的一种或多种症状或具有发生ASD的风险的受试者的方法。在某些实施方式中,所述受试者患有ASD的质子通量亚型。在一些实施方式中,所述方法包括调节所述受试者的胃肠pH,以缓解ASD和/或ASD合并症的一种或多种症状或降低发生ASD的风险。在一些实施方式中,调节pH包括提高pH。在一些实施方式中,调节pH包括降低pH。在一些实施方式中,调节胃肠pH包括向受试者施用被配置以调节所述受试者的胃肠pH的组合物或治疗。在一些实施方式中,所述组合物或治疗包含一种或多种质子泵抑制剂。质子泵抑制剂的非限制性实例包括奥美拉唑、兰索拉唑、泮托拉唑、雷贝拉唑、埃索美拉唑、右兰索拉唑及其衍生物。在一些实施方式中,所述组合物或治疗包含被配制用于结肠释放的次水杨酸铋或其衍生物。

[0138] 在一些实施方式中,所述组合物(例如包含一种或多种质子泵抑制剂和/或次水杨酸铋或其衍生物的组合物)可以作为药物组合物提供,所述药物组合物包含一种或者多种药学上可接受的缓冲剂、盐、添加剂或其他药剂。在一些实施方式中,所述组合物(例如药物组合物)可以肠内、肠胃外或通过任何其他适合的途径施用。在一些实施方式中,所述组合物(例如药物组合物)可以口服、直肠、静脉内、肌肉内、通过吸入和/或局部施用。在一些情

况下,所述组合物(例如药物组合物)可以采取片剂形式、凝胶胶囊形式、胶囊形式、液体形式或适合口服施用的任何其他形式。在某些情况下,所述组合物(例如药物组合物)可以包括包衣或被配置以提供所述组合物的活性成分的pH依赖性和/或时间依赖性释放的其他系统。在某些情况下,所述组合物(例如药物组合物)可以包括包含pH依赖性结肠释放包衣的胶囊。在某些情况下,所述组合物(例如药物组合物)被配置为用于静脉内施用。

[0139] 在一些实施方式中,组合物(例如药物组合物)包含药学上可接受的载体(例如与所述组合物一起施用的稀释剂、佐剂、赋形剂或溶媒)。此类药物载体可以是无菌液体例如水和油,包括石油例如矿物油、植物油例如花生油、大豆油和芝麻油、动物油或合成来源的油。盐水溶液以及葡萄糖和甘油水溶液也可以用作液体载体。

[0140] 在一些实施方式中,组合物(例如药物组合物)以有效量,例如以足以缓解(例如延迟或减少发作、进展和/或严重程度)ASD和/或ASD合并症的一种或多种症状的量施用到受试者。在一些实施方式中,所述组合物(例如药物组合物)以足以降低受试者发生ASD的风险的量施用到受试者。

[0141] 所述组合物(例如药物组合物)可以施用到任何年龄的受试者(例如儿童、成年人)。在一些实施方式中,所述组合物(例如药物组合物)可以长期施用。在某些实施方式中,所述组合物(例如药物组合物)可以在超过30天、3个月、6个月、9个月、1年、3年、5年、10年或20年的时间段内施用。在某些实施方式中,所述组合物(例如药物组合物)可以在1-3个月、1-6个月,1-9个月、1个月至1年、1个月至3年、1个月至5年、1个月至10年、1个月至20年、3-6个月、3-9个月、3个月至1年、3个月至3年、3个月至5年、3个月至10年、3个月至20年、6-9个月、6个月至1年、6个月至3年、6个月至5年、6个月至10年、6个月至20年、1-3年、1-5年、1-10年、1-20年、3-5年、3-10年、3-20年、5-10年、5-20年或10-20年的时间段内施用。在一些实施方式中,组合物(例如药物组合物)每天、每周、每月或以更短或更长的时间间隔施用。在一些实施方式中,组合物(例如药物组合物)被施用直到指示ASD风险的一种或多种生物标志物(例如高质子通量)降低。在一些实施方式中,组合物(例如药物组合物)以足以缓解ASD和/或ASD合并症的一种或多种症状或降低发生ASD的风险的量施用。

[0142] 用于评估受试者患有或发生ASD的风险的技术和系统

[0143] 在一些实施方式中,一旦从来自受试者的样品确定了一个或多个特征(例如分子和/或微生物特点的丰度),就可以用风险分析设施分析所述一个或多个特征,以评估所述受试者患有或发生ASD的风险和/或鉴定为所述受试者提供的治疗。所述风险分析设施可以在软件中实现,例如在由一个或多个服务器、一个或多个实验室设备(例如接收、制备和分析样品(如粪便样品)的实验室设备)、一个或多个个人计算设备或移动计算设备或其他设备执行的可执行指令中。

[0144] 在使用风险分析设施操作的一些此类实施方式中,受试者患有或发生ASD的风险的分析和/或鉴定治疗的分析在一些实施方式中可以使用一个或多个规则来执行。例如,当满足规则或规则的组合时,可以确定受试者具有较高或较低的ASD风险,或者可以发现其是否是特定治疗的候选者。在某些情况下,此类规则可能涉及在所述受试者的微生物组内检测到的一种或多种分子和/或微生物类型的水平或所述分子和/或微生物的量或相对量。作为一个具体实例,如果受试者的粪便样品显示出所述粪便样品内特定微生物的相对丰度,则可以发现所述患者具有提高的ASD风险。

[0145] 在一些实施方式中,除了基于规则的分析之外或作为其替代方案,风险分析设施可以利用经过训练的机器学习模型来评估受试者患有或发生ASD的风险,或鉴定为所述患者提供的治疗。在实现机器学习模型的一些实施方式中,此类机器学习模型可以基于被诊断为ASD的人群和未被诊断为ASD的人群的一个或多个特征(例如分子和/或微生物特点的丰度)来训练,并且作为所述训练的结果,可能已经学会了样品特征(例如分子和/或微生物特点的丰度)与ASD的存在与否和/或某些特征的成功与否之间的关系。在一些此类实施方式中,一旦通过分析样品获得了一个或多个特征,就可以将所述一个或多个特征输入到所述机器学习模型中。在一些此类实施方式中,所述机器学习模型可以通过将所述受试者的微生物组或所述受试者的分类输出到一组类别中的特定类别中,来做出响应。每个类别都可能与患有或发生ASD的风险或特定风险水平和/或是否是特定治疗的候选者有关。在其他实施方式中,每个类别都可以另外或可选地与ASD亚型相关,其中ASD的每个亚型对应于风险水平、受试者可能患有或发生的ASD类型、受试者可能经历的症状的可能组合、症状的严重程度或受试者可能有患病或发生风险的ASD病症的其他特征。在一些实施方式中,机器学习引擎可能输出一组一个或多个类别,而不是输出单个类别,并且对于每个类别而言,输出与所述类别相关联的置信度,所述置信度指示由所述机器学习引擎计算的所述受试者被正确分类到该类别中的可能性。然后,可以通过风险分析设施对所述可能性各自进行评估,以鉴定所述受试者将被鉴定为分类在其中的一个或多个类别。例如,具有最高可能性的类别可以被鉴定为受试者适合的类别。作为另一个实例,可以仅进一步分析可能性高于第一阈值的类别,并且可以从这些类别中确定哪个/哪些是所述受试者将被鉴定为匹配的类别。例如,可以鉴定最高的类别,或者比其他类别更有可能超过阈值量的一个或多个类别。

[0146] 在使用风险分析设施的实施方式中,一旦通过所述风险分析设施将受试者鉴定为符合某个或某些标准(例如通过规则分析、机器学习分析例如分类或另一种分析),所述风险分析设施就可以启动与所述一个或多个标准一致的诊断或治疗工作流程。例如,工作流程可以包括向临床医生(例如实验室技术人员、医生、护士等)输出所满足的一个或多个标准和与那些标准的满足相关的风险、诊断、治疗建议或其他信息的确定结果。作为另一个实例,所述工作流程可以包括开出治疗,例如启动与所述一个或多个标准或与风险或治疗建议相关的治疗处方的订单。作为另一个实例,所述工作流程可能包括安排后续分析,例如由医生(如心理医生、神经科医生或其他医生)进行的发育监测或筛查或其他评估,以确认所述风险或治疗建议,或获取关于所述风险的额外信息以告知治疗计划。

[0147] 在鉴定提供给受试者以降低发生风险或减轻或缓解ASD或ASD合并症的症状的治疗的实施方式中,可以利用各种适合的疗法。在一些实施方式中,所述疗法可能与微生物特点、例如用于评估受试者患有或发生ASD的风险的微生物特点有关。此类疗法可能包括将一种或多种特定微生物引入到患者的微生物组中,或引入一种或多种化合物(如药物、药品等)以促进特定微生物生长的治疗。这种促进生长的治疗可能包括施用益生菌或益生元。此类疗法可以另外地或可选地包括试图从受试者的微生物组中去除微生物或阻止特定微生物生长的治疗,例如通过抗生素或噬菌体疗法。此类疗法还可以另外地或可选地包括引入或提高微生物分子或与微生物相关的其他化合物(例如由微生物产生或源于微生物的有益化合物,或由微生物产生或源于微生物的毒素或有害或无益化合物)的流行率,或去除或降低其流行率的治疗。基于微生物特点的疗法可能包括促进患者的微生物组变得更类似于目

标微生物组的疗法,例如,通过使微生物的组成比患者当前的微生物组组成更类似于目标微生物组的组成。

[0148] 实施例1

[0149] 在本实施例中,进行了现有ASD微生物组数据的定量荟萃分析。评估了16S核糖体RNA基因扩增子(16S)测序方法、性别、地理位置、对照类型和年龄对检测ASD微生物组差异的影响,以及这些因素可以如何影响ASD状态的机器学习预测结果。所述数据源自13个已发表的病例对照队列和一个来自美国肠道项目(AGP)的精选队列。对所述队列进行了单独和整体分析,以得出ASD肠道微生物组与发育神经典型个体有何不同的结论。

[0150] 纳入的研究和样品人口统计

[0151] 根据系统回顾和荟萃分析的优选报告项目(PRISMA),精选了一个由14个不同病例对照队列组成的数据集。得到的数据集共有1740个样品,其中888个被诊断为ASD,852个是典型发育对照。最大的队列从AGP的参与者中手动精选(n = 524),其他大型队列来自Dan等(n = 286)和Chen 2020(n = 246)。对照受试者以严格控制技术变异性同时基于各种所选变量找到最佳匹配的方式从AGP中选出。这种方法产生了一个对照队列,其在很大程度上反映了AGP的ASD受试者的人口统计学特征。总的来说,大多数样品来自男性,这符合ASD在男性中的发病率高的总体趋势。所述研究通常包括2-6岁的参与者,但值得注意的例外是Kong等和Kang等的研究,其包括老年个体。其中13个队列代表了来自美国(n = 1079)和中国(n = 866)的样品,并且Zurita等,2019这项研究在厄瓜多尔进行。此外,大量样品(n = 1280)靶向16S V4高变区进行处理,357个样品从16S V3-V4区测序,103个样品从V1-V2区处理。大多数研究使用了来自无关对照的年龄和性别匹配的样品,而两项研究使用了兄弟姐妹,两项研究使用了ASD儿童的母亲。

[0152] 评估ASD微生物组多样性的差异

[0153] 为了解决ASD中微生物组多样性是否改变的问题,在逐个研究和聚合数据集两种方法上评估了多种α和β多样性指标。对于β多样性而言,测试了两种常用的距离指标——未加权和加权UniFrac。这些指标是通告系统发育的指标,并没有在所述数据集的所有原始报告中使用。总的来说,通过研究观察到未加权和加权UniFrac距离指标两者的显著聚类,尽管对于未加权UniFrac距离而言效果明显更强(未加权UniFrac PERMANOVA P < 0.001,伪F = 42.15;加权UniFrac PERMANOVA P < 0.001,伪F=18.54)(图3A-3B)。这一观察结果可能表明,低丰度的研究独特的微生物可能增加研究分离并驱动研究差异。尽管不如研究效果显著,但在未加权UniFrac距离中观察到按ASD状态的显著聚类(PERMANOVA P < 0.001,伪F=3.99),但在加权UniFrac距离中没有观察到(PERMANOVA P = 0.162,伪F统计量 = 1.48)。还观察到与所使用的16S高变区相关的强烈分离,突出了说明使用哪个可变区的重要性。在未加权UniFrac距离中也观察到与测序深度和地理位置相关的差异,尽管这些结果被可变区域和研究的影响所混淆。

[0154] 鉴于由样品所来自的研究驱动的对β多样性结果的强烈混淆作用,对每个队列单独进行了进一步分析。根据加权或未加权UniFrac距离指标,14个队列中的8个在ASD肠道微生物组方面与神经典型对照相比显示出统计显著的差异(PERMANOVA P < 0.05)(图3C)。这些结果表明,在检测ASD与对照之间的β多样性差异中存在可变性,尽管它在大多数研究中和在总体分析研究时都可以检测到。

[0155] 还分析了每个研究的ASD状态对样品内微生物多样性的影响。使用了四个α多样性指标:Faith系统发育多样性、Shannon多样性、均匀度和观察到的特点。对于所有指标而言研究效果都很大,需要对14个队列中的每一者单独进行分析。对于所使用的四个α多样性指标中的每一者而言,至少有三项研究显示了ASD与神经典型对照之间α多样性值的统计显著差异(学生t检验,P < 0.05)(图3D)。在14个队列中,7个队列在所述四个指标中的至少一个指标上显示出ASD与神经典型对照之间α多样性的统计显著差异(图3D)。总的来说,研究表明在ASD受试者中α多样性小幅下降(所观察的特点的ASD/对照差异的中位数 = +0.04%,均匀度 = -2.5%,Shannon = -0.09%,Faith = -1.2%)。这些结果表明ASD与α多样性之间的关联尚不清楚。这种差异的潜在原因稍后将在本实施例中描述。

[0156] ASD与对照之间微生物相对丰度的差异

[0157] 在逐个研究水平上评估了ASD与对照受试者之间微生物相对丰度的差异,汇总了不同系统发育水平下的数据。很少的门始终存在显著差异;最常见的显著门是拟杆菌门,有四项研究达到统计学显著(图4A)。尽管没有达到统计学显著,但大多数队列确实显示放线菌门和变形菌门增加(图4A)。还研究了特定门的比例。在Berding等,2020、Cao等,2021、Dan等,2020、David等,2021、Huang等,2021、Fouquier等,2021、Kong等,2019、Liu等,2019和Son等,2015中发现在ASD个体中厚壁菌门与拟杆菌门的比率升高(图4A)。相比之下,在Zou等,2021、Chen等,2020和Kang等,2017中,厚壁菌门与拟杆菌门的比率降低(图4A)。美国和中国的样品之间没有发现这一比率的显著差异。

[0158] 相对丰度具有显著差异的最常见属是普氏菌属(Prevotella),对其而言五个队列达到了统计学显著(未调整的P < 0.05)(图4B)。然而,关于普氏菌属在ASD受试者中是增加还是减少的研究存在分歧(图4B)。在纲和目的水平上常见的ASD关联也不一致地增加或减少,尽管大多数研究表明ASD受试者中肠杆菌纲的丰度增加。

[0159] 在总体分析数据时,也很少有分类群能够推广到整个数据集。几个值得注意的例外包括放线菌纲,与对照相比其在ASD儿童中明显更高(Wilcoxon t检验P = 0.0014,图4C)。尽管对于普氏菌属而言逐个研究的发现不一致,但发现总体趋势表明与对照相比在ASD样品中减少(Wilcoxon t检验,P = 0.044,图4D)。聚合数据中最强的发现之一证实了过去与ASD受试者中双歧杆菌属的增加的关联(Wilcoxon t检验,P = 0.0015,图4E)。

[0160] 分支酸连接了几个在ASD中通常改变的微生物途径

[0161] 尽管在研究之间存在分类学不一致性,但ASD受试者由微生物组编码的功能途径可能更具可概括性。为了测试这种可能性,对ASD和对照受试者的每个样品的代谢途径丰度进行了评估和比较。在评估了最常见的显著途径后,观察到在ASD受试者中通常提高和通常降低的两种主要的途径聚类模式(图4F)。特别有趣的是,几个通常鉴定到的途径共享共同的分子前体分支酸。

[0162] 分支酸是莽草酸途径的产物,所述途径在人类中不存在。分支酸可以被转化为几种重要的分子,包括甲萘酚和泛醇。鉴定了在三项或更多项研究中显著的18条涉及各种甲萘酚和泛醇的生物合成的途径(图4G)。这些途径包括甲萘酚6-13的生物合成,所述甲萘酚6-13在ASD中大大增加,除了Zou等人的研究之外(其显示在ASD受试者中显著减少)(图4G)。

[0163] 甲萘醌和泛醌分别是参与细菌厌氧和有氧呼吸的重要分子,并且可以从分支酸合成。

[0164] 芳香族氨基酸(AAA)也是源自分支酸的产物。从分析中看出,在14项研究中的4项中ASD受试者中的L-色氨酸生物合成显著改变(P < 0.05),并且在9项中增加(图4F)。然而,与其他芳香族氨基酸L-酪氨酸和苯丙氨酸相关的途径通常并不同样显著,尽管在14个队列中的8个队列中,ASD中的L-酪氨酸降解增加(图4H)。还注意到,其他氨基酸相关途径例如L-苏氨酸生物合成和L-谷氨酸和L-谷氨酰胺生物合成,在5个队列中均显著减少(图4F)。这些结果支持了以前注意到的ASD患者中氨基酸代谢的差异,并将所述分析扩展到新的队列。

[0165] 源自分支酸的其他分子包括铁载体和叶酸,在几项ASD研究中也发现它们发生了改变。肠杆菌素是一种金属螯合铁载体,在Dan等、Huang等和Zou等中被鉴定为发生了显著变化(图4H)。在4项研究中进一步鉴定了四氢叶酸生物合成显著降低(图4H)。此外,在14个队列中的10个队列中腺苷钴胺素生物合成(也被称为维生素B12)减少,其中4个队列达到了一致的显著性(图4F)。维生素B12催化高半胱氨酸转变为甲硫氨酸和四氢叶酸,对叶酸水平起限速步骤的作用。

[0166] 评估机器学习在ASD状态预测方面的性能

[0167] 微生物组与ASD之间的关系可能是非线性的,并且不太可能通过还原论的方法鉴定。因此,利用各种机器学习方法来评估ASD肠道微生物组是否可以与神经典型个体的肠道微生物组区分开。在14个数据集的集合中,使用11种不同的分类算法评估了预测ASD状态的性能和准确性(图5A)。所有11个模型的表现至少略好于通过使受试者工作特性曲线下面积大于0.5所确定的机会(图5A)。表现最好的模型梯度提升分类器(GBC)和adaboost分类器(ABC),能够以大于0.6的曲线下面积(AUC)将ASD个体与对照区分开(GBC;AUC = 0.62 ± 0.03,ABC;AUC = 0.61 ± 0.02)(图5A)。使用每个模型的F1评分来评估精确度和查全率,发现GBC和ABC模型的表现分别为0.62 ± 0.03和0.62 ± 0.02。通过评估每个模型的分类准确性来评估每个模型的性能。GBC和ABC模型报告的最大准确性百分数分别为62% ± 0.03和61% ± 0.02。在所有指标中,GBC在分类ASD状态方面表现最佳,因此被选择用于下游分析。

[0168] 由于最初的机器学习模型比较是在扩增子测序变体(ASV)上进行的,因此了解分类分辨率如何影响模型的性能和准确性是令人感兴趣的。使用GBC模型对七个不同分类水平(界、门、纲、目、科、属、种、ASV)上的未折叠或聚合的读出计数数据进行了50次随机训练测试分割的迭代。提高分类分辨率改进了模型的准确性,在属水平分类之后仅略有提高(图5B)。当使用adaboost和决策树分类器进行相同的分析时,观察到类似的趋势。单独地训练和测试每个数据集,GBC模型在除了三个数据集之外的所有数据集中表现都优于机会(AUC > 0.5),其中五个具有高于0.70的AUC(图5B)。这些结果表明,ASD肠道微生物组可能包含有益于评估ASD状态的信息。

[0169] 接下来研究了区分患有ASD的个体和对照的重要特点。来自在聚合ASV水平数据集上训练和测试的GBC模型的排名前三的特点是来自八叠球菌属(梭菌科)、迟缓埃格特菌(Eggerthella lenta)和粪普氏菌(Prevotella stercorea)的ASV(图5C)。在排名前25的特点中,来自八叠球菌、假单胞菌属和Uruburuella suis的ASV的相对丰度增加对ASD分类是重要的,而来自TM7-3纲、拟杆菌门、Coporobacillus cateniformis和梭状梭菌(Clostridium clostridioforme)的ASV丰度增加对对照分类是重要的(图5C)。为了为发现提供更多背景,进一步评估了来自聚合数据集的排名前25的特点对在每个单独数据集上产

生的GBC模型中预测ASD状态的重要性。这些特点对每个数据集的重要性评分的层次聚类揭示了两个主要分组(图5D)。特别有趣的是一组特点在所有数据集中都含有类似高的重要性评分。这个组包括来自迟缓埃格特菌(Eggerthella lenta)、八叠球菌属、嗜胆菌属(Bilophila)、Veilonella parvula和巨球形菌属的ASV。这些排名靠前的特点强调,尽管研究之间结果存在非均一性,但有几个微生物特点可以一致地用于ASD分类。

[0170] 评估研究设计对研究结果的影响

[0171] 为了解决文献中报道并在本实施例中强调的ASD微生物组结果的可变性问题,我们试图评估研究设计因素如何影响ASD微生物组研究的结果。其中一些因素包括但不限于16S测序方法、地理位置、性别、年龄以及对照受试者与ASD受试者的关系。关于16S测序方法的各种技术选择,评估了测序深度和16S高变区选择的影响。

[0172] 在数据中包含的16S高变区中,一项研究针对V1-V2区,5项研究使用V3-V4区,8项研究使用V4区。鉴于利用V1-V2可变区进行的研究数量有限,V1-V2样品被排除在本分析之外。发现利用V3-V4可变区的研究在ASD受试者中具有显著更高的普氏菌属相对丰度(P = 4.61E-3),而针对V4区的研究在ASD受试者中具有显著更低的该属的相对丰度(P = 5.6E-4)(图6A)。从逐个研究的角度,在比较普氏菌属的ASD/对照相对丰度比率时,这也是一致的(P = 0.011)(图6A)。还发现,在V3-V4与V4区域之间,普氏菌属与拟杆菌门、脱硫弧菌目和δ变形菌纲的比率不同(逐个研究Wilcoxon t检验分别为P = 0.017、0.011和0.011)(图6B-6D)。在总体分析数据而不是逐个研究分析数据时,注意到在V3-V4研究之间对脱硫弧菌目和δ变形菌纲可以发现显著差异,而在V4样品之间没有发现差异(两者在V3-V4 ASD中均减少,P = 0.015)。

[0173] 尽管通过测序的可变区鉴定到与ASD的分类关联之间的差异,但在两个数据集上训练的机器学习模型表现良好,高于机会,而V3-V4数据的表现优于V4数据(V4和V3-V4模型的平均AUC分别为0.65和0.70)(图6E)。这些结果表明,取决于测序的16S高变区,可能会出现显著的分类学差异,但当利用V4或V3-V4高变区时,为ASD分类而建立的机器学习模型是可行的。

[0174] 在测序深度方面,在数据集中注意到分裂,其中6项研究以相对较低的测序深度进行测序(每个样品测序约6000个读出序列),8项研究以较高的测序深度进行测序(每个样品测序最少14000个读出序列)。正如通过AUC、准确性和F1统计量所评估的,与每个样品最少6000个读出序列的队列相比,在来自每个样品最少14000个读出序列的队列的样品上训练的模型的性能存在显著差异(图6E)。在使用高测序深度的研究的数据上训练的模型具有0.75的平均AUC,而使用低测序深度的研究具有0.59的平均AUC。然而,从分类学的角度来看,没有发现测序深度对ASD与对照的相对丰度差异具有显著影响。这些结果表明,增加测序深度可能对准确的ASD分类是重要的,但不影响分类结果。

[0175] 接下来,评估了与研究参与者的人口统计学相关的方面可能如何改变ASD微生物组结果。对于地理位置的影响而言,将队列按每项研究的受试者来自哪个国家进行划分。美国研究与中国研究相比,在ASD与对照的相对丰度比方面没有发现统计学显著的差异。然而,在GBC模型根据国家对ASD和对照样品进行分类的能力方面发现了显著差异(图6F)。已发现,所述模型在中国样品上表现更好,平均AUC为0.78,与此相比在来自美国的样品上AUC为0.6。这些结果表明,地理位置可能是利用肠道微生物组进行ASD分类的重要因素。

[0176] 一些研究使用了年龄和性别匹配的对照,而其他研究使用了家庭对照例如兄弟姐妹或母亲。在ASD与对照的相对丰度比方面,没有发现使用亲缘个体作为对照与使用无亲缘个体之间存在统计学显著的差异。与使用亲缘对照的队列相比,GBC模型从使用无亲缘对照的队列分类ASD和对照的能力存在显著差异(图6F)。与使用亲缘对照的队列(其平均AUC为0.54)相比,所述模型在使用无亲缘对照的队列的样品中表现更好,平均AUC为0.71。这表明,当对照与ASD个体无亲缘时,ASD个体与对照相比微生物分布情况可能存在更大的差异。

[0177] 还评估了性别如何影响ASD和对照个体的微生物分布情况以及机器学习模型的诊断准确性。将样品按性别分开,并将用于预测女性ASD状态的模型的AUC与男性进行比较(图6F)。观察到从男性样品预测ASD状态的准确性更高,平均AUC为0.67,与此相比从女性样品的AUC为0.55(图6F)。由于每个数据集中的女性数量有限,因此没有在逐个研究的基础上检查ASD与对照的分类学差异。然而,男性样品与女性样品相比ASD状态的预测准确性的差异可能表明了性别对微生物分布情况和后续预测准确性的影响。

[0178] 已知肠道微生物组的微生物组成在人类发育过程中会发生变化。因此,评估了样品的年龄如何影响预测ASD状态的能力。为此,将数据在1至16岁之间的每个潜在年龄段下分为子集,并比较了GBC模型在预测ASD状态方面的性能(图6G)。观察到2-7岁的样品获得了最大的预测准确性,并且随着个体年龄的增加,模型的AUC同时减小(图6G)。为了验证这些发现不仅仅是由于在每个年龄段可用的相应样本量造成的,首先确定了样本量对GBC模型性能的影响,然后将相应的样本量作图。观察到在ASD状态预测中,来自较年轻受试者的样品的表现优于根据样本量所预期的。

[0179] 分支酸代谢分支点酶

[0180] 除了评估上文列出的源自分支酸的途径的差异之外,还评估了在ASD肠道微生物组中分支酸代谢的六种分支点酶是否发生了改变。观察到在14个队列中的11个队列中,ASD肠道微生物组中将分支酸引入泛醇生物合成途径的分支酸裂解酶被上调,其中两个队列达到了统计学显著(图7A)。观察到与对照相比,分支点酶分支酸裂解酶与任何其他分支点酶相比在ASD肠道微生物组中的差异要大得多。为了观察ASD样品的分支酸裂解酶数量是否比其对照计数图多,计算了每个样品的归一化酶数量,并比较了每个研究中ASD个体与对照的所述数量(图7B)。已显示,五个队列在ASD肠道微生物组中分支酸裂解酶的预测数量方面显示出统计学显著的差异(图7B)。

[0181] 最后,与分支酸相关的最通常显著的途径之一是各种甲萘酚的生物合成。希望研究这是否可能是由于负责将分支酸用于生产甲萘酚的分支点酶(即甲萘酚特异性异分支酸合酶)的增加或减少。异分支酸合酶已被记录为将分支酸转变为肠杆菌素生物合成和甲萘酚生物合成,并被归类为相同的酶委员会编号(EC 5.4.4.2)。对存在于几种细菌物种中并负责将分支酸用于甲萘酚生物合成的异分支酸合酶menF进行了进一步研究。检查了menF的预测基因计数,并评估了它在ASD粪便样品中与对照相比富集更高还是更低。三项研究表明menF的预测基因丰度存在统计显著的差异(图7C)。尽管没有达到显著性,但大多数研究显示在ASD肠道微生物组中甲萘酚特异性异分支酸合酶增加(图7C)。这一趋势与之前提到的为整个甲萘酚生物合成途径所观察到的趋势相当(图4H)。

[0182] 下一个目标是鉴定哪些细菌含有menF基因。坚定了每个队列中含有menF基因的细菌。生成所述细菌的热图以评估它们在每个队列中的流行程度(图7D)。携带menF基因的细

菌中有四种是从机器学习模型获得的对ASD对照分类重要的细菌(图5C)。这些细菌对机器学习分类模型的重要性的增加,进一步阐明了分支酸、分支酸相关代谢物或分支酸转化酶在ASD肠道微生物组中是重要的,并可能成为有希望的治疗靶点。

[0183] 结果讨论

[0184] 在本实施例中,采取了一种系统性方法来重新分析现有的ASD肠道微生物组数据,并提供数据集之间共性和差异的深入报告。测试了研究设计的哪些方面影响被设计用于ASD分类的机器学习模型的分类结果和准确性。鉴于不同数据处理方法中的选择多种多样,以及这些选择引入的可变性,使用一致的方法重新分析数据是重要的。利用所述数据集,重新审视了关于ASD微生物组与对照个体有何不同的常见问题,致力于在不同分类水平上微生物组的α多样性、β多样性和相对丰度差异。在是否观察到α多样性差异方面发现了混合的结果,在ASD个体与对照相比的β多样性差异方面一致性略高。通过基于诸如可变区、对照亲缘关系、年龄、性别和地理位置的因素分析数据,并利用机器学习模型使用微生物组数据估计这些因素对ASD状态分类的影响,对通常报告的内容进行了扩展。

[0185] 本实施例通过评估技术选择和队列人口统计数据如何改变结果,将ASD微生物组领域置于背景中研究。已知微生物的组成因不同人群并基于技术选择而异。值得注意的是,观察到基于来自美国的数据和来自中国队列的数据的机器学习模型的诊断能力的显著差异。一种可能的解释是,在中国收集的ASD队列比美国更加严重。支持这一点的是一份报告,所述报告表明在中国ASD的患病率可能被低估,真实患病率可能更接近美国。这可能表明,在中国被诊断为ASD的儿童可能代表了比西方所诊断的儿童更严重的病例。或者,所述结果也可能是不同国家代表了社会经济地位、饮食、生活条件和环境因素差异的人群的结果。

[0186] 还已发现,特别有趣的是在较年轻时预测ASD状态的能力增强。这表明,开发一种基于微生物组的诊断筛查工具可以促进早期诊断,鉴于迄今为止ASD可用的诊断工具有限,这可能引起人们的极大兴趣。这些结果也可能代表了ASD发病机制中的关键年龄窗口。然而,存在许多混杂因素,包括样品归属的研究中的偏倚或2-7岁的ASD病例代表了比年龄较大的儿童更严重的病例的可能性。

[0187] 关于与ASD的分类关联的研究差异,发现最重要的因素是16S高变区的选择。在V3-V4队列和V4队列中,与对照相比,在ASD中普氏菌属与拟杆菌门、普氏菌属、脱硫弧菌目和δ变形菌纲的比率的逐个研究和逐个样品相对丰度中都发现了不一致的结果。特别有趣的是,在V4数据集中,普氏菌属在ASD中似乎增加,而在V3-V4队列中,它在ASD中减少。V3-V4区域代表了更大的DNA部分(在这些研究中~300 bp相比于~150 bp),因此一种可能的解释可能是基于更长或更短的读出序列长度对读出序列进行了不同的分类学指派。

[0188] 尽管研究存在较大可变性,但横跨所述队列鉴定到ASD肠道微生物组的几个一致趋势。最大的分类学一致性是ASD个体中放线菌在门和纲两个水平上的富集,以及双歧杆菌属的增加和普氏菌属的普遍减少。双歧杆菌属(放线菌门)对于生命早期人类发育是重要的,而它在晚些时候被严格厌氧细菌所取代。在某些情况下,双歧杆菌属的流行率增加可能表明肠道微生物组发育不全。

[0189] 还发现,在由ASD肠道微生物组编码的预测功能途径之间存在一些一致性。分支酸是合成包括AAA、甲萘醌、泛醌、肠杆菌素和叶酸在内的几种生物相关分子的常见分支点。发现在ASD肠道微生物组中与这些下游代谢物相关的几种途径发生了改变。有趣的是,分支酸

生物合成依赖于草甘膦的靶5-烯醇式丙酮酸基莽草酸-3-磷酸合酶(EPSPS)。在某些情况下,草甘膦水平可能与ASD发病率和微生物组改变有关。

[0190] 方法

[0191] 文献检索策略和选择标准

[0192] 从一开始到2021年7月15日,通过PubMed数据库进行了系统性文献检索,以鉴定评估自闭症谱系障碍和肠道微生物组的适用研究。下述搜索词仅用作自由文本词或用作关键字:ASD(或自闭症谱系障碍或自闭症)和(肠道微生物组或微生物群或粪便微生物组)。没有使用其他搜索特点或高级语言限制。如果满足下述条件,则将文章纳入本荟萃分析:(a)采集了自闭症患者和/或典型发育个体的粪便微生物群样品;(b)数据和相应的元数据是可检索且可解释的;以及(c)自闭症诊断由医疗保健专业人员给出。通过文献检索,共评估了244项研究的纳入情况。在所述244项研究中,36项研究指示了在其中研究了微生物组在ASD中的作用的队列,并被完整阅读以评估其纳入资格。共有12项研究符合上述纳入标准,并被纳入本分析。鉴定了一个存储在序列读取档案(SRA)中的数据集及其相应的元数据,所述数据集尚未发布,但在手稿准备期间发布。最后,利用从美国肠道项目(AGP)生成的开源数据来培养ASD儿童和对照的额外数据集。设计了一种倾向评分算法,为每个ASD受试者鉴定最佳匹配的对照受试者。总之,这14个队列产生了来自广泛年龄段和地理位置的总共888个ASD样品和852个典型发育个体的对照样品。

[0193] 排除标准

[0194] 为了最小化已知的技术影响,未纳入仅使用鸟枪宏基因组测序方法、Roche 454测序和/或16S rRNA焦磷酸测序的研究。因此,由于不相容的测序方法,15项研究被排除在分析之外。其他八项研究符合纳入标准,但没有可公开获得的元数据。已联系所有八位作者,但未对元数据请求做出回应,因此无法将其纳入分析。

[0195] 从美国肠道项目中汇编队列

[0196] AGP数据集含有来自15000多名参与者的样品,因此代表了一个用于汇编目标队列的多样化数据集。所有可用的16S数据和元数据均从Qiita.ucsd.edu(https://qiita.ucsd.edu/study/description/10317)下载。首先鉴定由医生诊断为患有ASD的受试者的粪便样品,并基于每个ASD受试者的特点汇编对照队列。因此,采用了一种基于倾向评分匹配的方法,其由两个主要步骤组成:评分和匹配。对于ASD队列中的每个样品,基于具有特定元数据特点(运行日期、样品类型和性别)的精确匹配以及具有从其他元数据特点(年龄、BMI、剖腹产、国家、糖尿病、抗生素史、益生菌频率、预制餐频率、过敏、预制方法频率、红肉频率、发酵食品消费、全谷物频率、维生素B补充频率、植物蛋白频率、维生素D频率、蔬菜频率、癫痫或癫痫发作障碍)计算出的最接近的“相似性得分”,选择相应的对照样品。精确匹配允许选择待控制的特点。例如,为了控制测序运行之间的技术可变性,要求对照样品与ASD样品来自相同的测序运行日期。另一方面,给定元数据特点的向量,相似性评分只是队列分配的条件概率。通过这种方式,匹配的对照样品代表了对照队列的一个子集,其与ASD样品具有相似(如果不是相同的话)的元数据特点分布。

[0197] 为了计算相似性评分,首先使用来自scikit-learn 0.24.2版(https://scikit-learn.org/)的OneHotEncoder类别对每个特点进行二值化。然后使用scikit-learn的LogisticRegression类别拟合这些特点,其中因变量是队列状态(即ASD队列为1;对照队列

为0)。相似性评分是sigmoid函数的输出,其也是分配到ASD队列的预测概率。

[0198] 在匹配过程中,将来自ASD队列中每个样品的相似性评分与来自“精确匹配”变量相同的每个对照样品的相似度评分进行比较。然后将相似性评分最接近的对照样品置于对照队列中,并作为用于后续轮次匹配的可能对照样品移除。在匹配每个ASD样品后,获得了一个独特样品的对照队列,其样本量与所述ASD队列相同。

[0199] 数据采集

[0200] 对于公开存放在NCBI序列读取档案(SRA)中的数据,使用SRA Run Selector tool(https://www.ncbi.nlm.nih.gov/Traces)从每个项目下载样品元数据。将在github(https://github.com/mortonjt/GetData)上可用的自定义脚本(process_experiment.py)用于系统地下载、修剪引物,并将样品加工成数据表。在数据和样品元数据没有通过SRA存储的情况下,它们直接由原始研究的作者提供,并使用如下所述的相同参数进行处理。

[0201] 标准化16S处理流程

[0202] 一个目标是以系统和协调的方式收集和重新处理每项研究,以减少不同处理方法造成的误差,并能够得出关于ASD肠道微生物组和整个数据集的更好结论。使用QIIME 2(v. 2020.8)软件,使用相同的处理步骤对每项研究进行单独处理。所有样品也使用相同的流程一起处理,以得出结论并揭示总体聚合数据的趋势。所述系统性处理流程的第一步是在需要时利用自定义脚本process_experiment.py对进行去多重化和引物移除。接下来,将所有序列修剪到150 bp的长度。修剪后,使用Deblur QIIME 2 2020.8插件对序列进行去噪和过滤。使用由QIIME 2(QIIME 2 v. 2020.8)提供的全长16S预拟合GreenGenes训练的朴素贝叶斯分类器(gg-13-8-99-nb-classifier.qza),使用QIIME 2 q2特点分类器插件进行分类学分类。使用来自QIIME 2(v. 2020.8)的SEPP片段插入插件进行系统发育定位。选择SEPP是为了通过将短读出序列分配到参考系统发育来最小化高变区的影响。使用q2片段插入过滤器特点QIIME 2 2020.8插件移除所有未与树对齐的特点。得到的表格是ASV水平的读出序列计数,其被用于所有下游分析。

[0203] 在α和β多样性分析之前,将来自每个队列的序列独立地稀化到必要的深度,以尽可能保留最大的读出序列数量,同时过滤掉读出序列数量非常低的任何样品。对于聚合数据而言,使用核心系统发育QIIME 2 v. 2020.8插件将得到的表格稀化到6000的测序深度。使用Faith系统发育多样性、Shannon多样性、物种均匀度和来自核心系统发育QIIME 2 v. 2020.8插件的观察到的特点来评估α多样性。使用未加权UniFrac和加权UniFrac距离矩阵(其也使用核心系统发育QIIME 2 v. 2020.8插件计算)来计算β多样性距离和相应的主坐标分析(PCoA)图。

[0204] α多样性、β多样性、分类和功能差异的分析

[0205] 对于聚合数据和逐个研究水平的分析两者而言,在所有倍数变化、相对丰度、途径丰度和机器学习比较分析之前,过滤掉每个样品含有少于6000个读出序列的所有样品。使用自定义Python(3.6.0版)脚本进行分析。使用QIIME 2 β组显著性计算组间β多样性距离的统计显著性,并使用排列多变量方差分析(PERMANOVA)计算报告的p值。由于研究之间的变化性大,ASD与对照组受试者的α多样性之间的差异仅在逐个队列的基础上进行。ASD与对照的α多样性log2比率在NumPy 1.19.1版(https://numpy.org/)中进行,来自使用SciPy 1.5.2版(https://scipy.org/)计算的ASD和对照受试者的平均值。每个队列的log2倍数变化的显著性

在SciPy 1.5.2版中通过未调整双尾t检验来评估,其中假设方差不等。

[0206] 对于所提到的每个分类水平的逐个研究log2倍数变化而言,首先通过用ASV读出序列计数除以每个样品的读出序列总数,将样品归一化为相对丰度。使用Pandas 0.25.3版(https://pandas.pydata.org/)对每个分类水平的相对丰度进行求和。在逐个研究水平上,使用SciPy 1.5.2版计算ASD和对照受试者平均值的log2比率,并在NumPy 1.19.1版中进行对数变换。以与上述α多样性相同的方式评估统计显著性。对突出显示的重要分类群而言,在Pandas 0.25.3版中对每个样品中的相对丰度进行log10变换。为了避免由log10变换导致的无穷大的情况,使用NumPy 1.19.1版将最小非零归一化相对丰度值添加到所有样品中。接下来,在绘图之前,用NumPy 1.19.1版对每个样品的归一化相对丰度进行log10变换。

[0207] 使用通过未观察状态的重建进行的群落系统发育调查(Picrust2)软件(v.2019.1),从16S数据估算微生物功能谱。如上所述,分析了在ASD与对照受试者之间得到的途径丰度表的差异。所有数字均使用R 4.0.5版中的ggplot2 3.3.3版生成。

[0208] ASD状态的机器学习分类

[0209] 为了从微生物组预测ASD状态,使用了来自scikit-learn软件包0.24.2版(https://scikit-learn.org/)的11种不同的分类模型、评估指标和辅助功能。除非另有说明,否则使用重复10次的5倍交叉验证来估算不同表现指标的平均值和方差。未进行超参数优化。所报告的结果包括ROC曲线的曲线下面积(AUC),以及每个模型的准确性和F1评分。

[0210] 在不同机器学习模型的初始评估过程中,使用了聚合ASV水平数据集并进行了归一化,使得在训练和评估每个机器学习模型之前相对丰度相加为一。接下来,对于每项研究(包括聚合数据集),通过对每个分类群(例如梭菌属)分组,对其原始读出序列计数进行求和并归一化以使相对丰度相加为一,将所述数据集在分类层次(例如属)的不同水平上折叠。然后,将该处理后的数据集用于训练和测试来自scikit-learn的GBC、ABC和决策树分类器。报告的结果包括ROC曲线的曲线下面积(AUC),以及每个模型的准确性和F1评分。

[0211] 为了确定每个特点的重要性,将Shapley加法解释(SHAP)软件包(https://github.com/slundberg/shap)应用于在聚合ASV数据集上训练的梯度提升分类器模型。使用SHAP软件包的蜂群绘图功能显示了累积SHAP值排名前25位的最重要特点。对每个研究的来自每个排名前25的特点的绝对SHAP值取平均值,并使用seaborn软件包0.11.0版(https://seaborn.pydata.org/)显示为聚类图。为了确定不同元数据变量的影响,将整个数据集根据其相应的元数据特点分开。使用5倍交叉验证对所述数据集的每个分区进行进一步分割,并将该数据用于训练和评估被训练用于预测ASD或对照状态的梯度提升分类器。使用ROC的AUC、F1评分和准确性来评估模型性能。将整个过程重复50次,以估算每个性能指标的标准误差。

[0212] 为了估计不同年龄段ASD的可预测性,评估了横跨1岁至16岁的不同年龄段ASD的可预测性。也就是说,只使用落入每个年龄段(例如1-3岁)的数据的子集。为了确保每个年龄段内有足够的数据,每个年龄段的下限和上限必须相隔2岁。使用该数据子集的5倍交叉验证,对30个GBC模型实例进行了训练和评估。使用seaborn热图显示了每个年龄段的ROC曲线的平均AUC。无效的年龄范围(例如3-1岁)被排除在外,并显示为灰色正方形。

[0213] 数据可用性

[0214] 本实施例中使用的数据来自保存在测序运行档案(SRA,https://www.ncbi.nlm.nih.gov/sra)

中的可公开获得的数据集。可以使用下述研究标识符访问数据:PRJNA282013、PRJNA578223、PRJNA642975、PRJNA453621、PRJNA644763、PRJNA687773、PRJNA624252、PRJEB27306、PRJEB27306、PRJNA529598、PRJEB42687。其他数据集包括来自David等,2021的数据(可以在http://files.cgrb.oregonstate.edu/David_Lab/ASD_study1/获得)以及可以在研究标识符10317下从Qiita获得的来自AGP的数据(https://qiita.ucsd.edu/study/description/10317)。

[0215] 代码可用性

[0216] 数据处理脚本可以在Github(https://github.com/mortonjt/GetData)上获得。数据分析和可视化的笔记本也可以在Github上获得(https://github.com/erxw/ASD_16S_metaanalysis)。

[0217] 实施例2

[0218] 在本实施例中,对其他队列进行了进一步的荟萃分析。尽管实施例1中使用的数据集由来自14个队列的1740个样品组成,但本实施例中使用的数据集由来自ASD和对照受试者的16S测序数据的22个队列的3589个样品组成。建立了一个荟萃分析框架,用于鉴定通常改变的分类群、肠道微生物组之间的功能差异以及在受试者微生物群中发生的预测代谢通量。

[0219] 八叠球菌

[0220] 在来自八叠球菌属的测序数据存在下,分类分析鉴定了ASD状态的潜在生物标志物。本实施例的工作表明,所有ASD受试者中14%左右含有阈值丰度的所述物种,而只有6.4%的对照受试者具有相似丰度的所述物种。

[0221] 图8A示出了ASD和对照受试者之间通常改变的属。将汇编的16S测序数据在属水平上折叠,并在关于样品的不同元数据特征之间进行分割,以基于各种因素比较ASD与对照之间的差异。将ASD/对照组成比较的Log2变换的倍数变化沿每个因素作图,并用每个点的尺寸表示根据为多重假设检验调整的秩和检验的显著性。显示了四分位距(IQR)的箱线图示出了数据的总体分布。值得注意的是,八叠球菌的IQR完全超过0,表明ASD状态的生物标志物能够适应变化的研究因素。

[0222] 八叠球菌生物标志物可能是胃梭菌(Clostridium ventriculi)或与该物种密切相关。其他密切相关的物种包括产气荚膜梭菌(Clostridium perfringens),已知其含有几种可以诱导ASD样症状的毒素,所述症状包括心动过速、脱水、厌食、胃肠道问题、震颤、迟钝、抑郁、嗜睡、感觉过敏、多动、易怒、癫痫发作、神经炎症、渗透性肠/血脑屏障和少突胶质细胞死亡。因此,所述毒素或细菌可能是ASD中治疗干预的靶点。

[0223] 图8B示出了ASD和对照受试者的肠道微生物组中八叠球菌的组成丰度(当存在时)的直方图。图8B还示出了ASD和对照受试者的叠加核密度估计(KDE)曲线。确定了用于对ASD与对照进行分类的最佳判别边界,并将其作图在图8B中。

[0224] 图8C是描述了在肠道微生物组中含有超过阈值丰度的八叠球菌的ASD或对照受试者的分数丰度的热图,其中数据集按队列和研究因素划分。此外,将ASD分数丰度与对照分数丰度之间的差异作图,显示了其中这个特点在ASD受试者中高度富集的队列和研究因素。

[0225] 分支酸

[0226] 本实施例的扩展数据集的荟萃分析在很大程度上支持了实施例1的发现,并支持了分支酸是一种关键分子,在许多ASD受试者的肠道中可能减少的主张。在重新分析最常见

的显著途径后,分支酸相关途径很常见。

[0227] 分支酸代谢途径已被鉴定为存在于大多数(如果不是全部)肠道微生物组中,并且ASD受试者的微生物组中有更高比例专门用于这些途径。在分支酸代谢的基础上鉴定辨别边界,鉴定了其中分支酸代谢特别擅长区分ASD和对照受试者的队列和研究因素。这些发现表明,基于分支酸的干预在意大利等地可能特别重要,对ASD受试者的性别没有差别,并可能与胃肠道症状无关。

[0228] 图9A是气泡图,示出了在ASD肠道微生物组和对照的横断面队列中发现的最常见的显著途径。每个点根据ASD与对照受试者之间的Log2组成倍数变化着色,并根据通过未对多重假设检验进行调整的秩和检验,关联性是否通过P < 0.05的显著性阈值来确定尺寸。与分支酸相关的途径由箭头指示。这些途径包括:甲萘酚-7生物合成超级途径、分支酸代谢超级途径、芳香族化合物通过β-酮己二酸的降解、甲萘酚-12生物合成超级途径,甲萘酚-11生物合成超级途径、去甲基甲萘酚-8生物合成超级途径、甲萘酚-8生物合成超级途径、甲萘酚-13生物合成超级途径和肠杆菌素生物合成。

[0229] 图9B示出了ASD和对照受试者的肠道微生物组中分支酸代谢超级途径的组成丰度(当存在时)的直方图。图9B还示出了ASD和对照受试者的叠加KDE曲线。确定了用于对ASD与对照进行分类的最佳判别边界,并将其作图在图9B中。

[0230] 图9C是描述了在肠道微生物组中含有超过阈值丰度的分支酸代谢超级途径的ASD或对照受试者的分数丰度的热图,其中数据集按队列和研究因素划分。此外,将ASD分数丰度与对照分数丰度之间的差异作图,显示了其中这个特点在ASD受试者中高度富集的队列和研究因素。

[0231] 图9D示出了分支酸代谢和微生物组的其他特点的交叉比较。为与ASD状态相关的各种特点鉴定了判别阈值,并将被鉴定为具有高水平的每种类别的ASD受试者与被鉴定为分支酸代谢水平升高的ASD受试者进行比较。图9D示出了维恩图,其描述了被分类为所列出的每个特点的丰度增加的受试者之间的重叠。如图9D中所示,在肠杆菌素基因、甲萘酚-11基因、芳香族化合物降解和L-精氨酸降解增加的患者中鉴定到强烈的重叠。分支酸代谢表型通常可能由肠杆菌目驱动,因为肠杆菌目增加的受试者几乎完全由分支酸代谢增加的受试者所代表。因此,在一些实施方案中,肠杆菌目的组成丰度、L-精氨酸降解和/或肠杆菌素可用于评估患者是否可能对分支酸干预措施做出响应。

[0232] 代谢通量差异

[0233] 使用计算工具MICOM分析ASD与对照受试者之间的代谢通量差异。MICOM使用围绕微生物内已知所需营养素和代谢途径构建的代谢模型,并模拟在给定饮食的情况下,微生物组中鉴定到的集体物种如何彼此相互作用。对于这些研究而言,使用了标准的“西方饮食”。还开发了一种定制的“西方饮食”,增加了饮食中可用的分支酸的量。

[0234] 图10A是气泡图,显示了ASD肠道微生物组和对照的横断面队列中发现的最常见的显著途径。每个点根据ASD与对照受试者之间的Log2组成倍数变化着色,并根据通过未对多重假设检验进行调整的秩和检验,关联性是否通过P < 0.05的显著性阈值来确定尺寸。ASD和对照组受试者之间最常见的不同代谢通量差异包括烟酰胺单核苷酸(NMN)、3-甲基-2-氧代戊酸、L-苯丙氨酸、烟酰胺、富马酸、分支酸、L-酪氨酸、L-丝氨酸、甘氨酰基-L-酪氨酸和甘氨酰基苯丙氨酸。

[0235] 在检查了不同特点与ASD受试者亚组相对应的潜力后,质子通量似乎是一个有前景的候选者,其中14%的ASD受试者的微生物组表明游离质子大量流入。这种表型在Ding2020和Kong2019队列以及在厄瓜多尔、韩国进行的使用V3V4可变区剖析肠道微生物组的研究中特别明显。图10B示出了具有叠加KDE曲线的直方图,描述了ASD和对照受试者的肠道微生物组的质子流入(当存在时)的分布。确定了用于对ASD与对照进行分类的最佳判别边界,并将其作图在图10B中。

[0236] 图10C是描述了在肠道微生物组中含有超过阈值的质子流入的ASD或对照受试者的分数丰度的热图,其中数据集按队列和研究因素划分。此外,将ASD分数丰度与对照分数丰度之间的差异作图,显示了其中这个特点在ASD受试者中高度富集的队列和研究因素。

[0237] 代谢流入分析进一步支持了基于ASD肠道微生物组的功能分析的主张(调节分支酸途径分子用于ASD治疗),因为分支酸相关代谢物常常被鉴定为被ASD受试者的肠道微生物群差异摄入的分子。这些分子包括L-苯丙氨酸、L-酪氨酸和分支酸。结果进一步表明,NMN、富马酸和/或质子可能对ASD病理学是重要的。例如,在一些ASD受试者中发现的质子通量增加可能表明他们的肠道pH更加酸性。对这些受试者的潜在干预可能是降低胃肠道pH。因此,在一些实施方式中,治疗干预包括施用一种或多种组合物以降低患有ASD或具有ASD风险的受试者的胃肠道pH。

[0238] 主要亚型的交叉比较

[0239] 在鉴定了几种有前景的ASD生物标志物后,对每个组中的受试者进行交叉比较,以鉴定这些是否是ASD的不同亚型。对于这项分析而言,将超过分支酸代谢超级途径的设定阈值的ASD受试者与含有生物标志物“八叠球菌”的ASD患者和含有高水平质子流入的患者进行比较。结果发现这些ASD群体几乎没有重叠,表明它们可能是ASD的不同亚型,这可能需要一种诊断方法来鉴定每种亚型,以鉴定哪种靶向治疗可能对所述个体最有效。对于所述最大亚型而言,估计至少18%的ASD受试者可能受益于基于分支酸的干预。进一步估计,至少13.8%的ASD受试者可能受益于基于胃肠道pH调节的干预,13.5%的ASD受试者可能受益于靶向胃梭菌(Clostridium ventriculi)的干预。

[0240] 图11显示了对来自本实施例的ASD的三种主要亚型的患者群体进行交叉比较的翻转图(upset plot)。在左下角,条形图示出了每种亚型的患者数量及其相应的百分率。右下角是与上述每个条形图对应的特定亚型的参与指示。每个条形图显示了每个亚型中参与的ASD受试者的数量,每个条形图根据ASD受试者的国家着色。每个亚群所代表的总群体百分率被绘制在每个条上方。

[0241] 分支酸干预

[0242] 在鉴定到一个具有更高的代谢分支酸和分支酸衍生分子的能力的ASD亚群后,评估了在这些患者的饮食中增加分支酸对患者微生物组的代谢摄入的影响。对于这项分析而言,分支酸的饮食通量被增加一个数量级,并在荟萃分析研究中对所有受试者重新运行了MICOM模拟。将肠道微生物群的每种代谢物的总流入与从标准饮食获得的流入进行比较。将ASD的分支酸亚型之间的流入差异与所有其他ASD受试者进行比较,并对这些组之间具有最高统计显著性的代谢物进行排序。所述分析鉴定了几种可能在ASD病理学中关键的代谢物的显著差异,包括吲哚这种具有行为影响的色氨酸衍生物、叶酸、分支酸,L-酪氨酸和甲萘醌8。这些研究还鉴定到其他有趣代谢物的差异,包括3-甲基-2-氧代戊酸这种已知的神经

毒素和NMN。在这些受试者中,每种这些代谢物的平均流入都被分支酸干预减少,但在更大的群体中没有显著变化。肠道微生物群对这些代谢物的这种流入减少可能表明,分支酸可用性的增加排除了某些降解分支酸下游代谢物的物种的必要性。这进一步表明,对这一患者群体进行分支酸干预可能具有预期的作用机制,通过减少分支酸下游各种代谢物的降解量来补偿由草甘膦暴露或其他机制造成的分支酸可用性的降低。

[0243] 图12A示出了当给予增加的分支酸时,分支酸代谢基因增加的ASD受试者中改变的前30种代谢物。描绘了对于分支酸和非分支酸ASD亚型而言,基于在使用和不使用分支酸改良的西方饮食时的通量差异之间平均值的秩和统计比较,-Log10(FDR调整的p值)的条形图。

[0244] 图12B-12E显示了箱线图,示出了当在模拟饮食中给予增加的分支酸时,分支酸亚型的ASD或其他受试者的通量差异的分布。在每个箱线图上方是基于非配对Welch校正T检验的显著性标记。

[0245] 所述模拟分支酸干预研究表明,分支酸可用于改变某些ASD受试者中关键代谢物(例如L-酪氨酸、叶酸、吲哚、甲萘醌8)的水平。它们证明,施用分支酸可能会减少肠道微生物对摄入分支酸下游代谢物的依赖。鉴于之前关于这些下游代谢物对ASD的各种症状或合并症的研究结果,这表明分支酸可能通过这些机制进行干预。

[0246] 实施例3

[0247] 在本实施例中,施用分支酸以治疗两种不同的ASD啮齿动物模型:产前暴露于草甘膦(也被称为农达)或丙戊酸。

[0248] 自闭症谱系障碍由不同的病因引起:微生物组改变、病毒感染和遗传。ASD患者的子集可能具有由其肠道微生物群编码的沿着分支酸代谢途径的改变。分支酸补充可能改善ASD的症状,并且可能是至少一种ASD“分支酸亚型”的可能治疗方法。在本实施例中,施用分支酸以治疗两种不同的ASD啮齿动物模型:产前暴露于草甘膦(也被称为农达)或丙戊酸。草甘膦通过莽草酸途径直接干扰分支酸的合成,并已被证明在啮齿动物中诱导ASD样行为。丙戊酸的确切作用机制尚不清楚,但由暴露于丙戊酸的母亲所生的啮齿动物也表现出许多ASD样行为表型。

[0249] 本实施例聚焦于ASD啮齿动物模型的基本行为症状:缺乏社交能力。这是使用下文所述的3室测定法测量的。次要指标包括肠道微生物组的代谢和微生物分布情况。

[0250] 实验方法

[0251] 诱导 - 丙戊酸

[0252] 在妊娠第12.5天,向定时妊娠的C57Bl/6雌性小鼠施用溶媒(0.9%生理盐水)或丙戊酸(VPA)(500 mg/kg;500 μL;腹腔内)。雄性幼崽在3周龄(P21)时断奶;雌性幼崽被安乐死。

[0253] 诱导 - 草甘膦

[0254] 从胚胎第5天(E5)到产后第21天(P21),向定时妊娠的C57Bl/6雌性小鼠施用常规饮用水或注入草甘膦的水(175 mg/kg;约0.1%),共37天。雄性幼崽在3周龄(P21)时断奶;雌性幼崽被安乐死。

[0255] 治疗 - 分支酸

[0256] 在断奶(P21)后,将动物分组饲养,每天称重和监测,每周收集粪便样品。向每组中

一半的动物施用常规饮用水或饮用水中的分支酸。每24小时更换饮用水。

[0257] 读出 - 社交能力

[0258] 主要的行为读出是使用3室测定法的动物社交能力。在该测定法中,矩形活动场所有3个区室,允许受试小鼠在区室之间自由行走。

[0259] 在P56,允许小鼠在区室内适应5分钟。然后,在左区室和右区室的任一侧放置一对空的小铁丝笼。在其中一个铁丝笼中引入不熟悉的(陌生)小鼠。允许受试小鼠在三个区室之间自由探索10分钟。视频跟踪记录了受试小鼠在每个区室中花费的时间量。

[0260] 在P66,将动物安乐死。在安乐死时采集血液(血浆)、结肠内容物(快速冷冻)、盲肠内容物(快速冷冻)和脑(快速冷冻)。

[0261] 预期结果

[0262] 以前的研究显示,对照受试小鼠(对于诱导和治疗的对照)更喜欢在具有陌生小鼠的区室里比在具有空笼子的区室里多呆2-5倍的时间。

[0263] 这些研究还显示,产前暴露于丙戊酸或草甘膦的受试小鼠在区室之间花费的时间大致相等,没有表现出社会偏好:这是一种关键的ASD样行为表型。

[0264] 相比之下,产前暴露于丙戊酸或草甘膦但用分支酸治疗的受试小鼠应表现出与对照小鼠相似的社会偏好:在具有陌生小鼠的区室里花费的时间比在具有空笼子的区室里多2-5倍。

[0265] 还假设分支酸是正常神经发育所必需的,但不是促进社交能力的物质。也就是说,与对照小鼠(对于诱导和治疗的对照)相比,用分支酸治疗的对照小鼠(对于诱导的对照)没有表现出更高的社交能力。

[0266] 表1. 参与分支酸代谢超级途径的基因

[0267]

基因 ID	基因登录号	基因名称		反应 EC	酶活性
EG10508	b0421	ispA	GPPSYN-RXN	2.5.1.1	香叶基二磷酸合酶
EG10079	b0754	aroG	DAHPSYN-RXN	2.5.1.54	3-脱氧-7-磷酸庚糖醛酸合酶
EG10080	b1704	aroH	DAHPSYN-RXN	2.5.1.54	3-脱氧-7-磷酸庚糖醛酸合酶
EG10078	b2601	aroF	DAHPSYN-RXN	2.5.1.54	3-脱氧-7-磷酸庚糖醛酸合酶
EG10262	b0583	entD	ENTDB-RXN	2.7.8.7	磷酸泛酰巯基乙胺基转移酶
EG12221	b3475	acpT	ENTDB-RXN	2.7.8.7	全-[酰基载体蛋白]合酶
EG10247	b2563	acpS	ENTDB-RXN	2.7.8.7	全-[酰基载体蛋白]合酶
EG10264	b0586	entF	ENTF-RXN	无 EC#	L-丝氨酸--[holo EntF]连接酶
EG10260	b0595	entB	ENTF-RXN	无 EC#	肠杆菌素合酶
EG10262	b0583	entD	ENTF-RXN	无 EC#	肠杆菌素合酶
EG10264	b0586	entF	ENTF-RXN	无 EC#	肠杆菌素合酶
EG10263	b0594	entE	ENTF-RXN	无 EC#	肠杆菌素合酶
EG10262	b0583	entD	RXN-15889	2.7.8.7	磷酸泛酰巯基乙胺基转移酶
EG11375	b2153	folE	GTP-CYCLOHYDRO-I-RXN	3.5.4.16	GTP 环化水解酶 I
EG11138	b1865	nudB	H2NEOPTERINP3PYROPHOSPHOHYDRO-RXN	3.6.1.67	二氢新蝶呤三磷酸二磷酸酶
EG11673	b3058	folB	H2NEOPTERINALDOL-RXN	4.1.2.25	二氢新蝶呤醛缩酶
EG11374	b0142	folK	H2PTERIDINEPYROPHOSPHOKIN-RXN	2.7.6.3	2-氨基-4-羟基-6-羟基甲基二氢蝶啶二磷酸激酶
EG10264	b0586	entF	RXN-15890	无 EC#	L-丝氨酸--[holo EntF]连接酶
EG10260	b0595	entB	RXN-15890	无 EC#	肠杆菌素合酶
EG10262	b0583	entD	RXN-15890	无 EC#	肠杆菌素合酶
EG10264	b0586	entF	RXN-15890	无 EC#	肠杆菌素合酶
EG10263	b0594	entE	RXN-15890	无 EC#	肠杆菌素合酶
EG10074	b3389	aroB	3-DEHYDROQUINATE-SYNTHASE-RXN	4.2.3.4	3-脱氢奎尼酸合酶
EG10076	b1693	aroD	3-DEHYDROQUINATE-DEHYDRATASE-RXN	4.2.1.10	3-脱氢奎尼酸脱水酶
EG10077	b3281	aroE	SHIKIMATE-5-DEHYDROGENASE-RXN	1.1.1.25	莽草酸脱氢酶
EG10082	b0388	aroL	SHIKIMATE-KINASE -RXN	2.7.1.71	莽草酸激酶
EG10081	b3390	aroK	SHIKIMATE-KINASE -RXN	2.7.1.71	莽草酸激酶
EG10073	b0908	aroA	2.5.1.19-RXN	2.5.1.19	3-磷酸莽草酸 1-羧基乙烯基转移酶

[0268]

EG10075	b2329	aroC	CHORISMATE-SYNTHASE-RXN	4.2.3.5	分支酸合酶
EG11028	b1264	trpE	ANTHRANSYN-RXN	4.1.3.27	邻氨基苯甲酸合酶
EG11027	b1263	trpD	ANTHRANSYN-RXN	4.1.3.27	邻氨基苯甲酸合酶
EG11027	b1263	trpD	PRTRANS-RXN	2.4.2.18	邻氨基苯甲酸磷酸核糖基转移酶
EG11026	b1262	trpC	PRAISOM-RXN	5.3.1.24	磷酸核糖基邻氨基苯甲酸异构酶
EG11026	b1262	trpC	IGPSYN-RXN	4.1.1.48	吲哚-3-甘油磷酸合酶
EG11024	b1260	trpA	RXN0-2381	4.1.2.8	吲哚甘油磷酸醛缩酶
EG11024	b1260	trpA	RXN0-2381	4.1.2.8	色氨酸合酶
EG11025	b1261	trpB	RXN0-2381	4.1.2.8	色氨酸合酶
EG11025	b1261	trpB	RXN0-2382	4.2.1.122	色氨酸合酶
EG11024	b1260	trpA	RXN0-2382	4.2.1.122	色氨酸合酶
EG11025	b1261	trpB	RXN0-2382	4.2.1.122	色氨酸合酶
EG10707	b2599	pheA	CHORISMATEMUT-RXN	5.4.99.5	分支酸变位酶
EG11039	b2600	tyrA	CHORISMATEMUT-RXN	5.4.99.5	分支酸变位酶
EG10707	b2599	pheA	PREPHENATEDEHYDRAT-RXN	4.2.1.51	预苯酸脱水酶
EG10497	b3770	ilvE	RXN-10814	2.6.1.1/2.6.1.27/2.6.1.57	苯丙氨酸转氨酶
EG10096	b0928	aspC	RXN-10814	2.6.1.1/2.6.1.27/2.6.1.57	苯丙氨酸转氨酶
EG11040	b4054	tyrB	RXN-10814	2.6.1.1/2.6.1.27/2.6.1.57	苯丙氨酸氨基转移酶
EG11039	b2600	tyrA	PREPHENATEDEHYDROG-RXN	1.3.1.12	预苯酸脱氢酶
EG10096	b0928	aspC	TYROSINE-AMINOTRANSFERASE-RXN	2.6.1.1/2.6.1.5/2.6.1.27/2.6.1.57	酪氨酸氨基转移酶
EG11040	b4054	tyrB	TYROSINE-AMINOTRANSFERASE-RXN	2.6.1.1/2.6.1.5/2.6.1.27/2.6.1.57	酪氨酸氨基转移酶
EG10261	b0593	entC	ISOCHORSYN-RXN	5.4.4.2	异分支酸合酶
EG12362	b2265	menF	ISOCHORSYN-RXN	5.4.4.2	异分支酸合酶
EG10579	b2264	menD	2.5.1.64-RXN	2.2.1.9	2-琥珀酰基-5-烯醇式丙酮酸基-6-羟基-3-环己烯-1-甲酸合酶
EG12438	b2263	menH	RXN-9310	4.2.99.20	(1R,6R)-2-琥珀酰基-6-羟基-2,4-环己二烯-1-甲酸合酶
EG11532	b2261	menC	O-SUCCINYLBENZOATE-COA-SYN-RXN	4.2.1.113	邻琥珀酰基苯甲酸合酶
EG12437	b2260	menE	O-SUCCINYLBENZOATE-COA-LIG-RXN	6.2.1.26	邻琥珀酰基苯甲酸辅酶 A 连接酶
EG11368	b2262	menB	NAPHTHOATE-SYN-RXN	4.1.3.36	1,4-二羟基-2-萘甲酰基辅酶

[0269]

					A 合酶
G6912	b1686	menI	RXN-9311	3.1.2.28	1,4-二羟基-2-萘甲酰基辅酶 A 水解酶
EG11880	b3930	menA	DMK-RXN	2.5.1.74	1,4-二羟基-2-萘甲酸八戊烯基转移酶
EG11473	b3833	ubiE	ADOMET-DMK-METHYLTRANSFER-RXN	2.1.1.163	去甲基甲萘醌甲基转移酶
EG10260	b0595	entB	ISOCHORMAT-RXN	3.3.2.1	异分支酸酶
EG10259	b0596	entA	DHBDEHYD-RXN	1.3.1.28	2,3-二氢 2,3-二羟基苯甲酸脱氢酶
EG10263	b0594	entE	DHBAMPLIG-RXN	无 EC#	2,3-二羟基苯甲酸-[芳基载体蛋白]连接酶
EG10263	b0594	entE	RXN0-6442	无 EC#	2,3-二羟基苯甲酸-[芳基载体蛋白]连接酶
EG10264	b0586	entF	RXN-15891	无 EC#	2,3-二羟基苯甲酰基-[EntB]:丝氨酰基-[EntF] 2,3-二羟基苯甲酸转移酶
EG10260	b0595	entB	RXN-15891	无 EC#	肠杆菌素合酶
EG10262	b0583	entD	RXN-15891	无 EC#	肠杆菌素合酶
EG10264	b0586	entF	RXN-15891	无 EC#	肠杆菌素合酶
EG10263	b0594	entE	RXN-15891	无 EC#	肠杆菌素合酶
EG10264	b0586	entF	ENTG-RXN	无 EC#	肠杆菌素合酶
EG10260	b0595	entB	ENTG-RXN	无 EC#	肠杆菌素合酶
EG10262	b0583	entD	ENTG-RXN	无 EC#	肠杆菌素合酶
EG10264	b0586	entF	ENTG-RXN	无 EC#	肠杆菌素合酶
EG10263	b0594	entE	ENTG-RXN	无 EC#	肠杆菌素合酶
EG10683	b1812	pabB	PABASYN-RXN	2.6.1.85	4-氨基-4-脱氧分支酸合酶
EG10682	b3360	pabA	PABASYN-RXN	2.6.1.85	4-氨基-4-脱氧分支酸合酶
EG11493	b1096	pabC	ADCLY-RXN	4.1.3.38	氨基脱氧分支酸裂解酶
EG50011	b3177	folP	H2PTEROATESYNTH-RXN	2.5.1.15	二氢蝶酸合酶
EG10327	b2315	folC	DIHYDROFOLATESYNTH-RXN	6.3.2.12	二氢叶酸合酶
EG10326	b0048	folA	DIHYDROFOLATEREDUCT-RXN	1.5.1.3	二氢叶酸还原酶
G6862	b1606	folM	DIHYDROFOLATEREDUCT-RXN	1.5.1.3	二氢叶酸还原酶
EG10508	b0421	ispA	FPPSYN-RXN	2.5.1.10	法尼基二磷酸合酶
EG10017	b3187	ispB	RXN-8992	2.5.1.90	全反式-八戊烯基-二磷酸合酶
EG11369	b4039	ubiC	CHORPYRLY-RXN	4.1.3.40	分支酸裂解酶
EG11370	b4040	ubiA	4OHBENZOATE-OCTAPRENYLTRANSFER-RXN	2.5.1.39	4-羟基苯甲酸八戊烯基转移酶
EG11396	b3843	ubiD	3-OCTAPRENYL-4-OHBENZOATE-DECARBOX-RXN	4.1.1.98	3-八戊烯基-4-羟基苯甲酸脱羧酶
EG11333	b2906	ubiI	2-OCTAPRENYLPHENOL-HYDROX-RXN	1.14.13.240	2-八戊烯基苯酚 6-羟化酶
EG11143	b2232	ubiG	2-OCTAPRENYL-6-OHPHENOL-RXN	2.1.1.222	2-八戊烯基-6-羟基苯酚甲基化酶

[0270]

EG11324	b2907	ubiH	2-OCTAPRENYL-6-METHOXYPHENOL-HYDROX-RXN	1.14.13.M56	2-八戊烯基-6-甲氧基苯酚4-羟化酶
EG11473	b3833	ubiE	2-OCTAPRENYL-METHOXY-BENZOQ-METH-RXN	2.1.1.201	2-八戊烯基-6-甲氧基-1,4-苯并醌醇甲基化酶
G6365	b0662	ubiF	OCTAPRENYL-METHYL-METHOXY-BENZOQ-OH-RXN	1.14.99.60	2-八戊烯基-3-甲基-6-甲氧基-1,4-苯并醌醇羟化酶
EG11143	b2232	ubiG	DHHB-METHYLTRANSFER-RXN	2.1.1.64	3-去甲基泛醌-8 3-邻甲基转移酶

[0271] 表2．参与分支酸代谢超级途径的代谢物

分子	别名	超级途径
D-赤藓糖 4-磷酸	赤藓糖-4P；苏阿糖 4-磷酸；赤藓糖-4-磷酸；赤藓糖-4-P；D-赤藓糖-4-P	莽草酸途径
3-脱氧-D-阿拉伯糖基-庚酮糖酸 7-磷酸	3-脱氧-D-阿拉伯糖基-庚酮糖酸-7-P，3-脱氧-阿拉伯糖基-庚酮糖酸 7-磷酸，3-脱氧-阿拉伯糖基-庚酮糖酸-7-P，2-脱氢-3-脱氧-D-阿拉伯糖基-庚糖酸 7-磷酸，3-脱氧-D-阿拉伯糖基-庚-2-酮糖酸 7-磷酸，3-脱氧-阿拉伯糖基-庚酮糖酸 7-磷酸，DAHP	莽草酸途径
3-脱氢奎尼酸（3-dehydroquinate）	脱氢奎尼酸；3-脱氢奎尼酸（3-dehydroquinic acid）；5-脱氢奎尼酸（5-dehydroquinic acid）；5-脱氢奎尼酸（5-dehydroquinate）；5-de-H-奎尼酸；rel-(1R,3R,4S)-1,3,4-三羟基-5-氧代环己烷二甲酸	莽草酸途径
3-脱氢莽草酸（3-dehydroshikimate）	3-脱氢莽草酸（3-dehydroshikimic acid）；5-脱氢莽草酸（5-dehydroshikimic acid）；5-脱氢莽草酸（5-dehydroshikimate）	莽草酸途径
莽草酸（shikimate）	莽草酸（shikimic acid）；(3R,4S,5R)-3,4,5-三羟基环己-1-烯-1-甲酸	莽草酸途径
莽草酸 3-磷酸	莽草酸 5-磷酸；莽草酸-5-P；3-磷酸莽草酸；莽草酸-3-P	莽草酸途径
5-烯醇式丙酮酰基-莽草酸 3-磷酸	3-烯醇式丙酮酸基-莽草酸 5-磷酸；3-烯醇式丙酮酸基-莽草酸-5-P；5-邻(1-羧基乙烯基)-3-磷酸莽草酸；5-烯醇式丙酮酸基-莽草酸 3-磷酸	莽草酸途径
分支酸（chorismate）	分支酸（chorismic acid）	莽草酸途径
邻氨基苯甲酸（anthranilate）	邻氨基苯甲酸（anthranilic acid）；2-氨基苯甲酸（2-aminobenzoic acid）；维生素 L1；邻氨基苯甲酸（o-aminobenzoic acid）；2-氨基苯甲酸（2-aminobenzoate）；邻氨基苯甲酸（o-aminobenzoate）	L-色氨酸生物合成
N-(5-磷酸核糖基）-邻氨基苯甲酸	N-(5-磷酸 D-核糖基)-邻氨基苯甲酸；N-(5-磷酸 β-D-核糖基)-邻氨基苯甲酸；5-磷酸核糖基-邻氨基苯甲酸；5-P-核糖基-邻氨基苯甲酸；5'-磷酸核糖基-邻氨基苯甲酸；5'-P-核糖基-邻氨基苯甲酸；N-(5-磷酸核糖基)-邻氨基苯甲酸	L-色氨酸生物合成
1-(2-羧基苯基氨基)-1-脱氧-D-核酮糖 5-磷酸	1-(邻羧基苯基氨基)-1-脱氧核酮糖-5'-P；1-(2-羧基苯基氨基)-1-脱氧-D-核酮糖-5-P；1-(邻羧基苯基氨基)-1'-脱氧核酮糖 5'-磷酸	L-色氨酸生物合成
(1S,2R)-1-C-(吲哚-3-基)甘油 3-磷酸	C1-(3-吲哚基)-甘油 3-磷酸；吲哚-3-甘油-P；1-(吲哚-3-基)甘油-3-P；1-(吲哚-3-基)甘油-3-磷酸；吲哚甘油磷酸；吲哚-3-甘油-磷酸	L-色氨酸生物合成
吲哚		L-色氨酸生物合成
L-丝氨酸	S；丝氨酸；L-ser	L-色氨酸生物合成
L-色氨酸	W；tryptacin；trofan；色氨酸；2-氨基-3-吲哚基丙酸；L-trp；trp	L-色氨酸生物合成
L-谷氨酰胺	Q；丙谷胺；glum；谷氨酰胺；glumin；2-氨基戊酰胺酸；谷氨酸 5-酰胺；L-gln	L-色氨酸生物合成
5-磷酸 α-D-核糖 1-二磷酸	5-磷酸核糖基 1-焦磷酸；5-磷酸核糖基二磷酸；5-磷酸核糖基-1-PP；5-磷酸核糖基-PP；5-磷酸核糖基-1-焦磷酸；5-磷酸核糖基焦磷酸；磷酸核糖基焦磷酸；5-磷酸核糖基-焦磷酸；α-D-5-磷酸核糖基 PP；α-D-5-P-核糖基 PP	L-色氨酸生物合成

[0272]

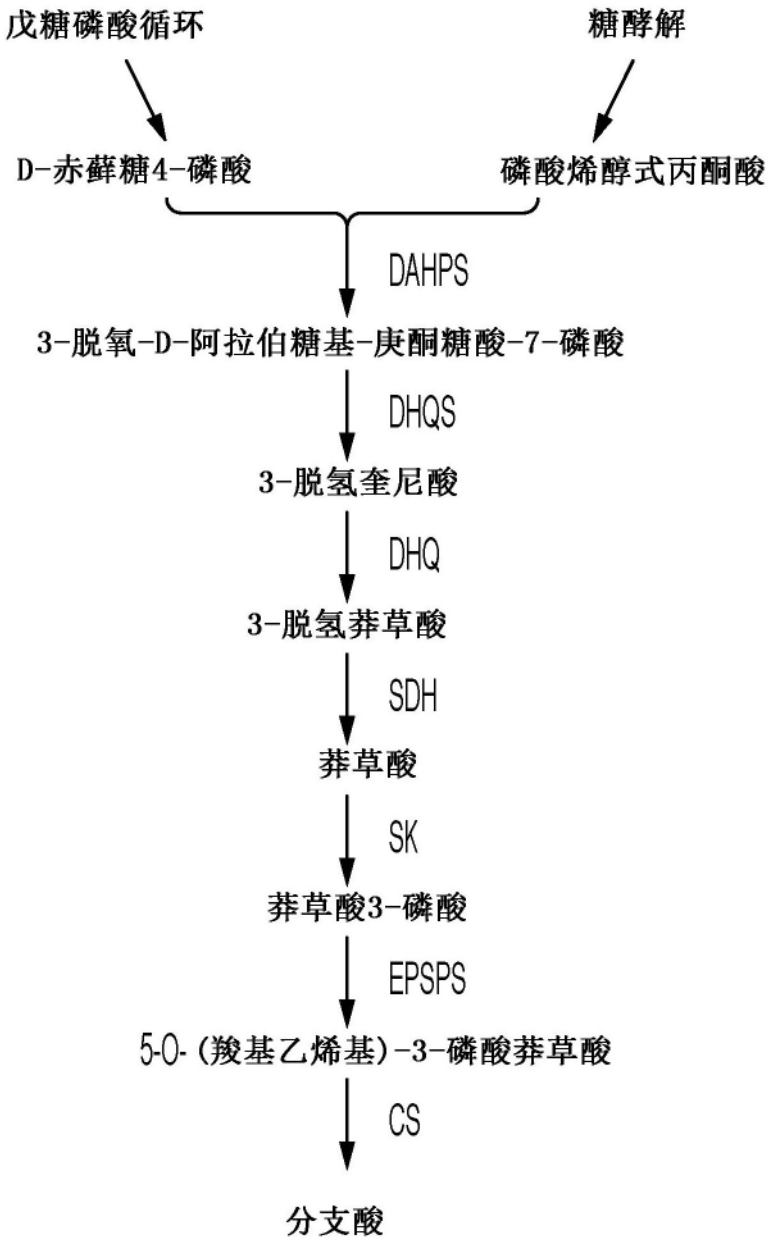

戊糖磷酸循环
糖酵解
D-赤藓糖4-磷酸
磷酸烯醇式丙酮酸
DAHPS
3-脱氧-D-阿拉伯糖基-庚酮糖酸-7-磷酸
DHQS
3-脱氢奎尼酸
DHQ
3-脱氢莽草酸
SDH
莽草酸
SK
莽草酸3-磷酸
EPSPS
5-O-(羧基乙烯基)-3-磷酸莽草酸
CS
分支酸

图1

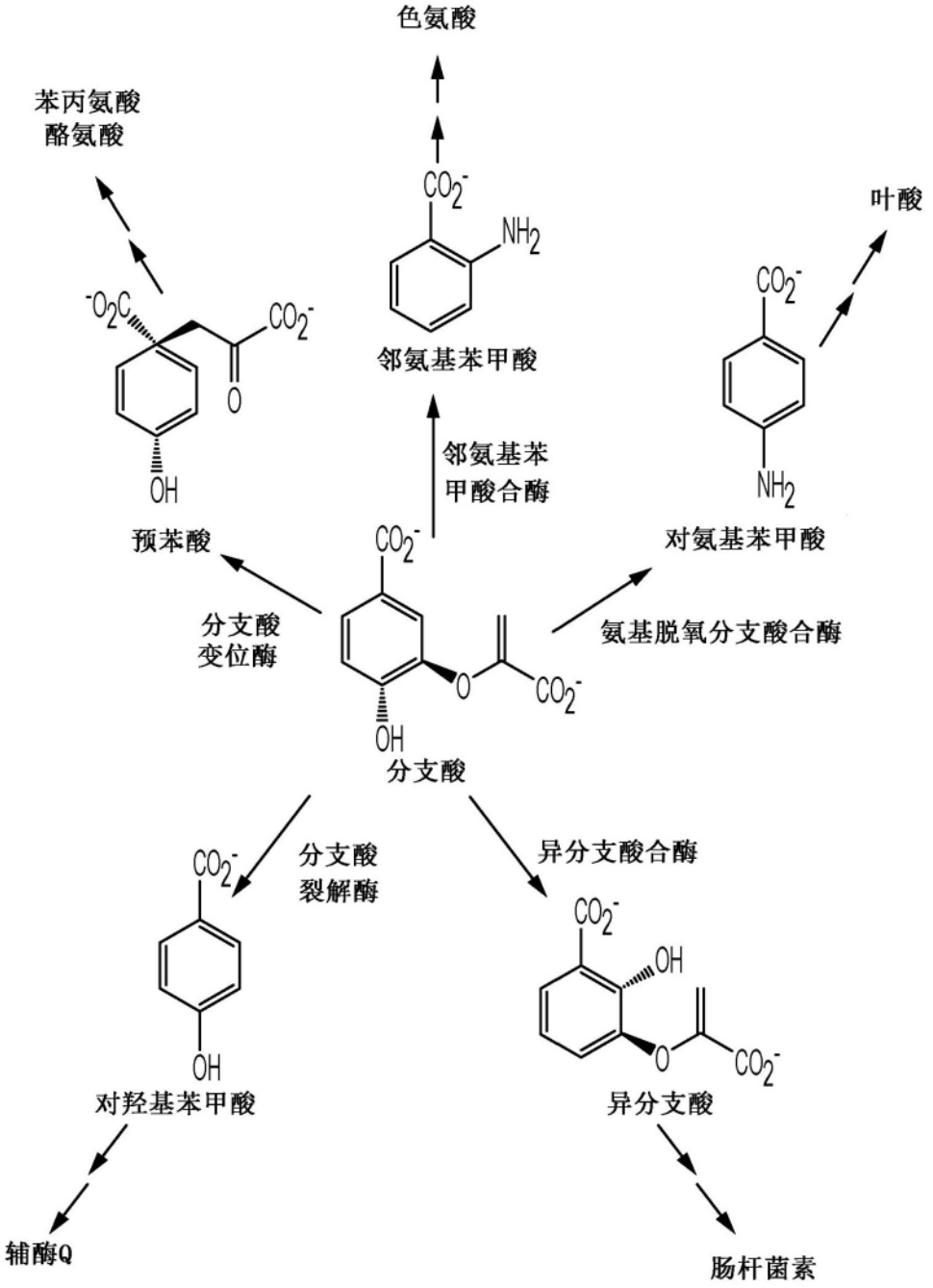

色氨酸
苯丙氨酸
酪氨酸
邻氨基苯甲酸
叶酸
邻氨基苯
甲酸合酶
预苯酸
对氨基苯甲酸
分支酸
变位酶
氨基脱氧分支酸合酶
分支酸
分支酸
裂解酶
异分支酸合酶
对羟基苯甲酸
异分支酸
辅酶Q
肠杆菌素

图2

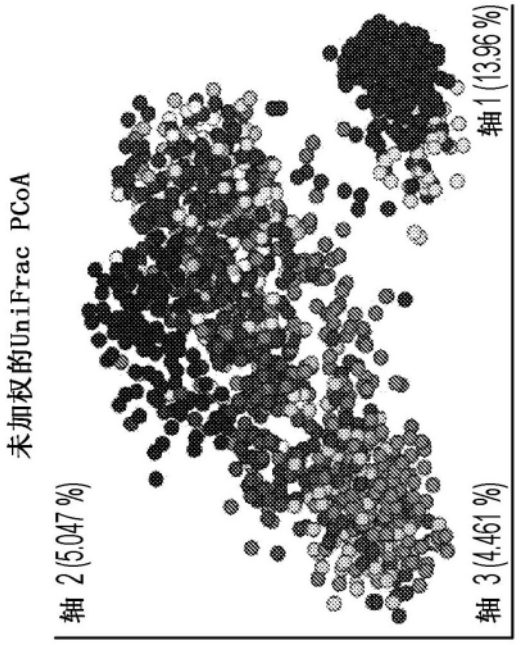

未加权的UniFrac PCoA
轴 2 (5.047 %)
轴 3 (4.461 %)
轴 1 (13.96 %)

图3A

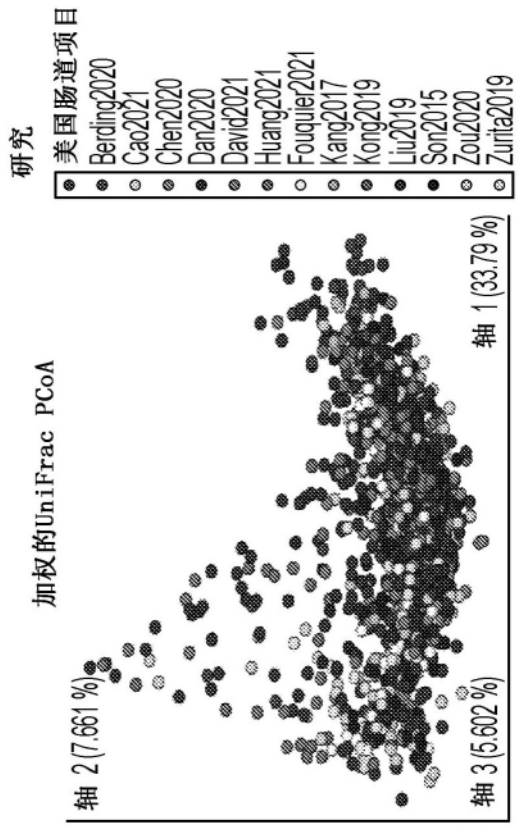

研究
美国肠道项目
Berding2020
Cao2021
Chen2020
Dan2020
David2021
Huang2021
Fouquier2021
Kang2017
Kong2019
Liu2019
Son2015
Zou2020
Zurita2019
加权的UniFrac PCoA
轴 2 (7.661 %)
轴 3 (5.602 %)
轴 1 (33.79 %)

图3B

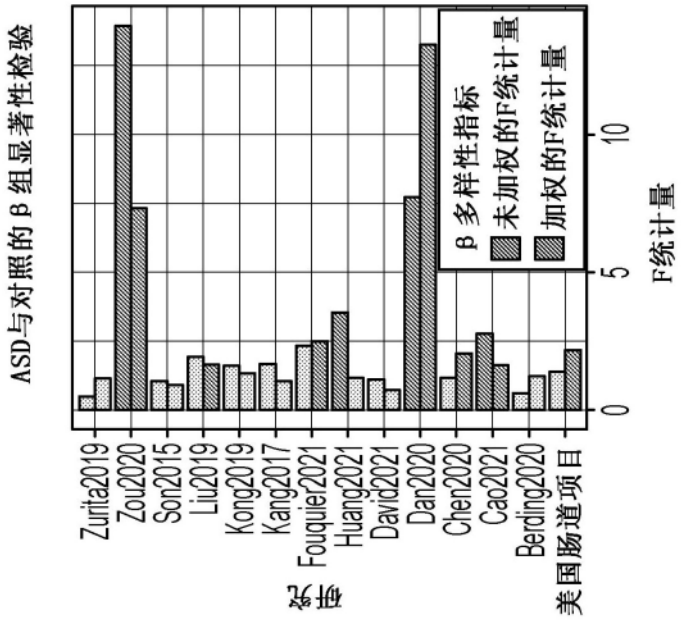

ASD与对照的β组显著性检验
β多样性指标
未加权的F统计量
加权的F统计量
F统计量
0
5
10
研究
美国肠道项目
Zurita2019
Zou2020
Son2015
Liu2019
Kong2019
Kang2017
Fouquier2021
Huang2021
David2021
Dan2020
Chen2020
Cao2021
Berding2020

图3C

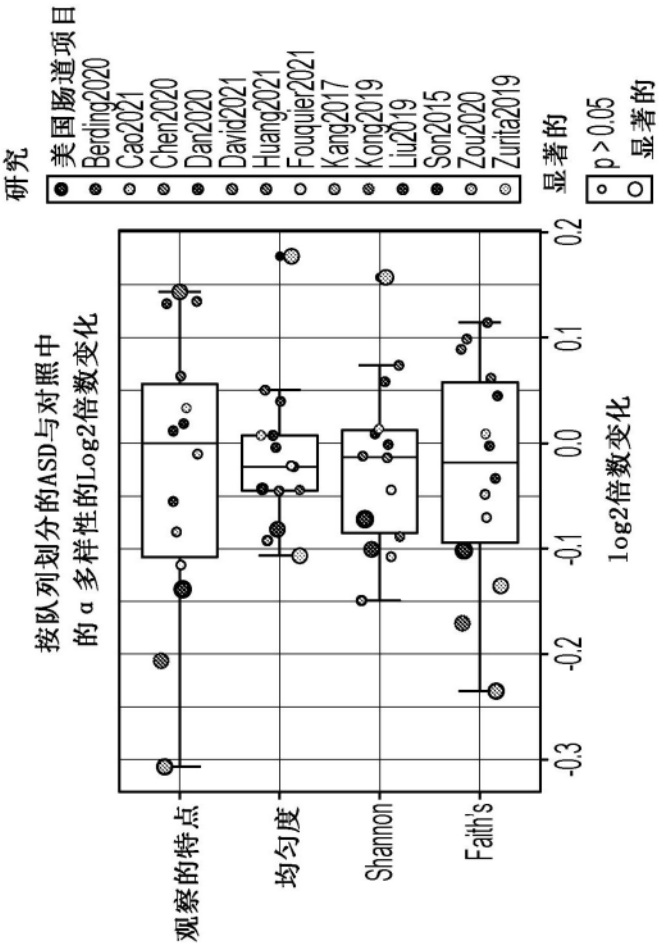

研究
美国肠道项目
Berding2020
Cao2021
Chen2020
Dan2020
David2021
Huang2021
Fouquier2021
Kang2017
Kong2019
Liu2019
Son2015
Zou2020
Zurita2019
显著的
p > 0.05
显著的
按队列划分的ASD与对照中
的α多样性的Log2倍数变化
观察的特点
均匀度
Shannon
Faith's
-0.3
-0.2
-0.1
0.0
0.1
0.2
log2倍数变化

图3D

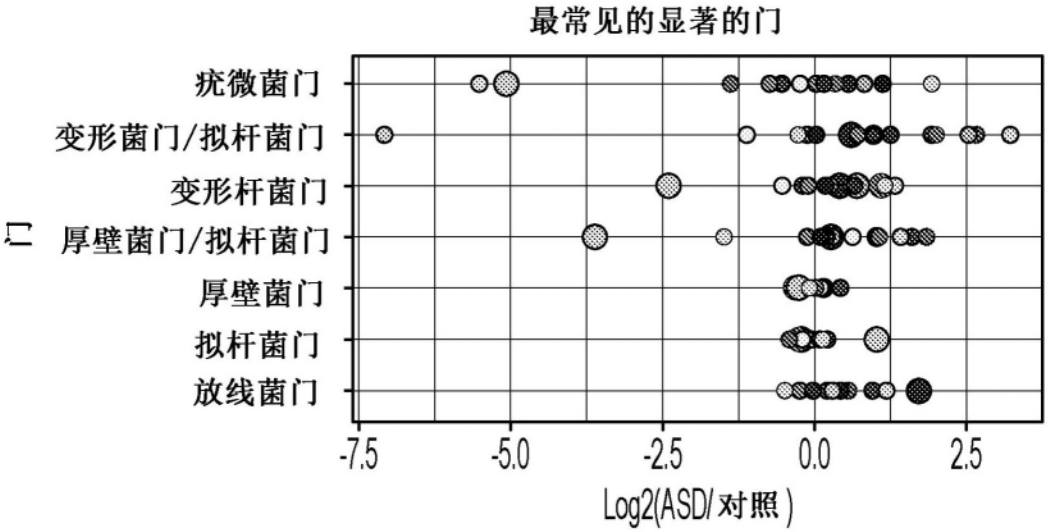

最常见的显著的门
疣微菌门
变形菌门/拟杆菌门
变形杆菌门
厚壁菌门/拟杆菌门
厚壁菌门
拟杆菌门
放线菌门
门
-7.5
-5.0
-2.5
0.0
2.5
Log2(ASD/对照)

图4A

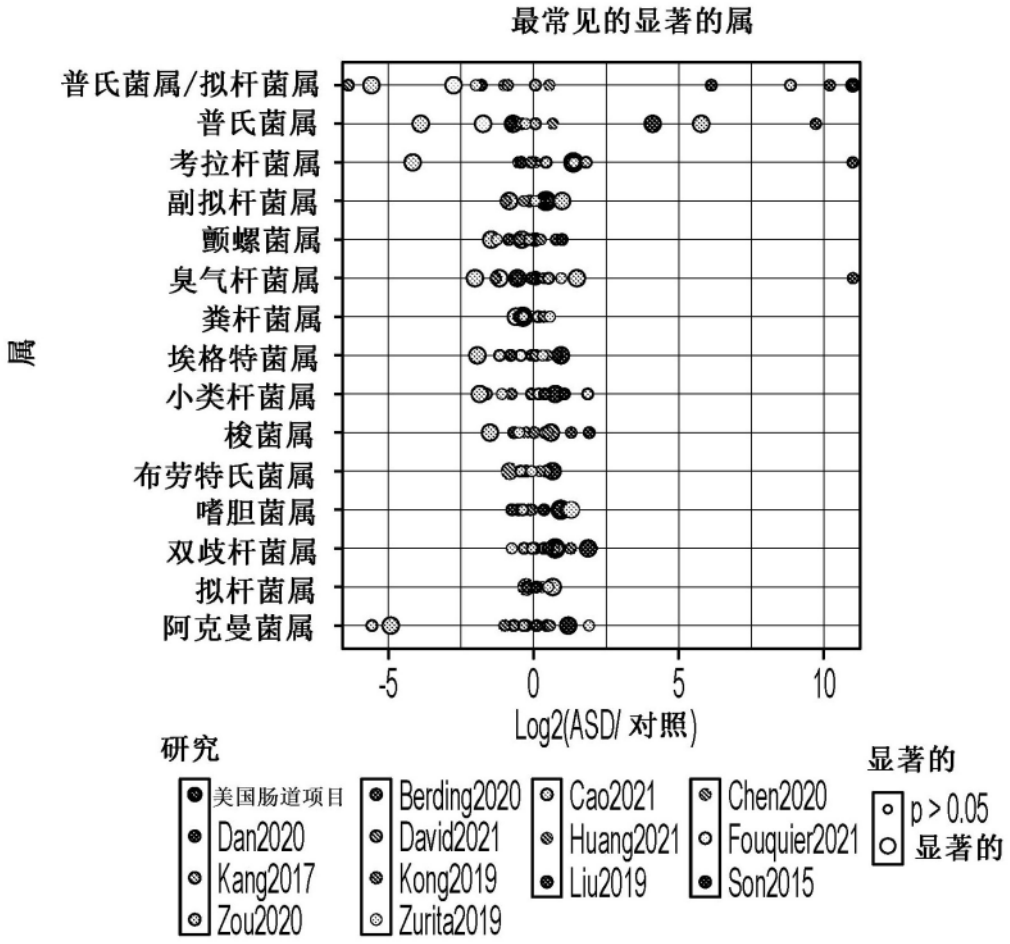

最常见的显著的属
普氏菌属/拟杆菌属
普氏菌属
考拉杆菌属
副拟杆菌属
颤螺菌属
臭气杆菌属
粪杆菌属
埃格特菌属
小类杆菌属
梭菌属
布劳特氏菌属
嗜胆菌属
双歧杆菌属
拟杆菌属
阿克曼菌属
属
-5
0
5
10
Log2(ASD/对照)
研究
美国肠道项目
Dan2020
Kang2017
Zou2020
Berding2020
David2021
Kong2019
Zurita2019
Cao2021
Huang2021
Liu2019
Chen2020
Fouquier2021
Son2015
显著的
p > 0.05
显著的

图4B

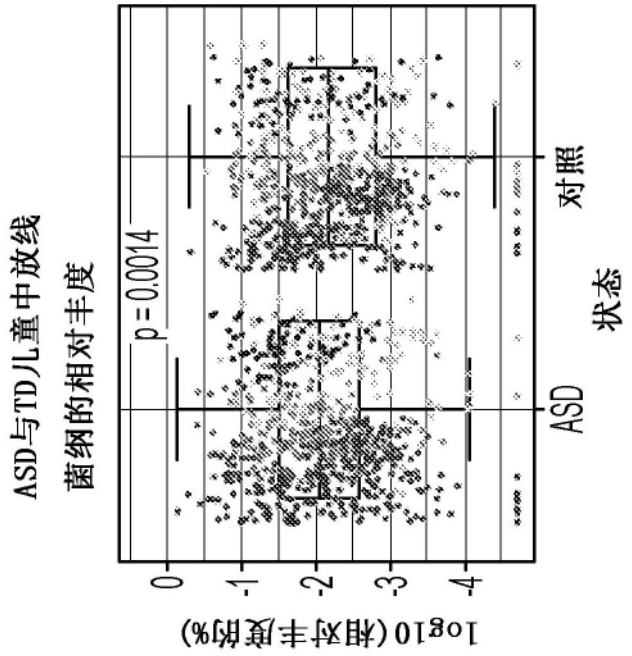

ASD与TD儿童中放线
菌纲的相对丰度
p = 0.0014
log10(相对丰度的%)
0
-1
-2
-3
-4
ASD
对照
状态

图4C

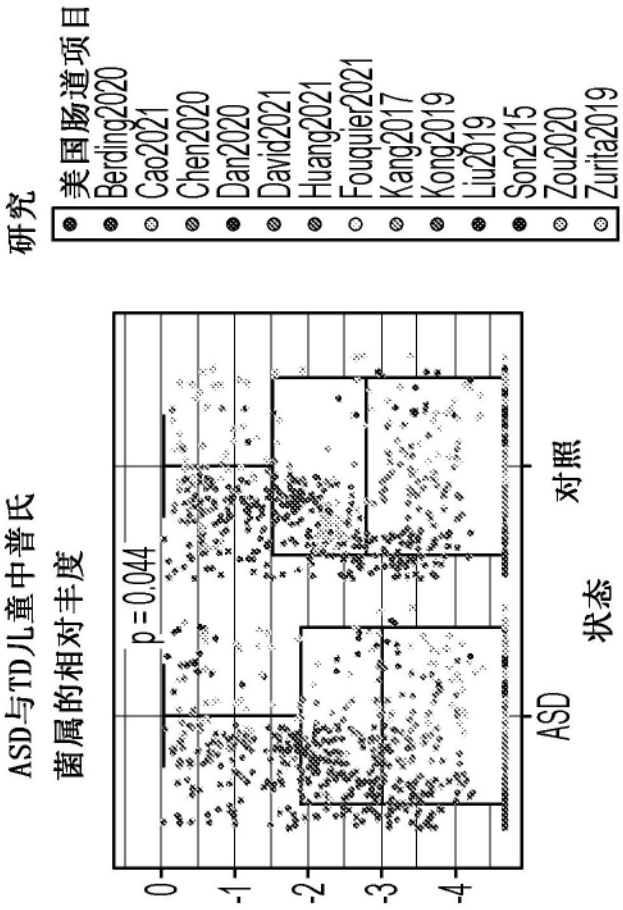

研究
美国肠道项目
Berding2020
Cao2021
Chen2020
Dan2020
David2021
Huang2021
Fouquier2021
Kang2017
Kong2019
Liu2019
Son2015
Zou2020
Zurita2019
ASD与TD儿童中普氏
菌属的相对丰度
p = 0.044
0
-1
-2
-3
-4
ASD
对照
状态

图4D

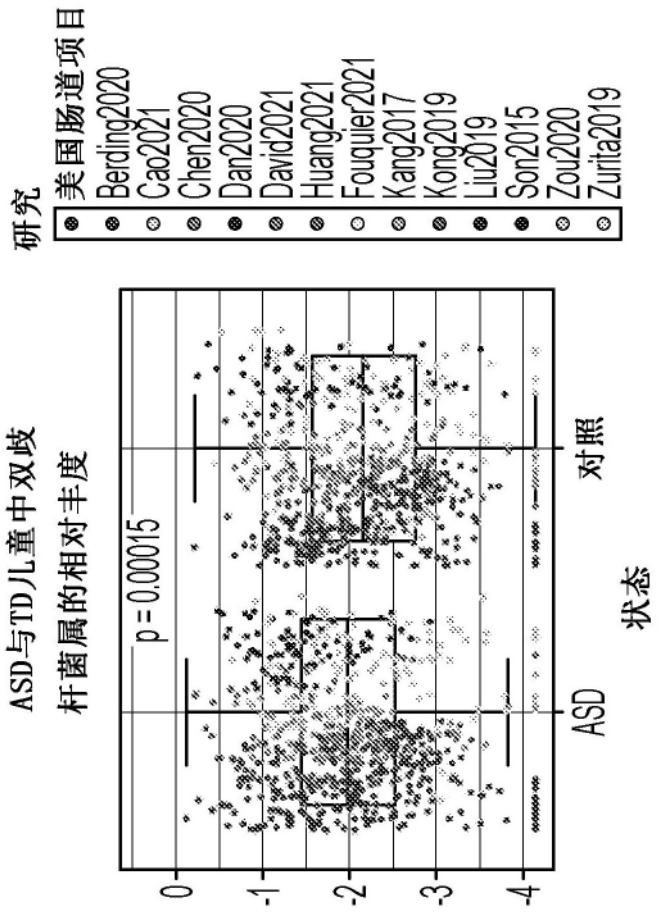

研究
美国肠道项目
Berding2020
Cao2021
Chen2020
Dan2020
David2021
Huang2021
Fouquier2021
Kang2017
Kong2019
Liu2019
Son2015
Zou2020
Zurita2019
ASD与TD儿童中双歧
杆菌属的相对丰度
p = 0.00015
0
-1
-2
-3
-4
ASD
对照
状态

图4E

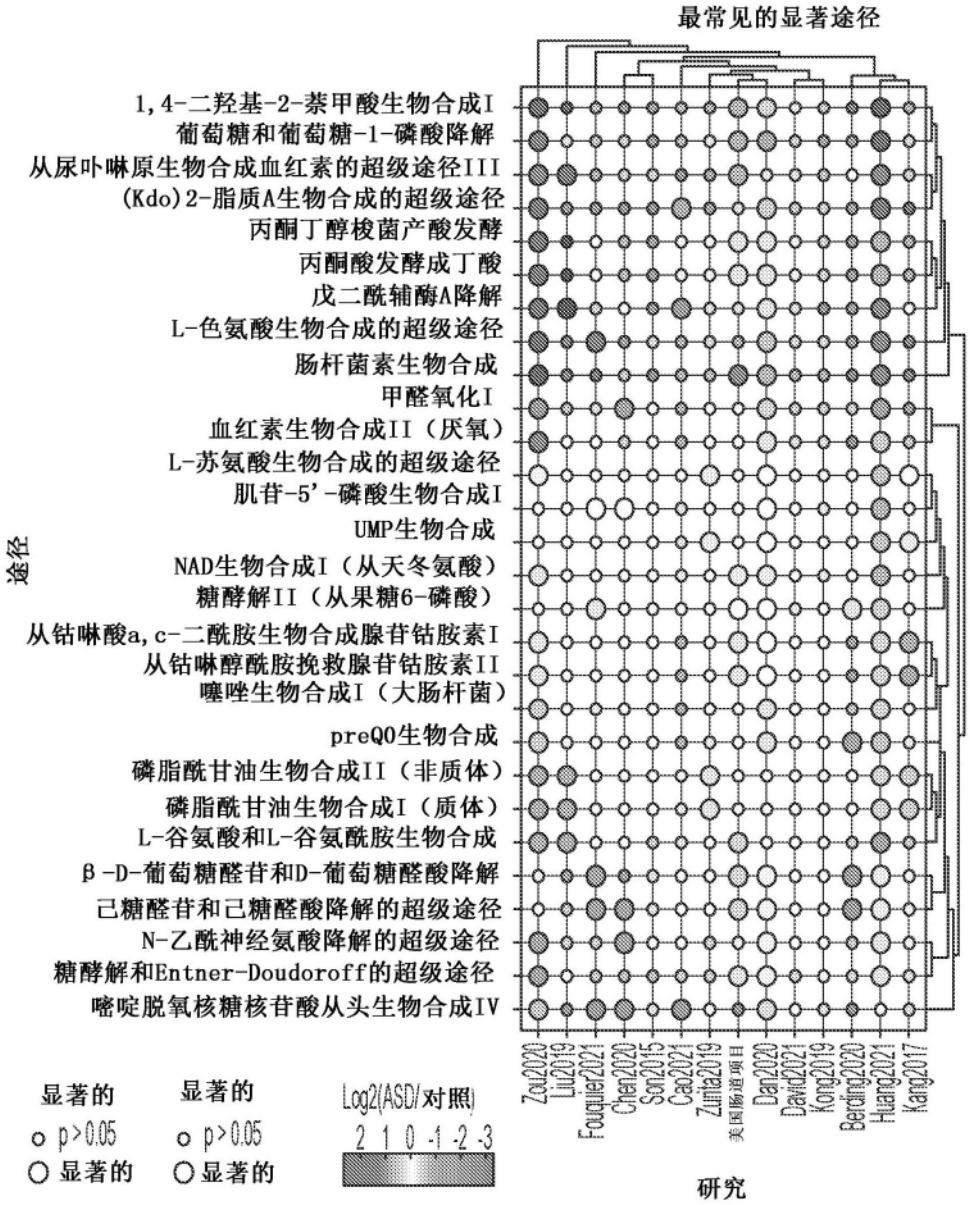

最常见的显著途径
1,4-二羟基-2-萘甲酸生物合成I
葡萄糖和葡萄糖-1-磷酸降解
从尿卟啉原生物合成血红素的超级途径III
(Kdo)2-脂质A生物合成的超级途径
丙酮丁醇梭菌产酸发酵
丙酮酸发酵成丁酸
戊二酰辅酶A降解
L-色氨酸生物合成的超级途径
肠杆菌素生物合成
甲醛氧化I
血红素生物合成II（厌氧）
L-苏氨酸生物合成的超级途径
肌苷-5'-磷酸生物合成I
UMP生物合成
NAD生物合成I（从天冬氨酸）
糖酵解II（从果糖6-磷酸）
从钴啉酸a,c-二酰胺生物合成腺苷钴胺素I
从钴啉醇酰胺挽救腺苷钴胺素II
噻唑生物合成I（大肠杆菌）
preQ0生物合成
磷脂酰甘油生物合成II（非质体）
磷脂酰甘油生物合成I（质体）
L-谷氨酸和L-谷氨酰胺生物合成
β-D-葡萄糖醛苷和D-葡萄糖醛酸降解
己糖醛苷和己糖醛酸降解的超级途径
N-乙酰神经氨酸降解的超级途径
糖酵解和Entner-Doudoroff的超级途径
嘧啶脱氧核糖核苷酸从头生物合成IV
途径
Zou2020
Liu2019
Foucquier2021
Chen2020
Son2015
Cao2021
Zuniga2019
美国肠道项目
Dan2020
David2021
Kong2019
Berding2020
Huang2021
Kang2017
研究
显著的
p>0.05
显著的
显著的
p>0.05
显著的
Log2(ASD/对照)
2 1 0 -1 -2 -3

图4F

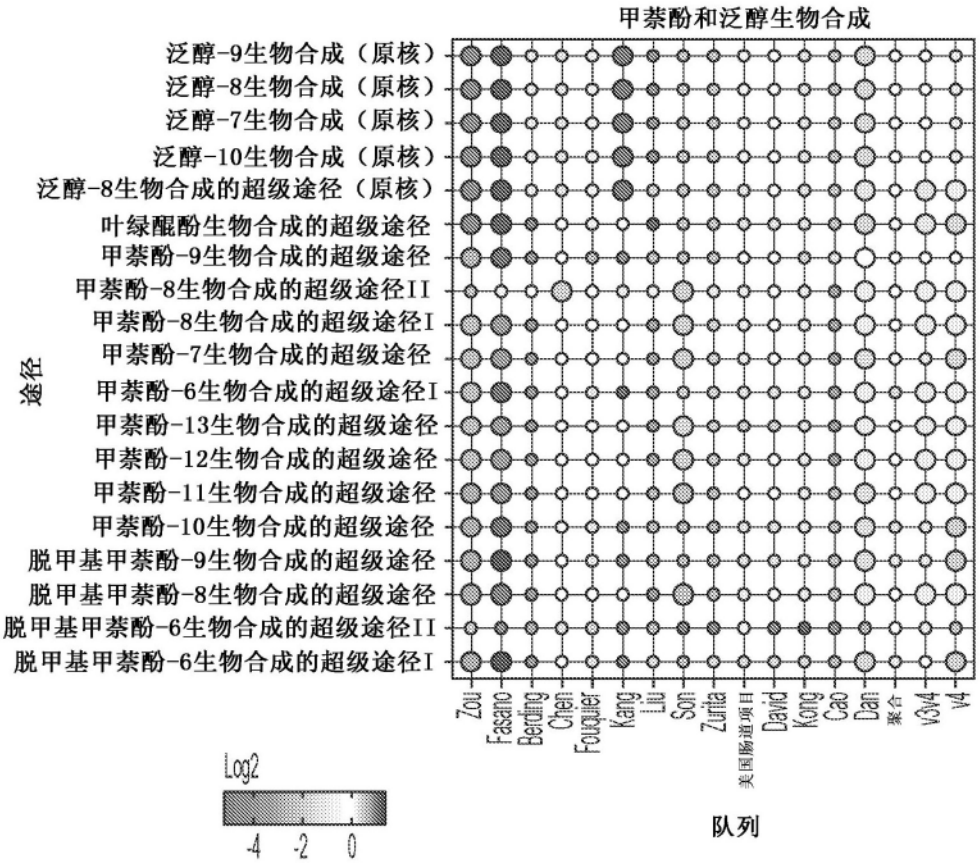

甲萘酚和泛醇生物合成
泛醇-9生物合成（原核）
泛醇-8生物合成（原核）
泛醇-7生物合成（原核）
泛醇-10生物合成（原核）
泛醇-8生物合成的超级途径（原核）
叶绿醌酚生物合成的超级途径
甲萘酚-9生物合成的超级途径
甲萘酚-8生物合成的超级途径II
甲萘酚-8生物合成的超级途径I
甲萘酚-7生物合成的超级途径
甲萘酚-6生物合成的超级途径I
甲萘酚-13生物合成的超级途径
甲萘酚-12生物合成的超级途径
甲萘酚-11生物合成的超级途径
甲萘酚-10生物合成的超级途径
脱甲基甲萘酚-9生物合成的超级途径
脱甲基甲萘酚-8生物合成的超级途径
脱甲基甲萘酚-6生物合成的超级途径II
脱甲基甲萘酚-6生物合成的超级途径I
途径
Zou
Fasano
Berding
Chen
Fouquier
Kang
Liu
Son
Zurita
美国肠道项目
David
Kong
Cao
Dan
聚合
v3v4
v4
队列
Log2
-4
-2
0

图4G

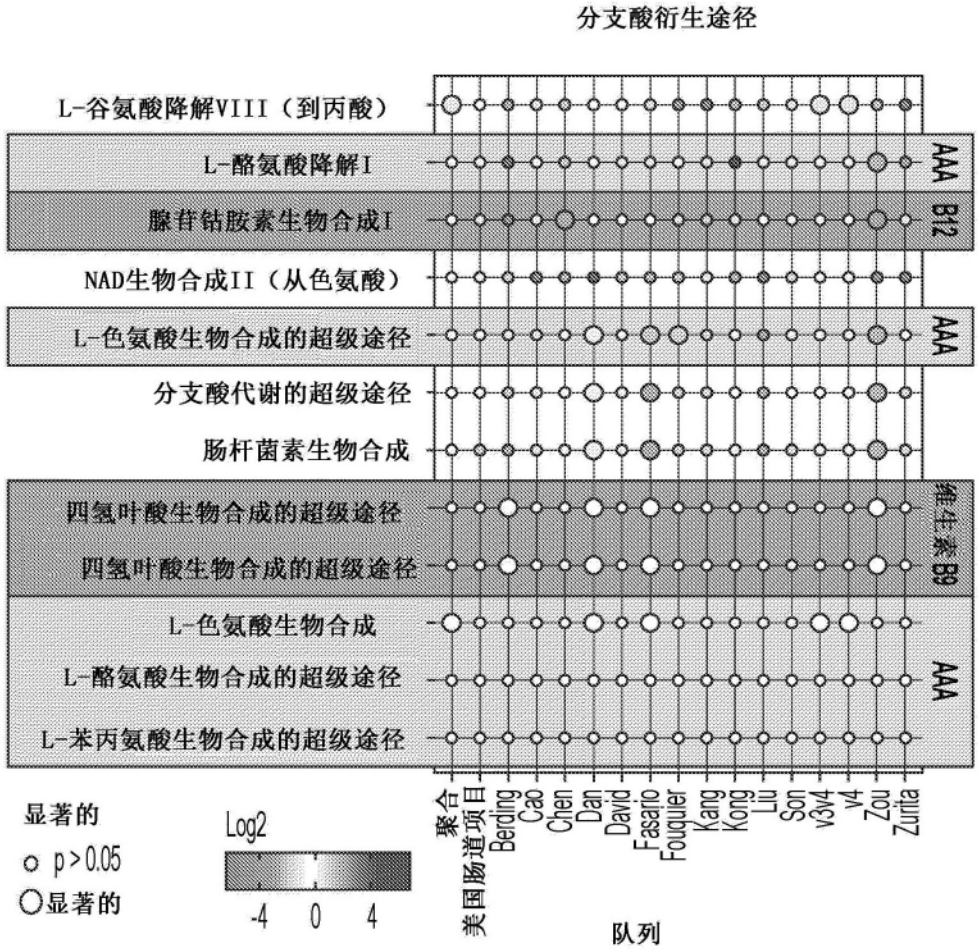

分支酸衍生途径
L-谷氨酸降解VIII（到丙酸）
L-酪氨酸降解I
腺苷钴胺素生物合成I
NAD生物合成II（从色氨酸）
L-色氨酸生物合成的超级途径
分支酸代谢的超级途径
肠杆菌素生物合成
四氢叶酸生物合成的超级途径
四氢叶酸生物合成的超级途径
L-色氨酸生物合成
L-酪氨酸生物合成的超级途径
L-苯丙氨酸生物合成的超级途径
AAA
B12
AAA
维生素B9
AAA
聚合
美国肠道项目
Berding
Cao
Chen
Dan
David
Fasano
Fouquier
Kang
Kong
Liu
Son
v3v4
v4
Zou
Zurita
队列
显著的
p>0.05
显著的
Log2
-4
0
4

图4H

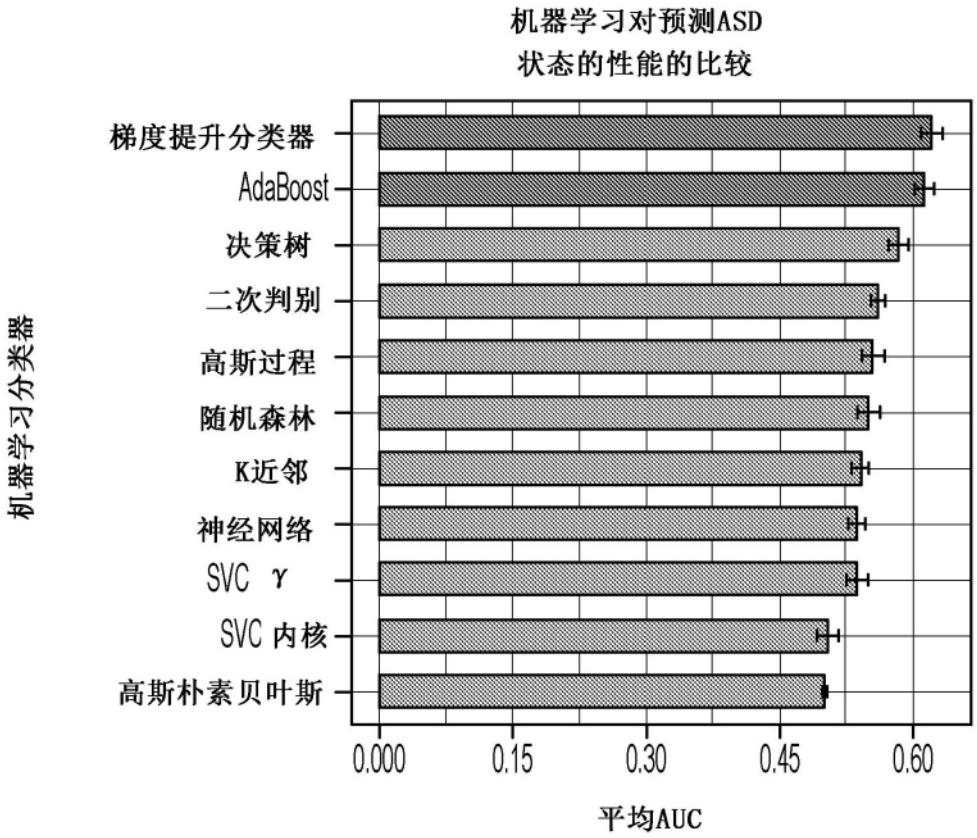

机器学习对预测ASD
状态的性能的比较
梯度提升分类器
AdaBoost
决策树
二次判别
高斯过程
随机森林
K近邻
神经网络
SVC γ
SVC 内核
高斯朴素贝叶斯
机器学习分类器
0.000
0.15
0.30
0.45
0.60
平均AUC

图5A

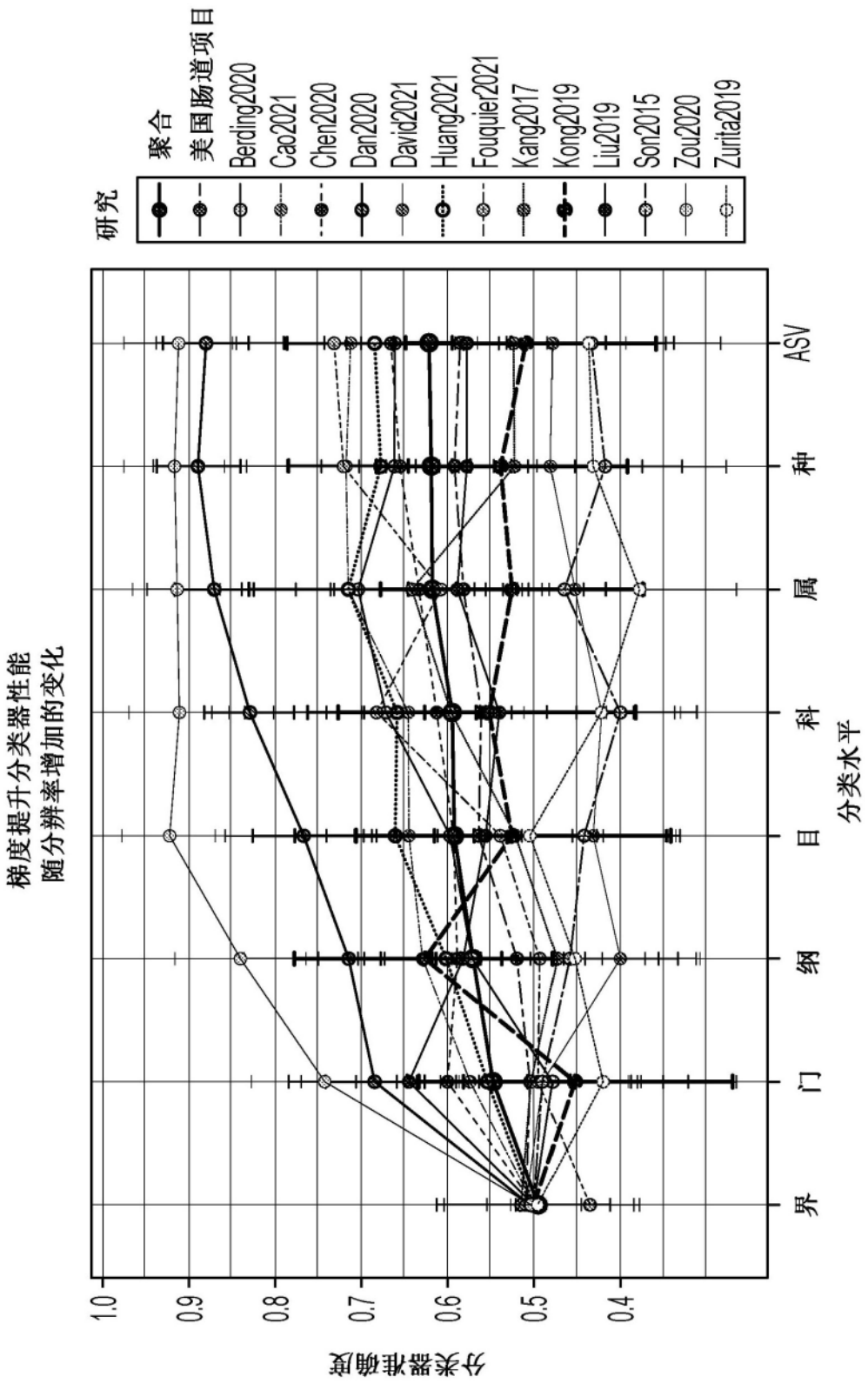

梯度提升分类器性能
随分辨率增加的变化
研究
聚合
美国肠道项目
Berding2020
Cao2021
Chen2020
Dan2020
David2021
Huang2021
Fouquier2021
Kang2017
Kong2019
Liu2019
Son2015
Zou2020
Zurita2019
分类器准确度
1.0
0.9
0.8
0.7
0.6
0.5
0.4
界
门
纲
目
科
属
种
ASV
分类水平

图5B

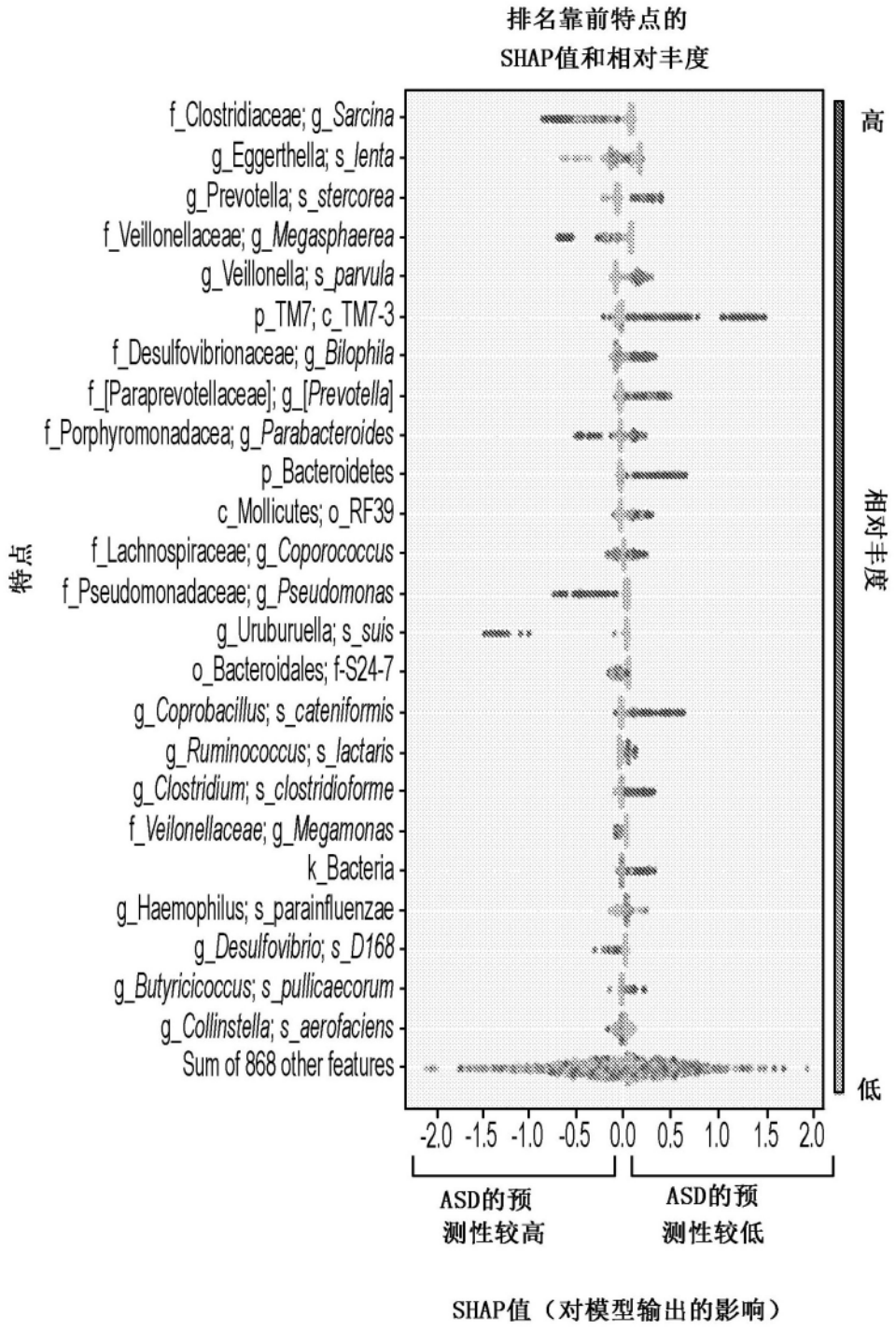

排名靠前特点的
SHAP值和相对丰度
f_Clostridiaceae; g_Sarcina
g_Eggerthella; s_lenta
g_Prevotella; s_stercorea
f_Veillonellaceae; g_Megasphaerea
g_Veillonella; s_parvula
p_TM7; c_TM7-3
f_Desulfovibrionaceae; g_Bilophila
f_[Paraprevotellaceae]; g_[Prevotella]
f_Porphyromonadacea; g_Parabacteroides
p_Bacteroidetes
c_Mollicutes; o_RF39
f_Lachnospiraceae; g_Coporococcus
f_Pseudomonadaceae; g_Pseudomonas
g_Uruburuella; s_suis
o_Bacteroidales; f-S24-7
g_Coprobacillus; s_cateniformis
g_Ruminococcus; s_lactaris
g_Clostridium; s_clostridioforme
f_Veilonellaceae; g_Megamonas
k_Bacteria
g_Haemophilus; s_parainfluenzae
g_Desulfovibrio; s_D168
g_Butyricicoccus; s_pullicaecorum
g_Collinstella; s_aerofaciens
Sum of 868 other features
特点
高
相对丰度
低
-2.0 -1.5 -1.0 -0.5 0.0 0.5 1.0 1.5 2.0
ASD的预测性较高
ASD的预测性较低
SHAP值（对模型输出的影响）

图5C

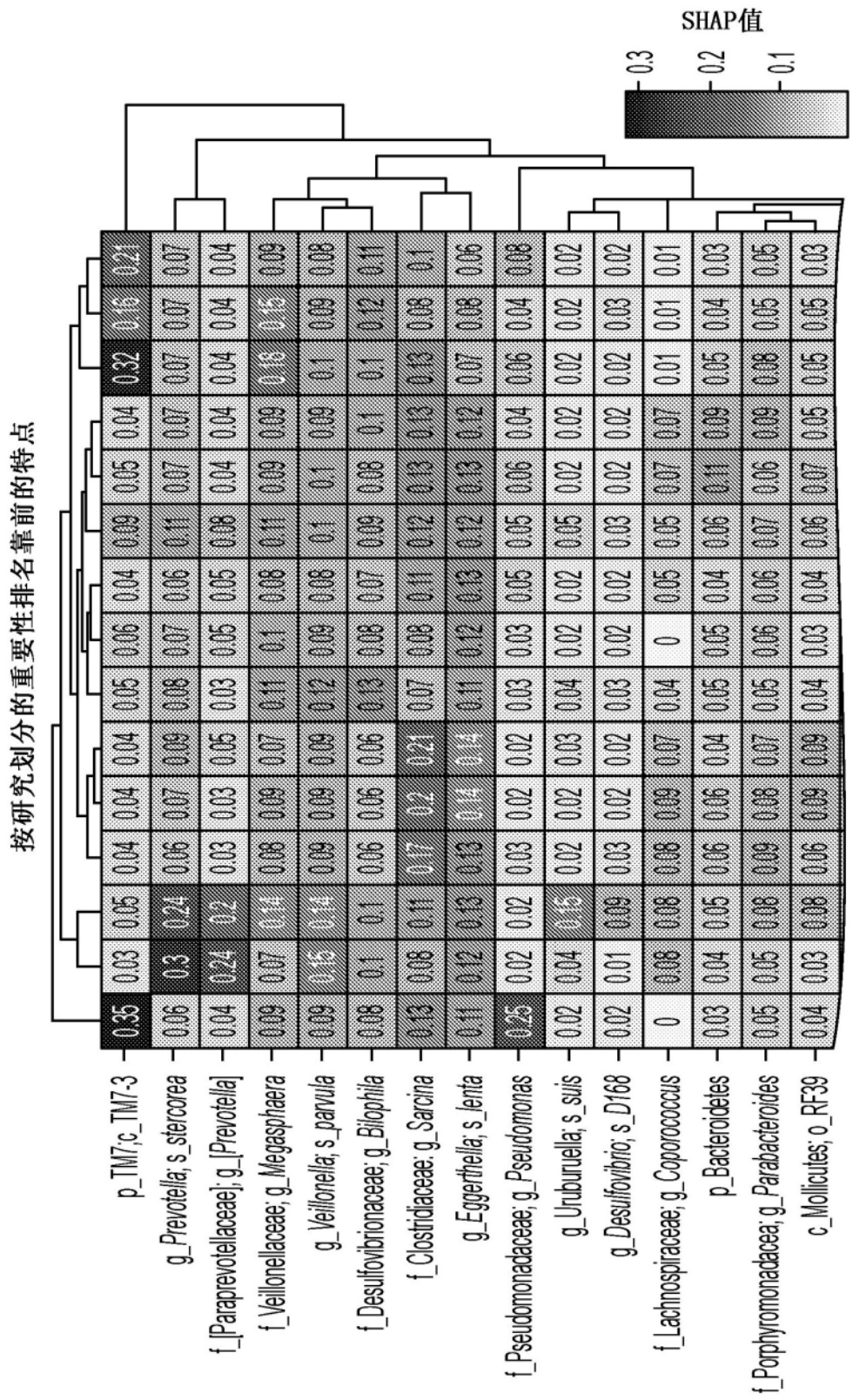

SHAP值
0.3
0.2
0.1
按研究划分的重要性排名靠前的特点
p_TM7;c_TM7-3
g_Prevotella; s_stercorea
f_[Paraprevotellaceae]; g_[Prevotella]
f_Veillonellaceae; g_Megasphaera
g_Veillonella; s_parvula
f_Desulfovibrionaceae; g_Bilophila
f_Clostridiaceae; g_Sarcina
g_Eggerthella; s_lenta
f_Pseudomonadaceae; g_Pseudomonas
g_Uruburuella; s_suis
g_Desulfovibrio; s_D168
f_Lachnospiraceae; g_Coprococcus
p_Bacteroidetes
f_Porphyromonadacea; g_Parabacteroides
c_Mollicutes; o_RF39

图5D

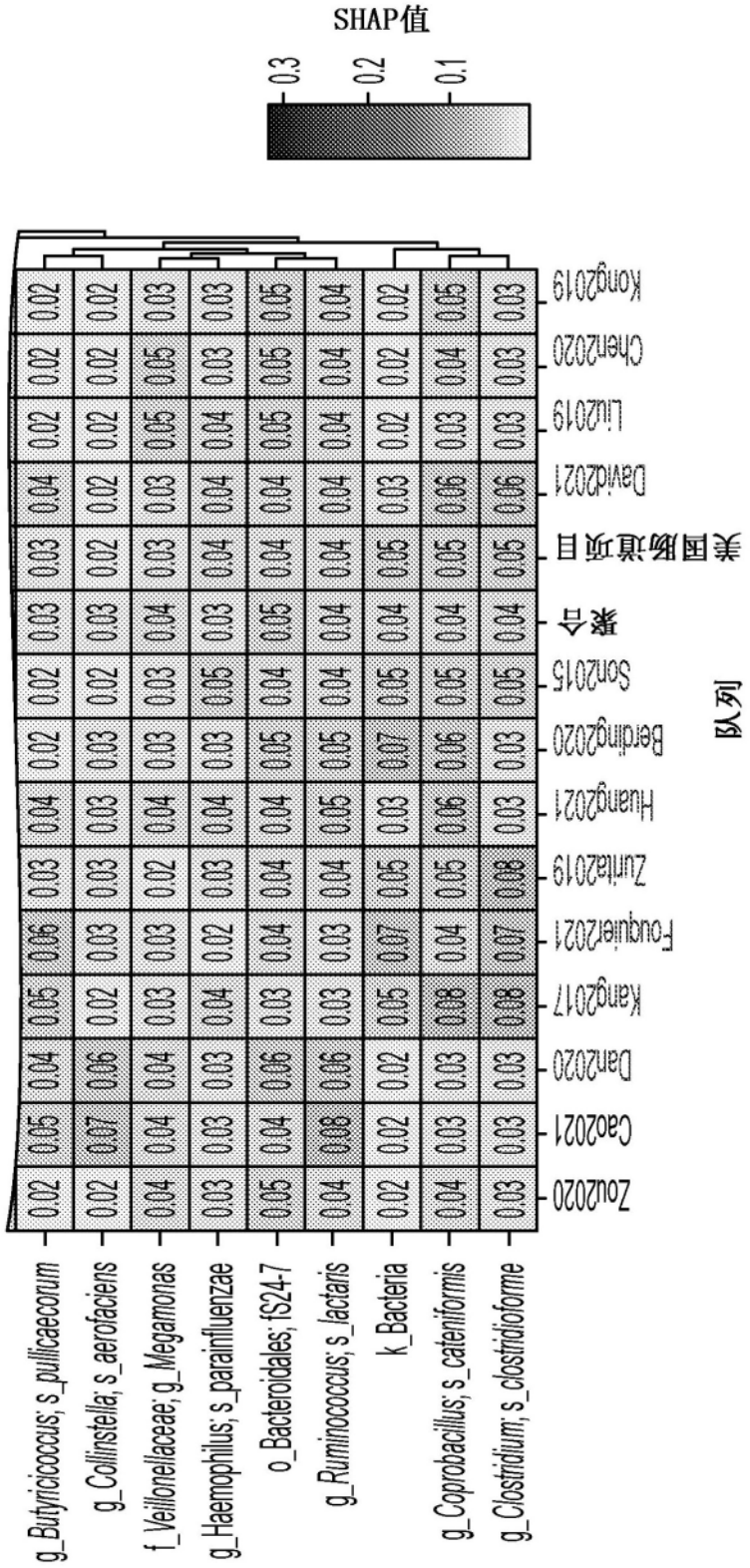

SHAP值
0.3
0.2
0.1
队列
聚合
美国肠道项目
ZouZ020
Cao2021
Dan2020
Kang2017
Fouquier2021
Zuni2019
Huang2021
Berding2020
Son2015
David2021
Liu2019
Chen2020
Kong2019
g_Butyricicoccus; s_pullicaecorum
g_Collinstella; s_aerofaciens
f_Veillonellaceae; g_Megamonas
g_Haemophilus; s_parainfluenzae
o_Bacteroidales; fS24-7
g_Ruminococcus; s_lactaris
k_Bacteria
g_Coprobacillus; s_cateniformis
g_Clostridium; s_clostridioforme

图5D续

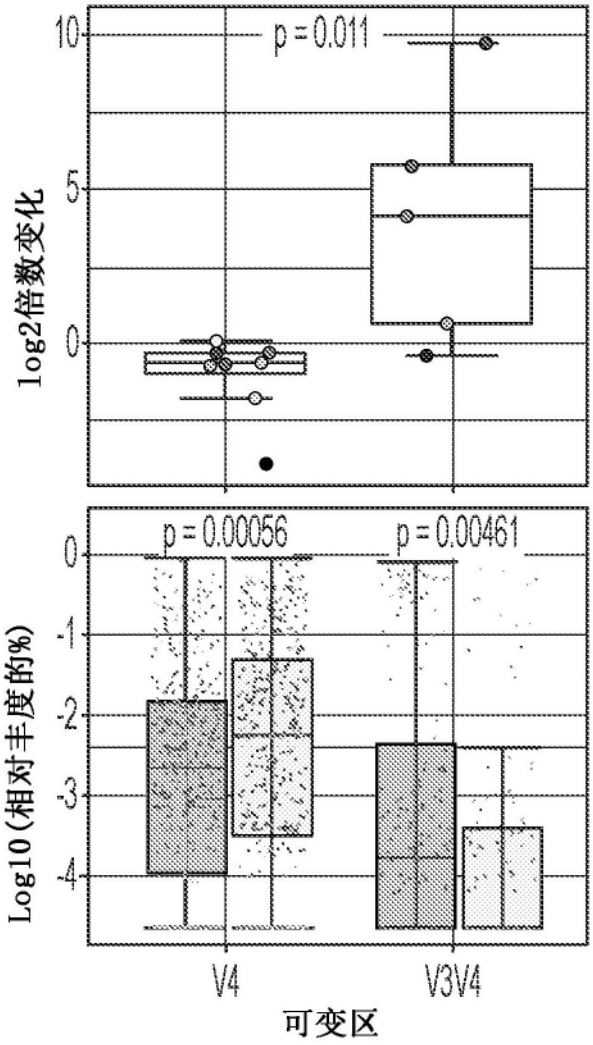

普氏菌属
p = 0.011
log2倍数变化
10
5
0
p = 0.00056
p = 0.00461
Log10(相对丰度的%)
0
-1
-2
-3
-4
V4
V3V4
可变区

图6A

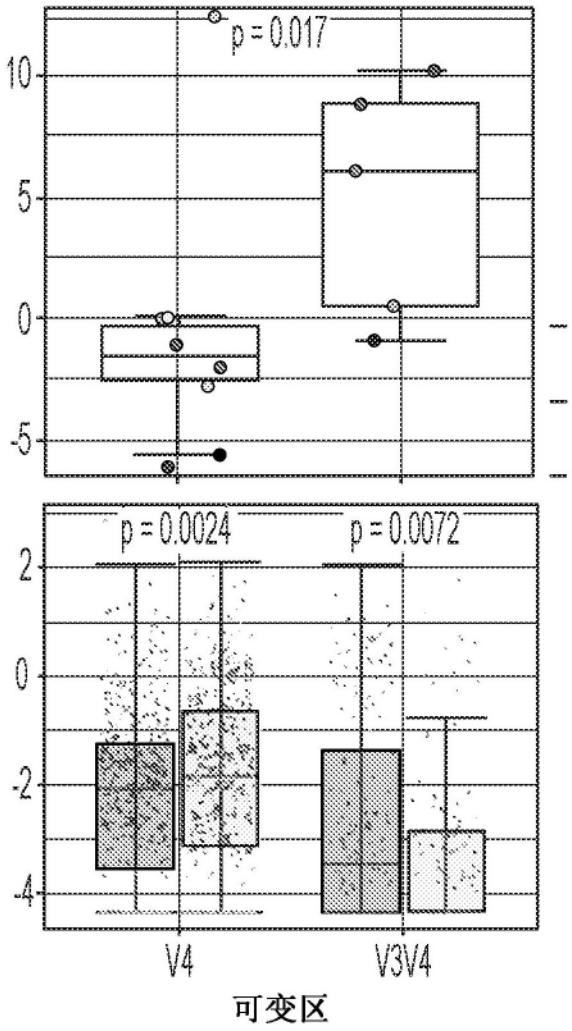


图6B

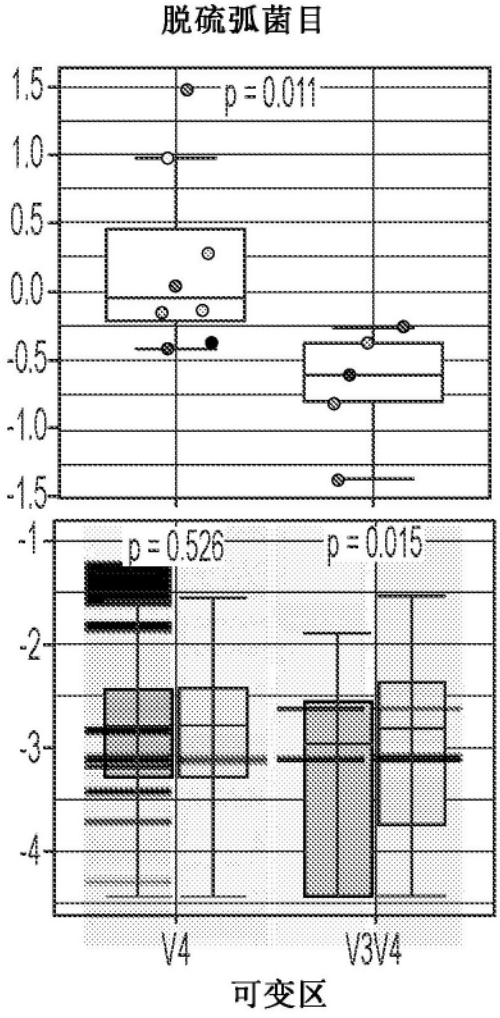


图6C

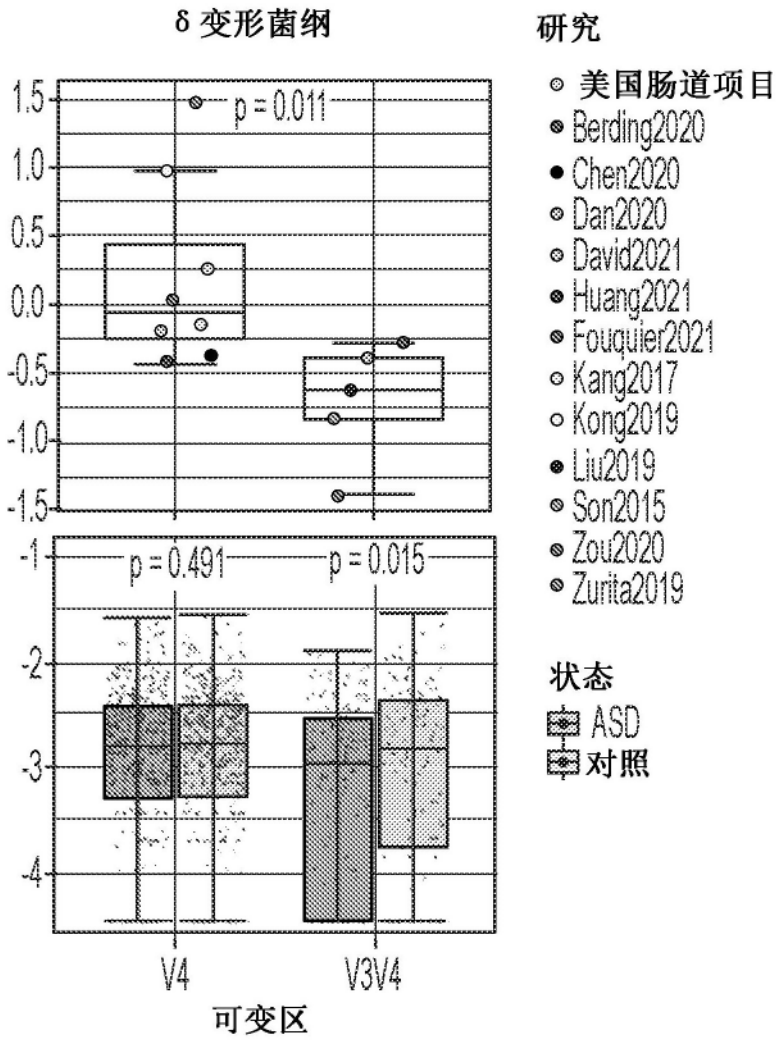

δ变形菌纲
研究
美国肠道项目
Berding2020
Chen2020
Dan2020
David2021
Huang2021
Fouquier2021
Kang2017
Kong2019
Liu2019
Son2015
Zou2020
Zurita2019
状态
ASD
对照
p = 0.011
p = 0.491
p = 0.015
1.5
1.0
0.5
0.0
-0.5
-1.0
-1.5
-1
-2
-3
-4
V4
V3V4
可变区

图6D

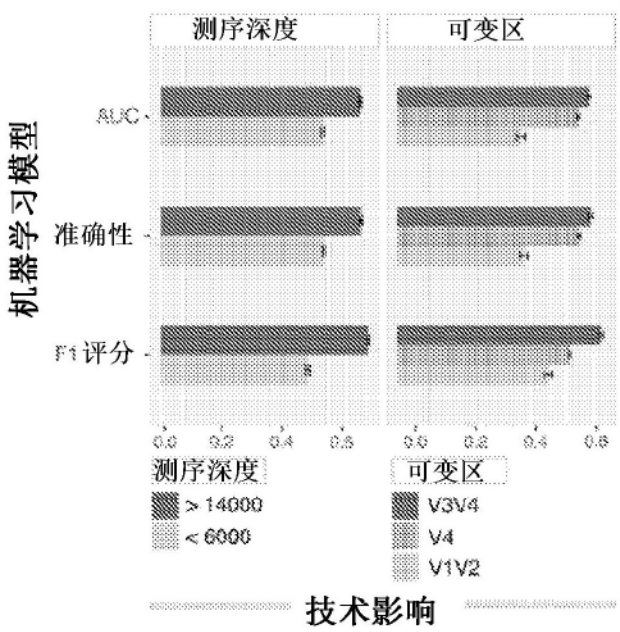

测序深度
可变区
AUC
准确性
F1评分
机器学习模型
0.0
0.2
0.4
0.6
测序深度
> 14000
< 6000
可变区
V3V4
V4
V1V2
技术影响

图6E

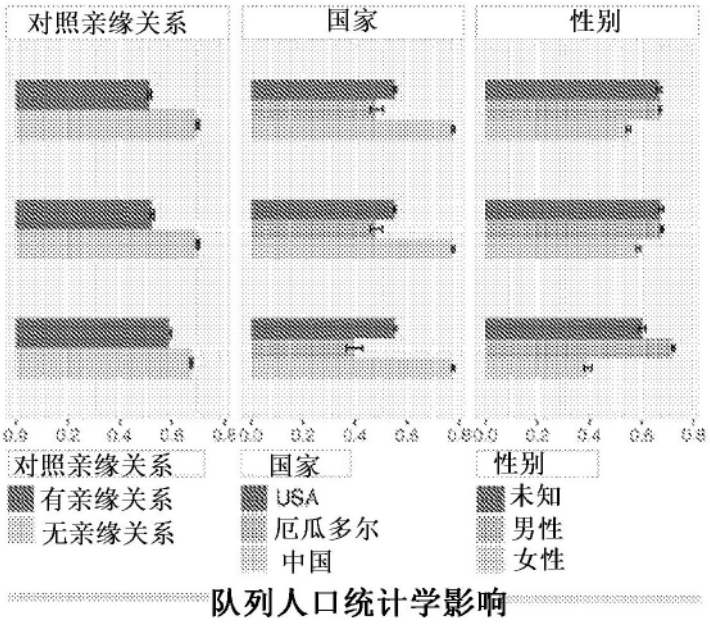

对照亲缘关系
国家
性别
对照亲缘关系
有亲缘关系
无亲缘关系
国家
USA
厄瓜多尔
中国
性别
未知
男性
女性
队列人口统计学影响

图6F

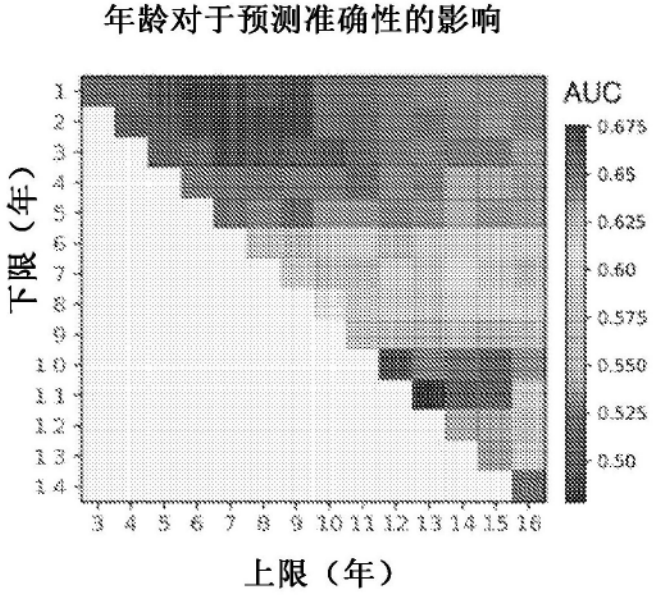

年龄对于预测准确性的影响
AUC
0.675
0.65
0.625
0.60
0.575
0.550
0.525
0.50
下限（年）
1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14
3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14 15 16
上限（年）

图6G

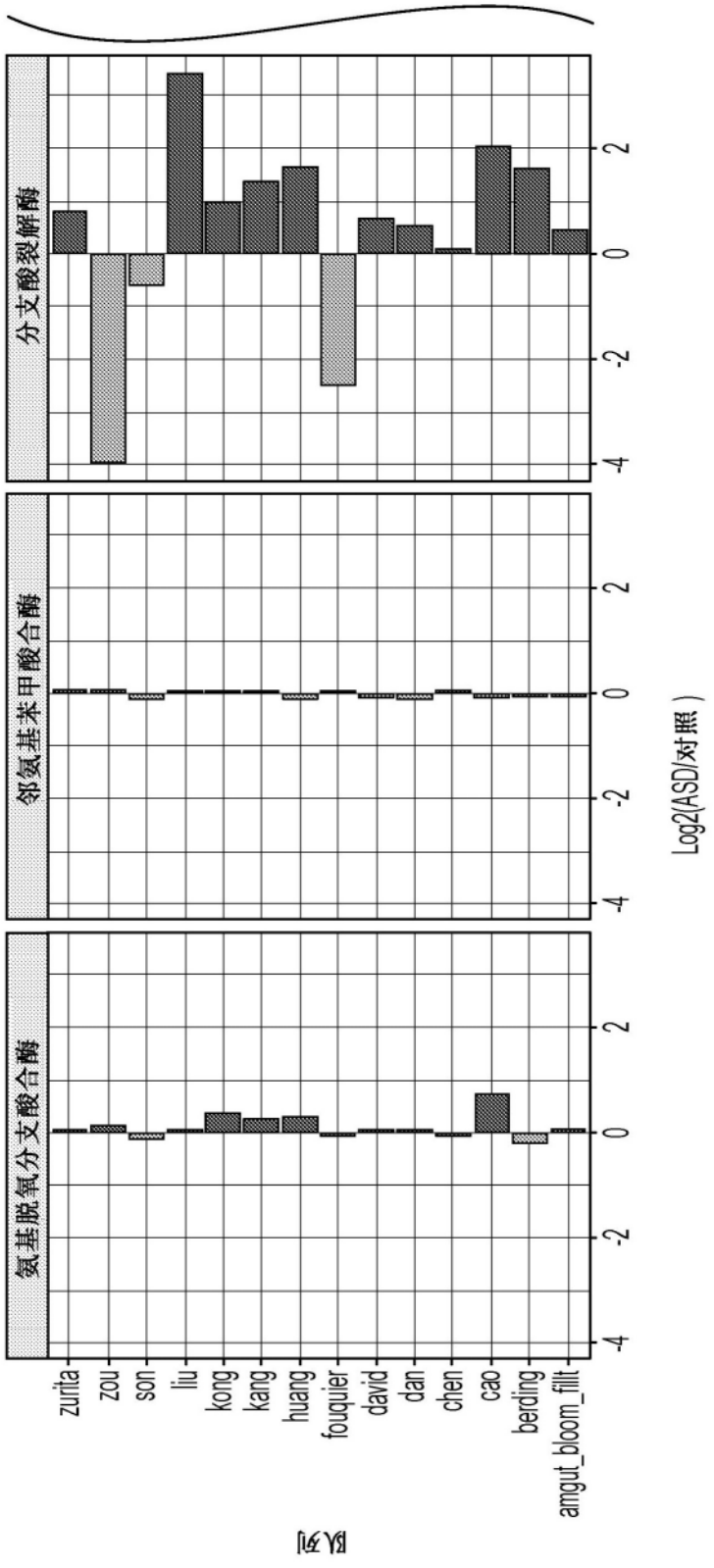

分支酸裂解酶
邻氨基苯甲酸合酶
氨基脱氧分支酸合酶
2
0
-2
-4
Log2(ASD/对照)
zurita
zou
son
liu
kong
kang
huang
fouquier
david
dan
chen
cao
berding
amgut_bloom_filt
队列

图7A

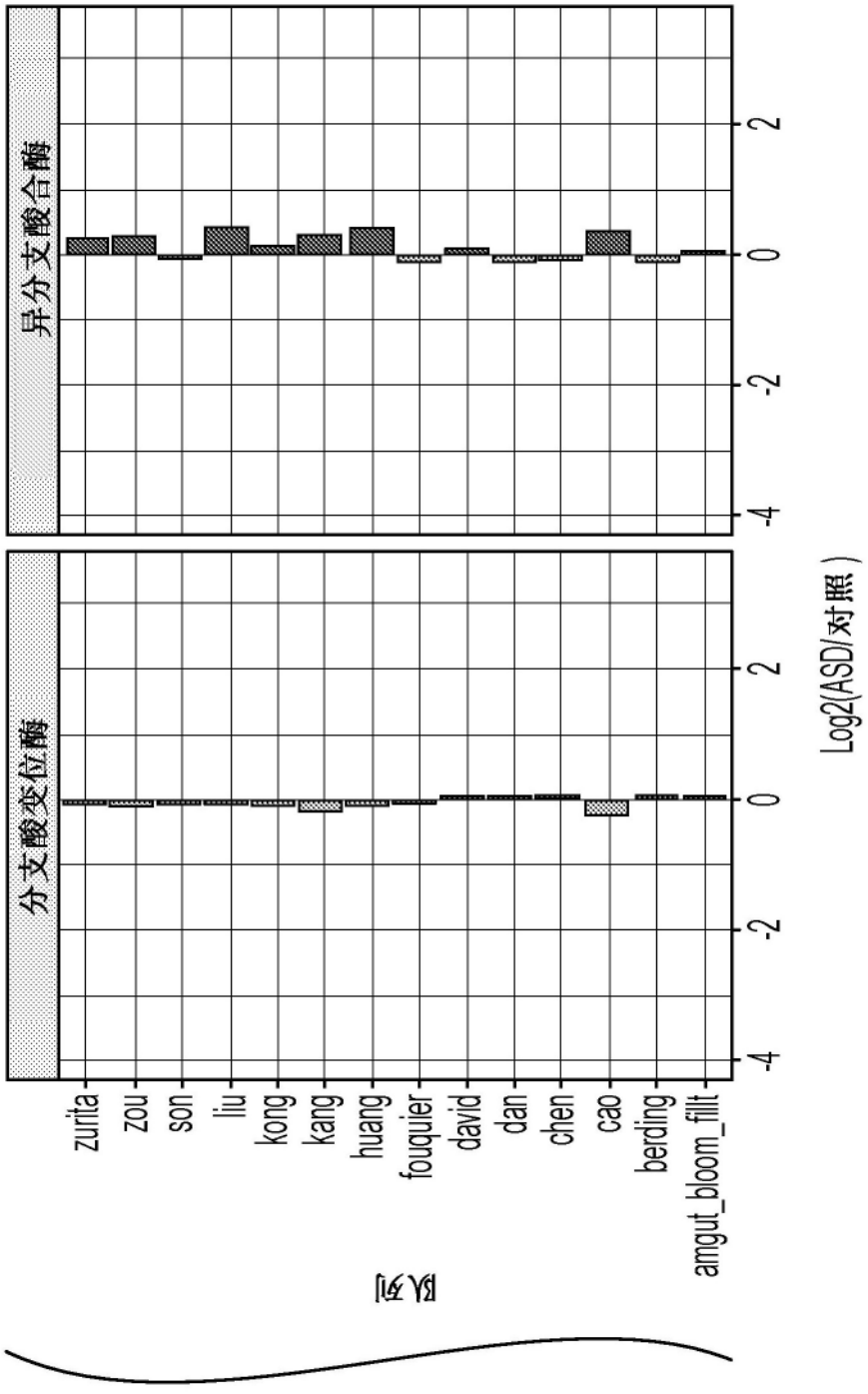

异分支酸合酶
分支酸变位酶
2
0
-2
-4
Log2(ASD/对照)
队列
zurita
zou
son
liu
kong
kang
huang
fouquier
david
dan
chen
cao
berding
amgut_bloom_fillt

图7A续

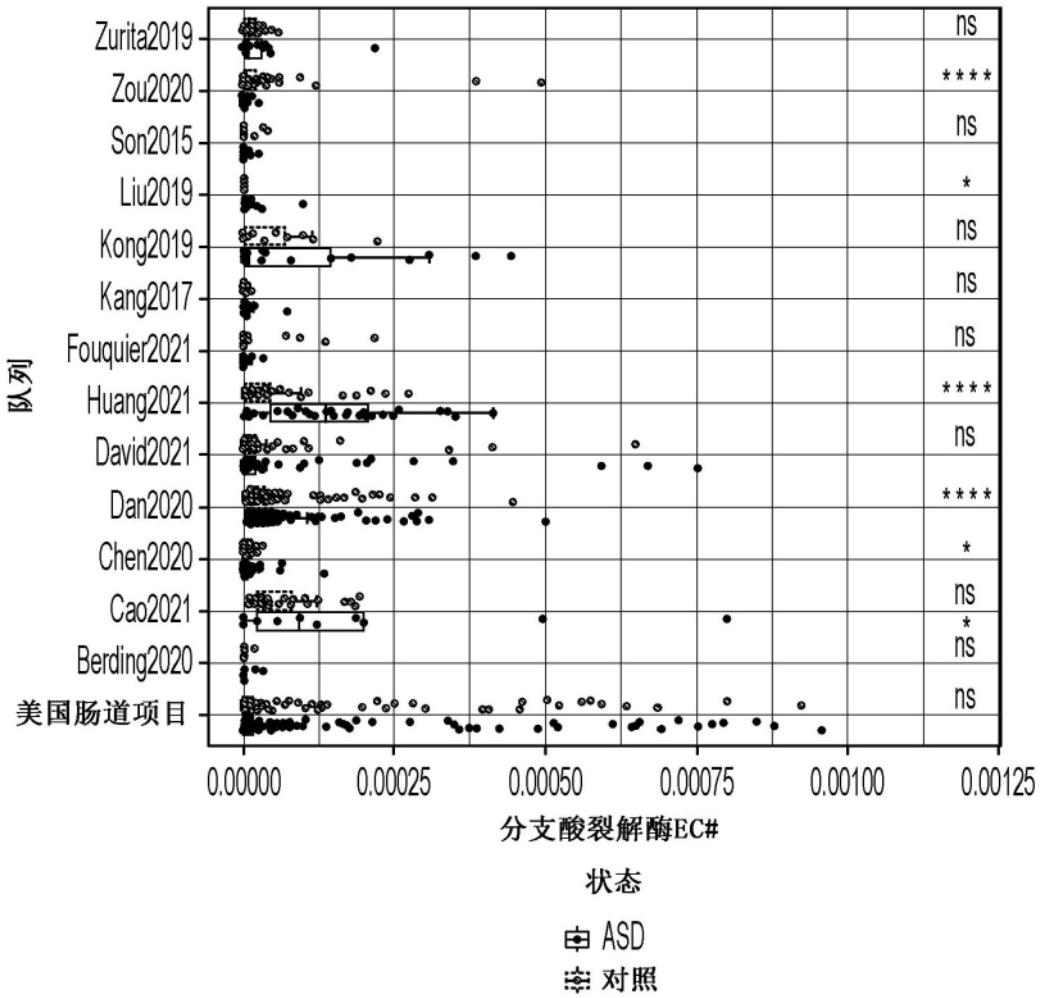

Zurita2019
Zou2020
Son2015
Liu2019
Kong2019
Kang2017
Fouquier2021
Huang2021
David2021
Dan2020
Chen2020
Cao2021
Berding2020
美国肠道项目
队列
ns
****
ns
*
ns
ns
ns
****
ns
****
*
ns
*
ns
ns
0.00000
0.00025
0.00050
0.00075
0.00100
0.00125
分支酸裂解酶EC#
状态
ASD
对照

图7B

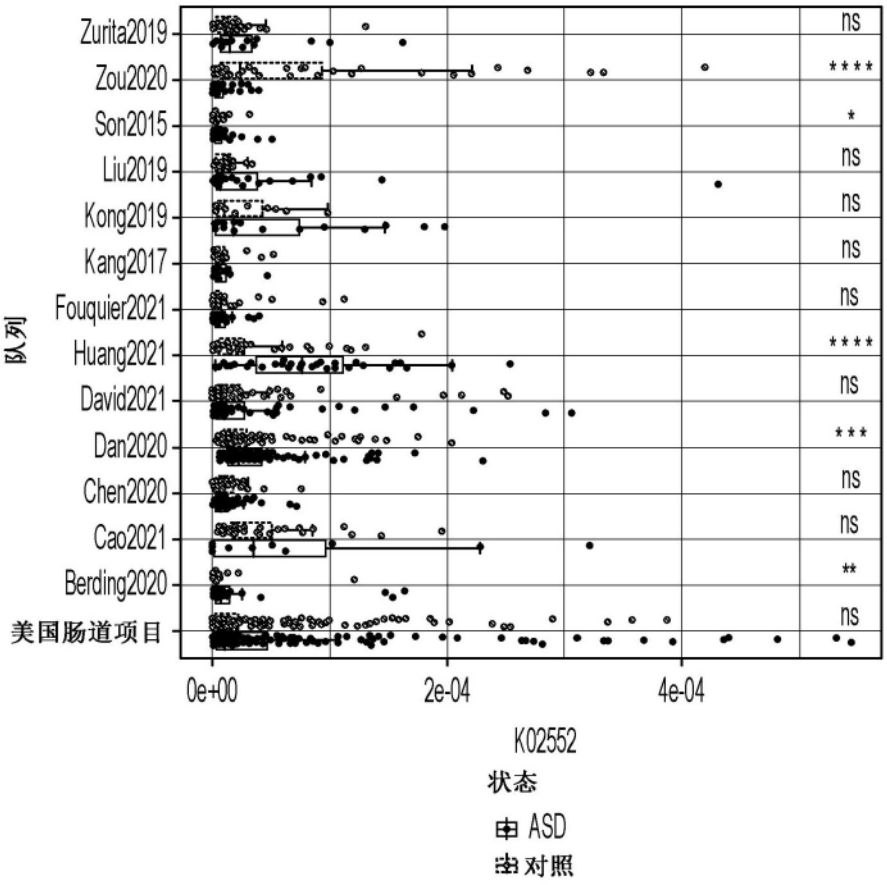

Zurita2019
Zou2020
Son2015
Liu2019
Kong2019
Kang2017
Fouquier2021
Huang2021
David2021
Dan2020
Chen2020
Cao2021
Berding2020
美国肠道项目
队列
ns
****
*
ns
ns
ns
ns
****
ns
***
ns
ns
**
ns
0e+00
2e-04
4e-04
K02552
状态
ASD
对照

图7C

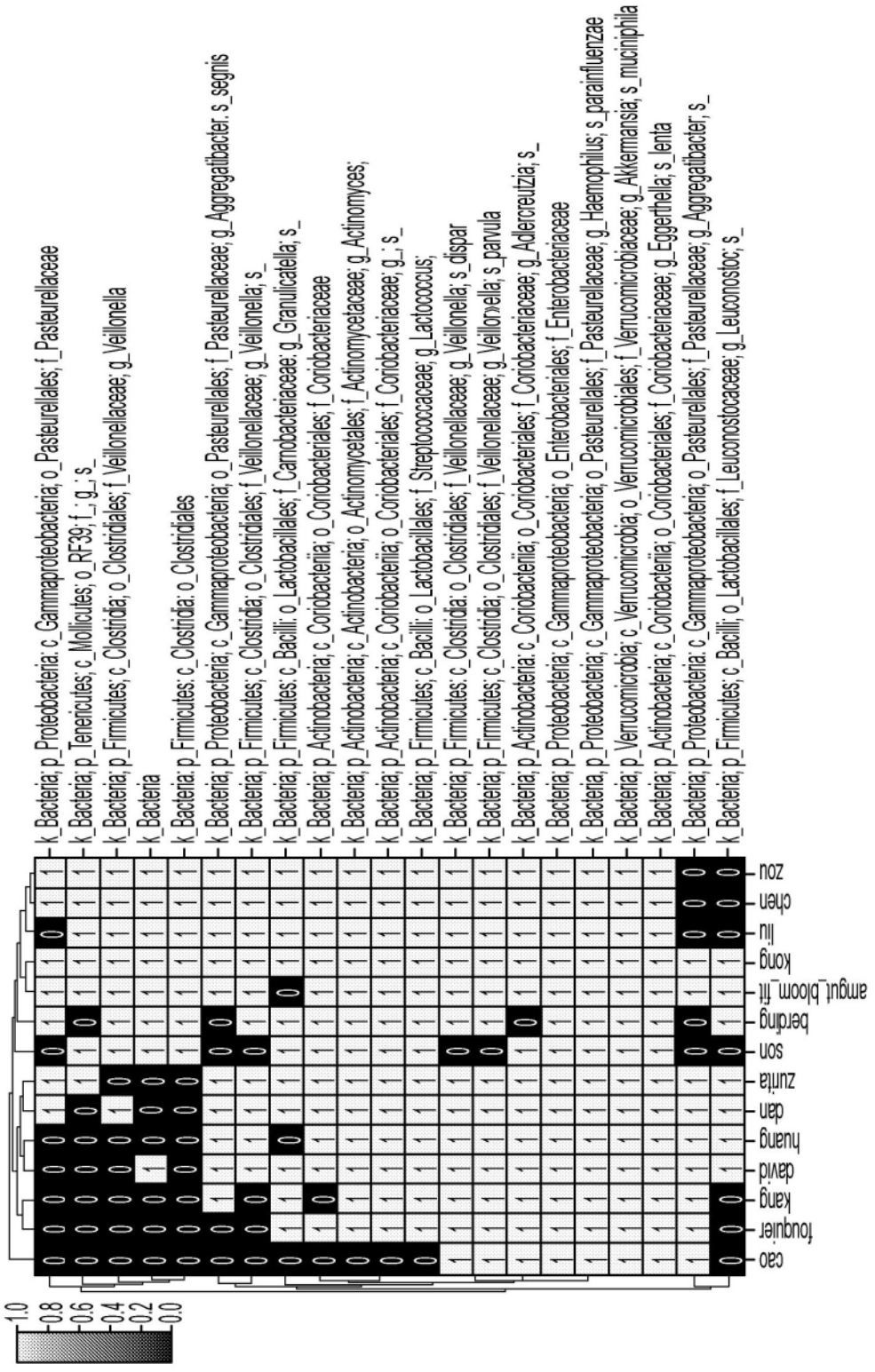

k_Bacteria; p_Proteobacteria; c_Gammaproteobacteria; o_Pasteurellales; f_Pasteurellaceae
k_Bacteria; p_Tenericutes; c_Mollicutes; o_RF39; f_; g_; s_
k_Bacteria; p_Firmicutes; c_Clostridia; o_Clostridiales; f_Veillonellaceae; g_Veillonella
k_Bacteria
k_Bacteria; p_Firmicutes; c_Clostridia; o_Clostridiales
k_Bacteria; p_Proteobacteria; c_Gammaproteobacteria; o_Pasteurellales; f_Pasteurellaceae; g_Aggregatibacter; s_segnis
k_Bacteria; p_Firmicutes; c_Clostridia; o_Clostridiales; f_Veillonellaceae; g_Veillonella; s_
k_Bacteria; p_Firmicutes; c_Bacilli; o_Lactobacillales; f_Carnobacteriaceae; g_Granulicatella; s_
k_Bacteria; p_Actinobacteria; c_Coriobacteriia; o_Coriobacteriales; f_Coriobacteriaceae
k_Bacteria; p_Actinobacteria; c_Actinobacteria; o_Actinomycetales; f_Actinomycetaceae; g_Actinomyces;
k_Bacteria; p_Actinobacteria; c_Coriobacteriia; o_Coriobacteriales; f_Coriobacteriaceae; g_; s_
k_Bacteria; p_Firmicutes; c_Bacilli; o_Lactobacillales; f_Streptococcaceae; g_Lactococcus;
k_Bacteria; p_Firmicutes; c_Clostridia; o_Clostridiales; f_Veillonellaceae; g_Veillonella; s_dispar
k_Bacteria; p_Firmicutes; c_Clostridia; o_Clostridiales; f_Veillonellaceae; g_Veillonella; s_parvula
k_Bacteria; p_Actinobacteria; c_Coriobacteriia; o_Coriobacteriales; f_Coriobacteriaceae; g_Adlercreutzia; s_
k_Bacteria; p_Proteobacteria; c_Gammaproteobacteria; o_Enterobacteriales; f_Enterobacteriaceae
k_Bacteria; p_Proteobacteria; c_Gammaproteobacteria; o_Pasteurellales; f_Pasteurellaceae; g_Haemophilus; s_parainfluenzae
k_Bacteria; p_Verrucomicrobia; c_Verrucomicrobia; o_Verrucomicrobiales; f_Verrucomicrobiaceae; g_Akkermansia; s_muciniphila
k_Bacteria; p_Actinobacteria; c_Coriobacteriia; o_Coriobacteriales; f_Coriobacteriaceae; g_Eggerthella; s_lenta
k_Bacteria; p_Proteobacteria; c_Gammaproteobacteria; o_Pasteurellales; f_Pasteurellaceae; g_Aggregatibacter; s_
k_Bacteria; p_Firmicutes; c_Bacilli; o_Lactobacillales; f_Leuconostocaceae; g_Leuconostoc; s_
cao
fouquier
kang
david
huang
dan
zurita
son
berding
amgut_bloom_fit
kong
liu
chen
zou
1.0
0.8
0.6
0.4
0.2
0.0

图7D

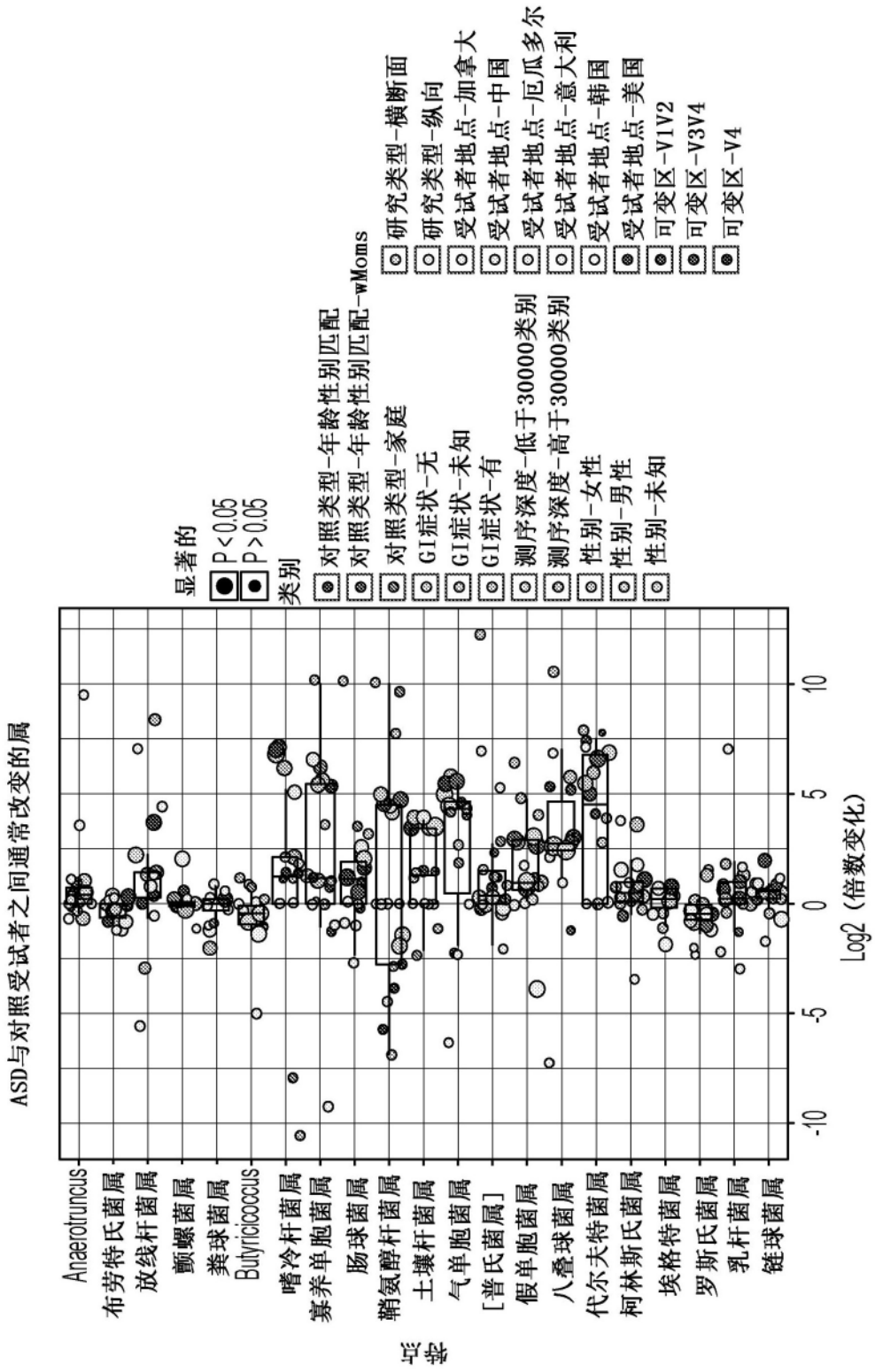

ASD与对照受试者之间通常改变的属
显著的
P < 0.05
P > 0.05
类别
对照类型-年龄性别匹配
对照类型-年龄性别匹配-wMoms
对照类型-家庭
GI症状-无
GI症状-未知
GI症状-有
测序深度-低于30000类别
测序深度-高于30000类别
性别-女性
性别-男性
性别-未知
研究类型-横断面
研究类型-纵向
受试者地点-加拿大
受试者地点-中国
受试者地点-厄瓜多尔
受试者地点-意大利
受试者地点-韩国
受试者地点-美国
可变区-V1V2
可变区-V3V4
可变区-V4
Anaerotruncus
布劳特氏菌属
放线杆菌属
颤螺菌属
粪球菌属
Butyricicoccus
嗜冷杆菌属
寡养单胞菌属
肠球菌属
鞘氨醇杆菌属
土壤杆菌属
气单胞菌属
[普氏菌属]
假单胞菌属
八叠球菌属
代尔夫特菌属
柯林斯氏菌属
埃格特菌属
罗斯氏菌属
乳杆菌属
链球菌属
特点
-10
-5
0
5
10
Log2（倍数变化）

图8A

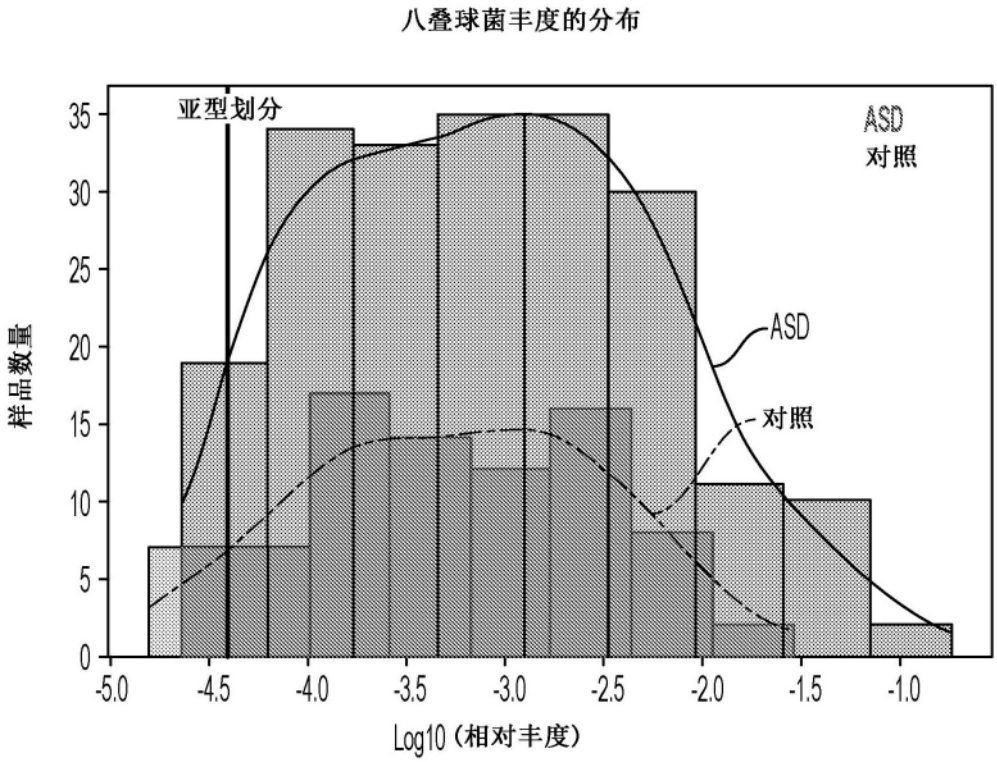

八叠球菌丰度的分布
亚型划分
ASD
对照
ASD
对照
样品数量
35
30
25
20
15
10
5
0
-5.0
-4.5
-4.0
-3.5
-3.0
-2.5
-2.0
-1.5
-1.0
Log10（相对丰度）

图8B

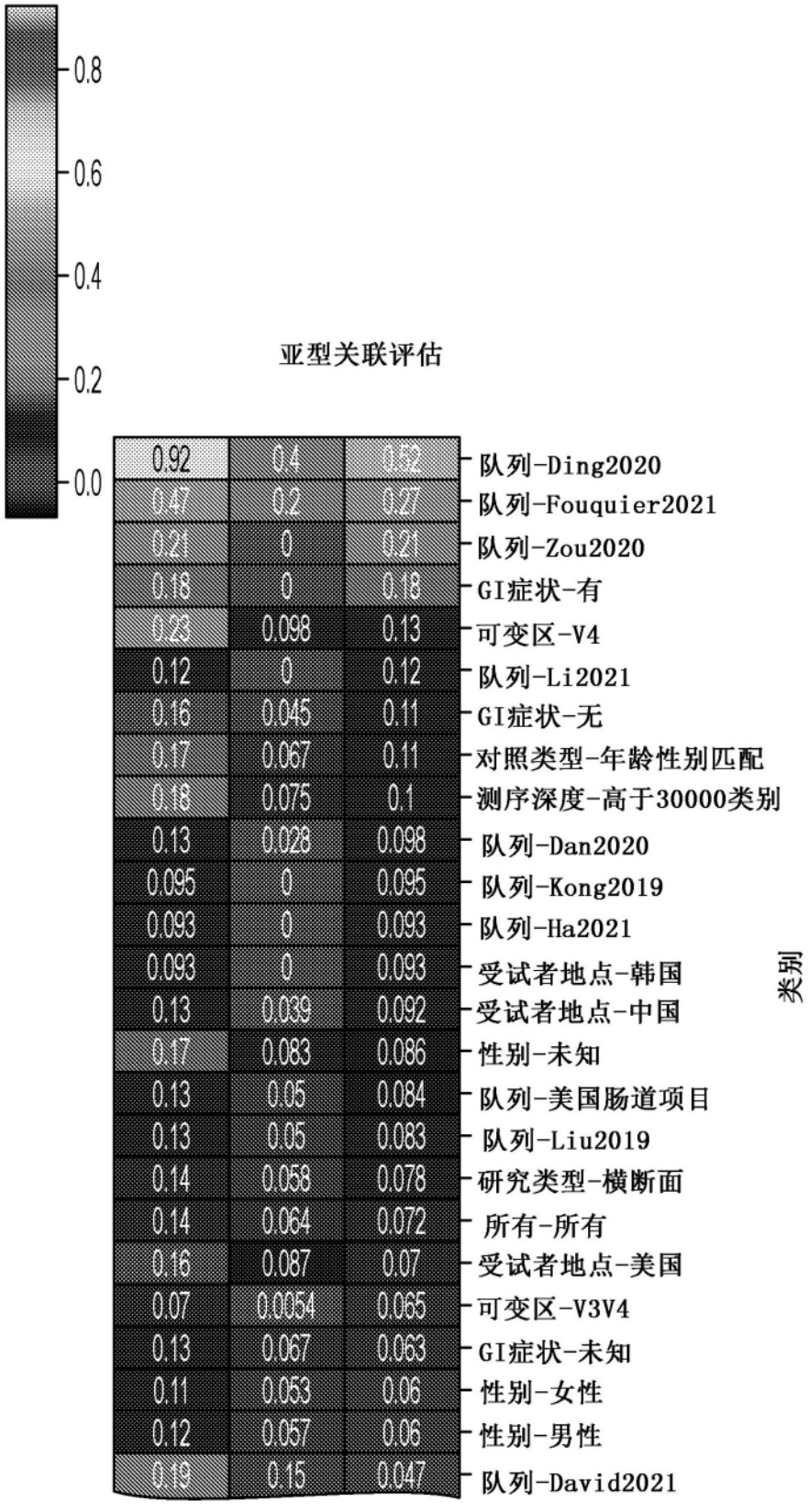

0.8
0.6
0.4
0.2
0.0
亚型关联评估
0.92 0.4 0.52 队列-Ding2020
0.47 0.2 0.27 队列-Fouquier2021
0.21 0 0.21 队列-Zou2020
0.18 0 0.18 GI症状-有
0.23 0.098 0.13 可变区-V4
0.12 0 0.12 队列-Li2021
0.16 0.045 0.11 GI症状-无
0.17 0.067 0.11 对照类型-年龄性别匹配
0.18 0.075 0.1 测序深度-高于30000类别
0.13 0.028 0.098 队列-Dan2020
0.095 0 0.095 队列-Kong2019
0.093 0 0.093 队列-Ha2021
0.093 0 0.093 受试者地点-韩国
0.13 0.039 0.092 受试者地点-中国
0.17 0.083 0.086 性别-未知
0.13 0.05 0.084 队列-美国肠道项目
0.13 0.05 0.083 队列-Liu2019
0.14 0.058 0.078 研究类型-横断面
0.14 0.064 0.072 所有-所有
0.16 0.087 0.07 受试者地点-美国
0.07 0.0054 0.065 可变区-V3V4
0.13 0.067 0.063 GI症状-未知
0.11 0.053 0.06 性别-女性
0.12 0.057 0.06 性别-男性
0.19 0.15 0.047 队列-David2021
类别

图8C

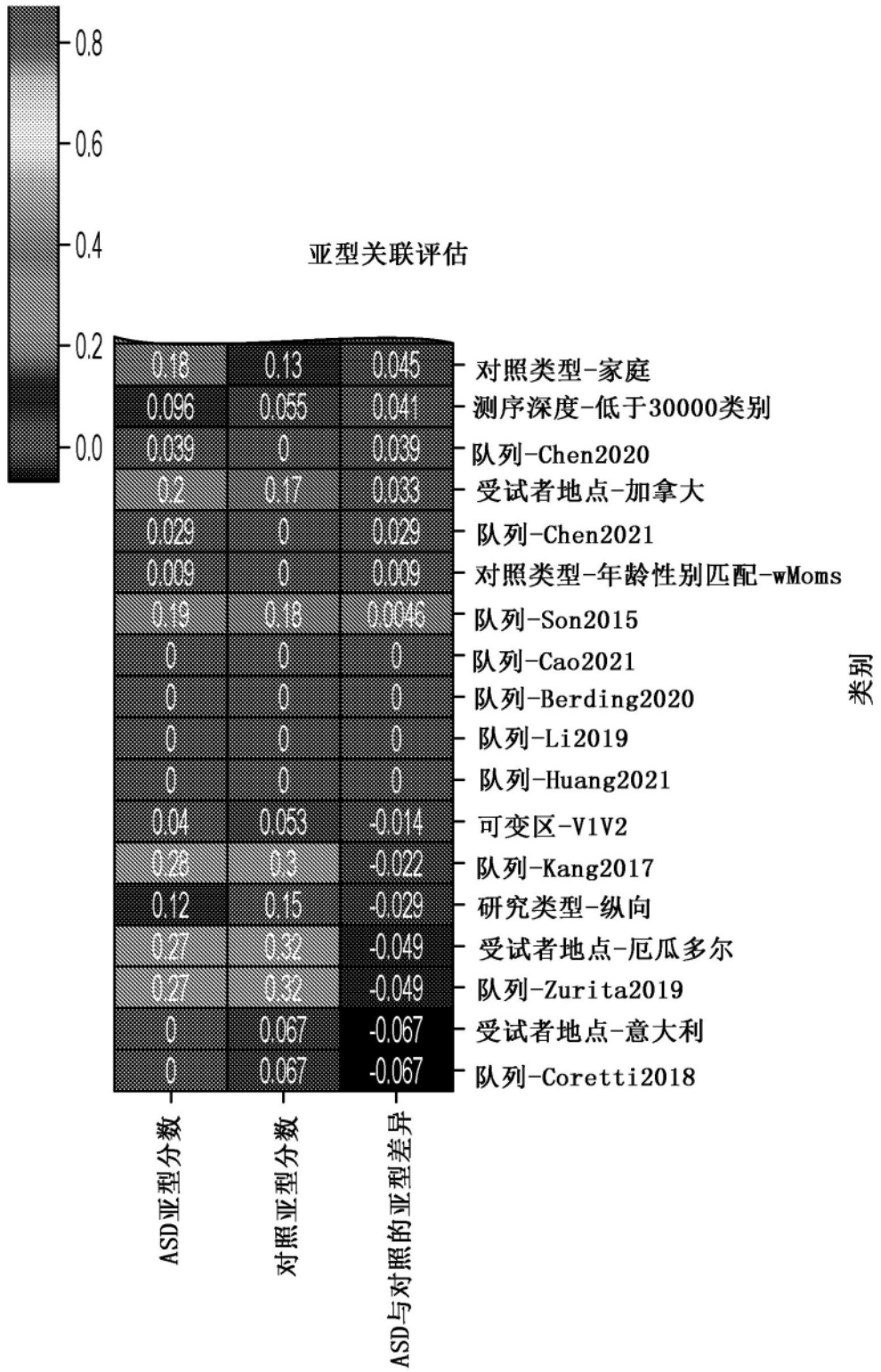

0.8
0.6
0.4
0.2
0.0
亚型关联评估
0.18 0.13 0.045 对照类型-家庭
0.096 0.055 0.041 测序深度-低于30000类别
0.039 0 0.039 队列-Chen2020
0.2 0.17 0.033 受试者地点-加拿大
0.029 0 0.029 队列-Chen2021
0.009 0 0.009 对照类型-年龄性别匹配-wMoms
0.19 0.18 0.0046 队列-Son2015
0 0 0 队列-Cao2021
0 0 0 队列-Berding2020
0 0 0 队列-Li2019
0 0 0 队列-Huang2021
0.04 0.053 -0.014 可变区-V1V2
0.28 0.3 -0.022 队列-Kang2017
0.12 0.15 -0.029 研究类型-纵向
0.27 0.32 -0.049 受试者地点-厄瓜多尔
0.27 0.32 -0.049 队列-Zurita2019
0 0.067 -0.067 受试者地点-意大利
0 0.067 -0.067 队列-Coretti2018
类别
ASD亚型分数
对照亚型分数
ASD与对照的亚型差异

图8C续

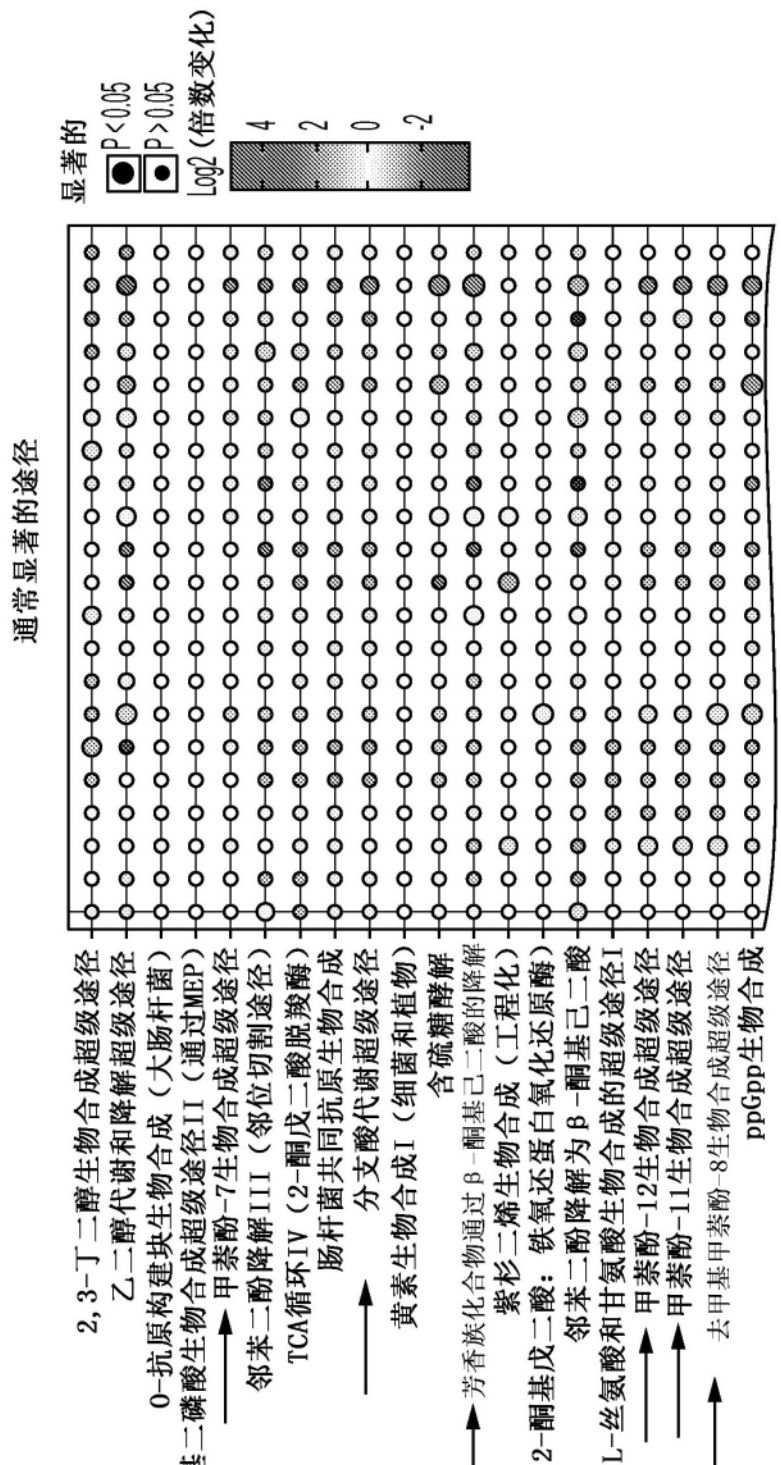

通常显著的途径
2,3-丁二醇生物合成超级途径
乙二醇代谢和降解超级途径
O-抗原构建块生物合成（大肠杆菌）
香叶基香叶基二磷酸生物合成超级途径II（通过MEP）
甲萘酚-7生物合成超级途径
邻苯二酚降解III（邻位切割途径）
TCA循环IV（2-酮戊二酸脱羧酶）
肠杆菌共同抗原生物合成
分支酸代谢超级途径
黄素生物合成I（细菌和植物）
含硫糖酵解
萜烃
芳香族化合物通过β-酮基己二酸的降解
紫杉二烯生物合成（工程化）
TCA循环V（2-酮基戊二酸：铁氧还蛋白氧化还原酶）
邻苯二酚降解为β-酮基己二酸
L-丝氨酸和甘氨酸生物合成的超级途径I
甲萘酚-12生物合成超级途径
甲萘酚-11生物合成超级途径
去甲基甲萘酚-8生物合成超级途径
ppGpp生物合成
显著的
P<0.05
P>0.05
Log2（倍数变化）
4
2
0
-2

图9A

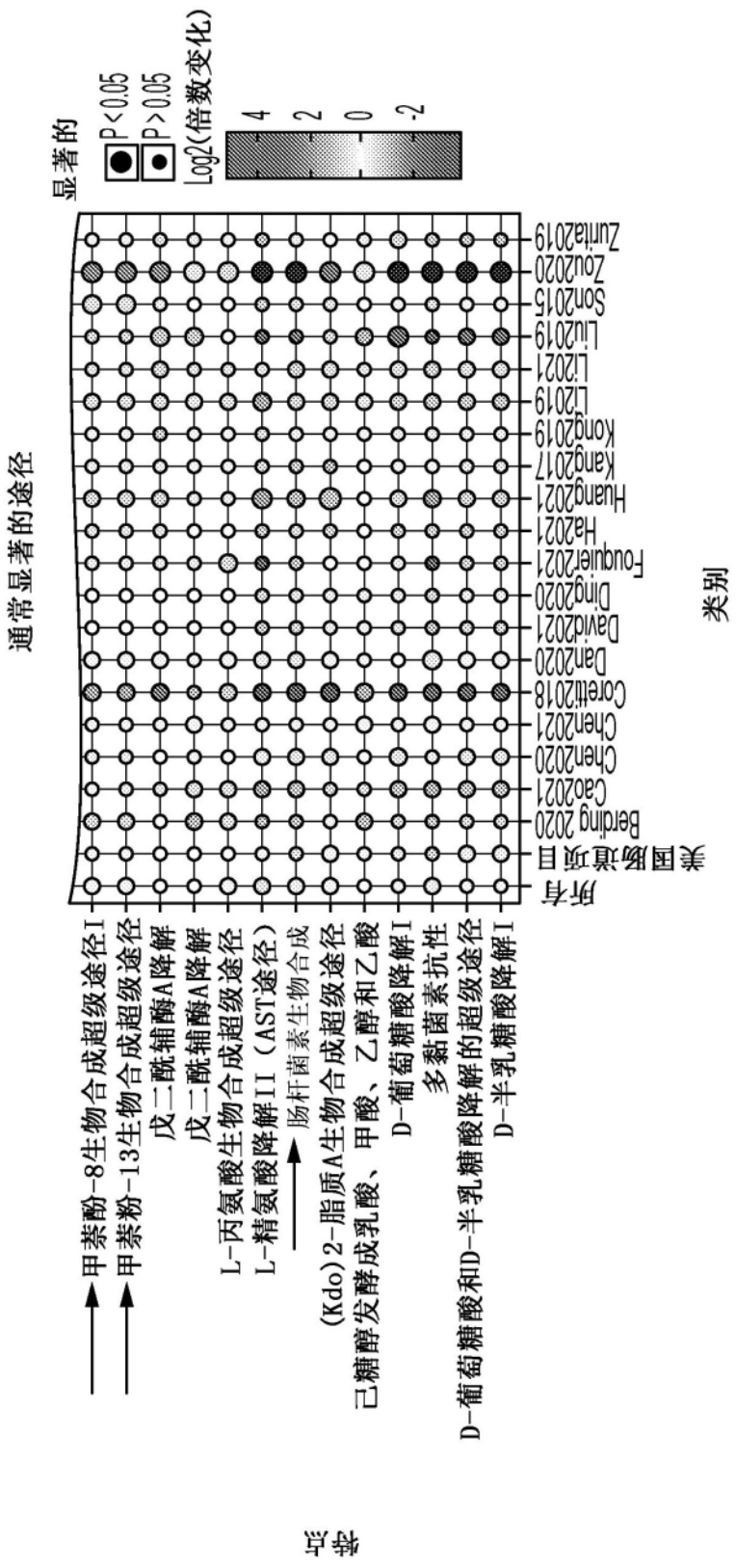

显著的
P < 0.05
P > 0.05
Log2(倍数变化)
4
2
0
-2
通常显著的途径
甲萘酚-8生物合成超级途径I
甲萘粉-13生物合成超级途径
戊二酰辅酶A降解
戊二酰辅酶A降解
L-丙氨酸生物合成超级途径
L-精氨酸降解II（AST途径）
肠杆菌素生物合成
(Kdo)2-脂质A生物合成超级途径
己糖醇发酵成乳酸、甲酸、乙醇和乙酸
D-葡萄糖酸降解I
多黏菌素抗性
D-葡萄糖酸和D-半乳糖酸降解的超级途径
D-半乳糖酸降解I
所有
类固醇项目
Berding 2020
Cao2021
Chen2020
Chen2021
Coretti2018
Dan2020
David2021
Ding2020
Fouquier2021
Ha2021
Huang2021
Kang2017
Kong2019
Li2019
Li2021
Liu2019
Son2015
Zou2020
Zuni a2019
特点
类别

图9A续

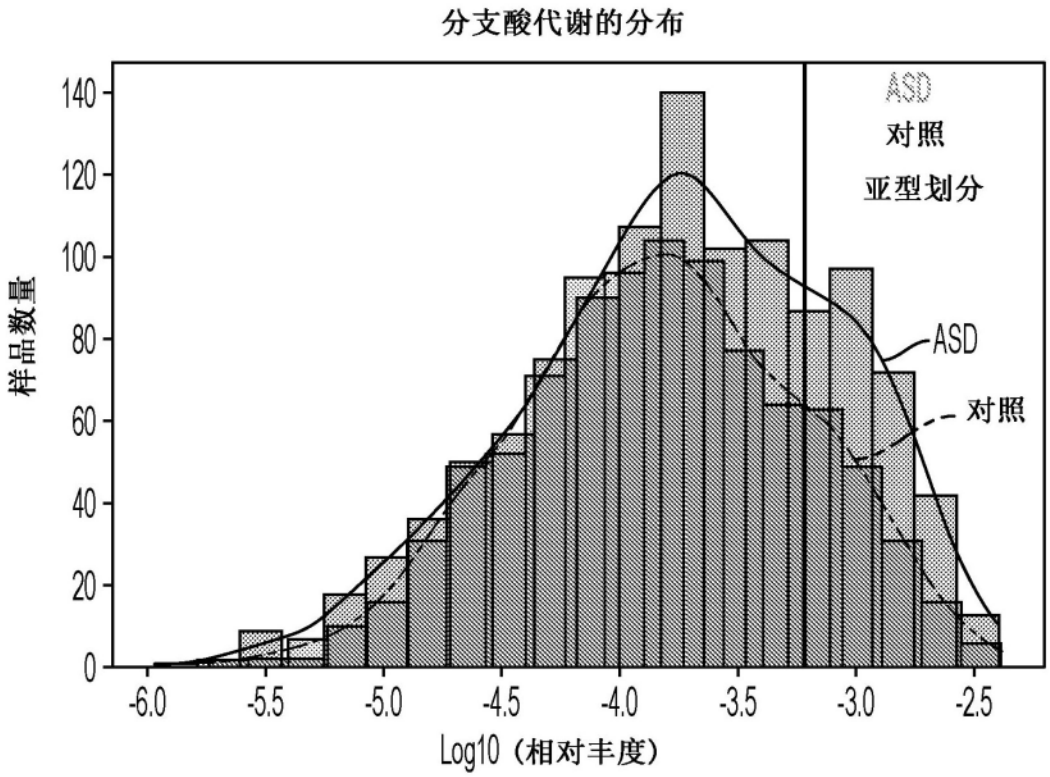

分支酸代谢的分布
ASD
对照
亚型划分
ASD
对照
样品数量
140
120
100
80
60
40
20
0
-6.0
-5.5
-5.0
-4.5
-4.0
-3.5
-3.0
-2.5
Log10（相对丰度）

图9B

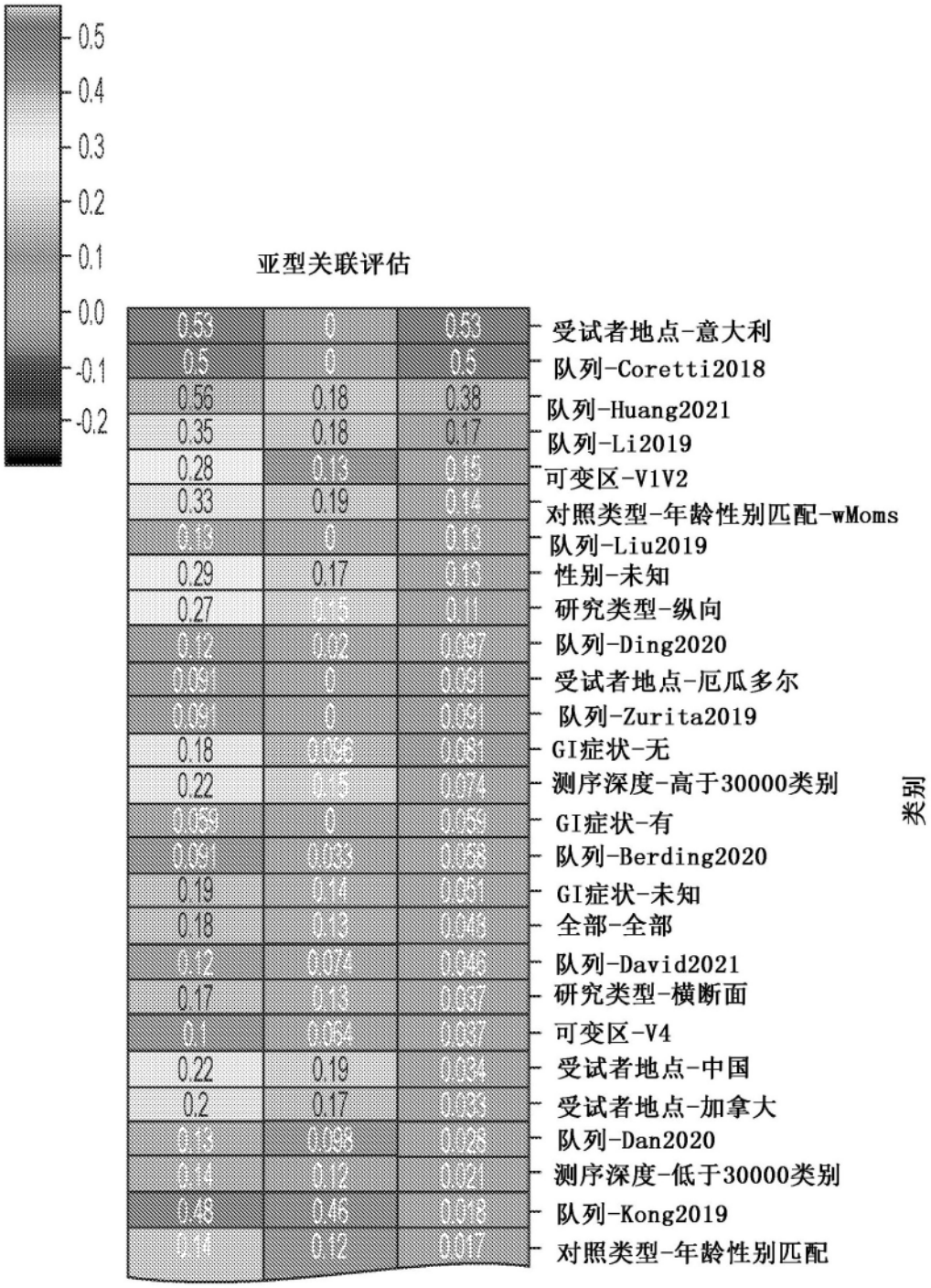

0.5
0.4
0.3
0.2
0.1
0.0
-0.1
-0.2
亚型关联评估
0.53 0 0.53 受试者地点-意大利
0.5 0 0.5 队列-Coretti2018
0.56 0.18 0.38 队列-Huang2021
0.35 0.18 0.17 队列-Li2019
0.28 0.13 0.15 可变区-V1V2
0.33 0.19 0.14 对照类型-年龄性别匹配-wMoms
0.13 0 0.13 队列-Liu2019
0.29 0.17 0.13 性别-未知
0.27 0.16 0.11 研究类型-纵向
0.12 0.02 0.097 队列-Ding2020
0.091 0 0.091 受试者地点-厄瓜多尔
0.091 0 0.091 队列-Zurita2019
0.18 0.096 0.084 GI症状-无
0.22 0.15 0.074 测序深度-高于30000类别
0.059 0 0.059 GI症状-有
0.091 0.033 0.058 队列-Berding2020
0.19 0.14 0.051 GI症状-未知
0.18 0.13 0.049 全部-全部
0.12 0.074 0.046 队列-David2021
0.17 0.13 0.037 研究类型-横断面
0.1 0.064 0.037 可变区-V4
0.22 0.19 0.034 受试者地点-中国
0.2 0.17 0.033 受试者地点-加拿大
0.13 0.098 0.035 队列-Dan2020
0.14 0.12 0.021 测序深度-低于30000类别
0.48 0.46 0.018 队列-Kong2019
0.14 0.12 0.017 对照类型-年龄性别匹配
类别

图9C

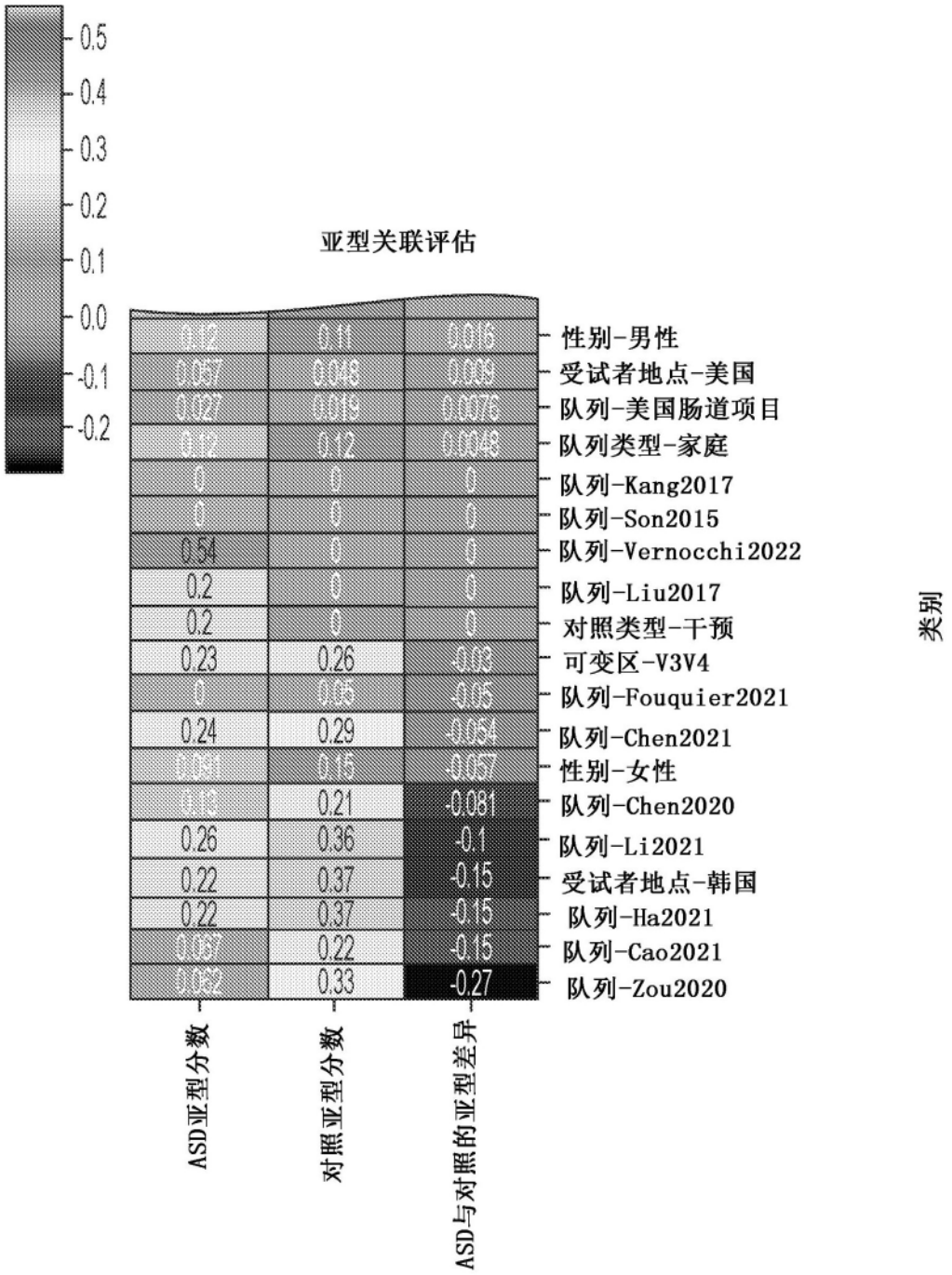

0.5
0.4
0.3
0.2
0.1
0.0
-0.1
-0.2
亚型关联评估
0.12 0.11 0.016 性别-男性
0.057 0.048 0.009 受试者地点-美国
0.027 0.019 0.0076 队列-美国肠道项目
0.12 0.12 0.0048 队列类型-家庭
0 0 0 队列-Kang2017
0 0 0 队列-Son2015
0.54 0 0 队列-Vernocchi2022
0.2 0 0 队列-Liu2017
0.2 0 0 对照类型-干预
0.23 0.26 -0.03 可变区-V3V4
0 0.05 -0.05 队列-Fouquier2021
0.24 0.29 -0.054 队列-Chen2021
0.091 0.15 -0.057 性别-女性
0.13 0.21 -0.081 队列-Chen2020
0.26 0.36 -0.1 队列-Li2021
0.22 0.37 -0.15 受试者地点-韩国
0.22 0.37 -0.15 队列-Ha2021
0.057 0.22 -0.15 队列-Cao2021
0.032 0.33 -0.27 队列-Zou2020
ASD亚型分数
对照亚型分数
ASD与对照的亚型差异
类别

图9C续

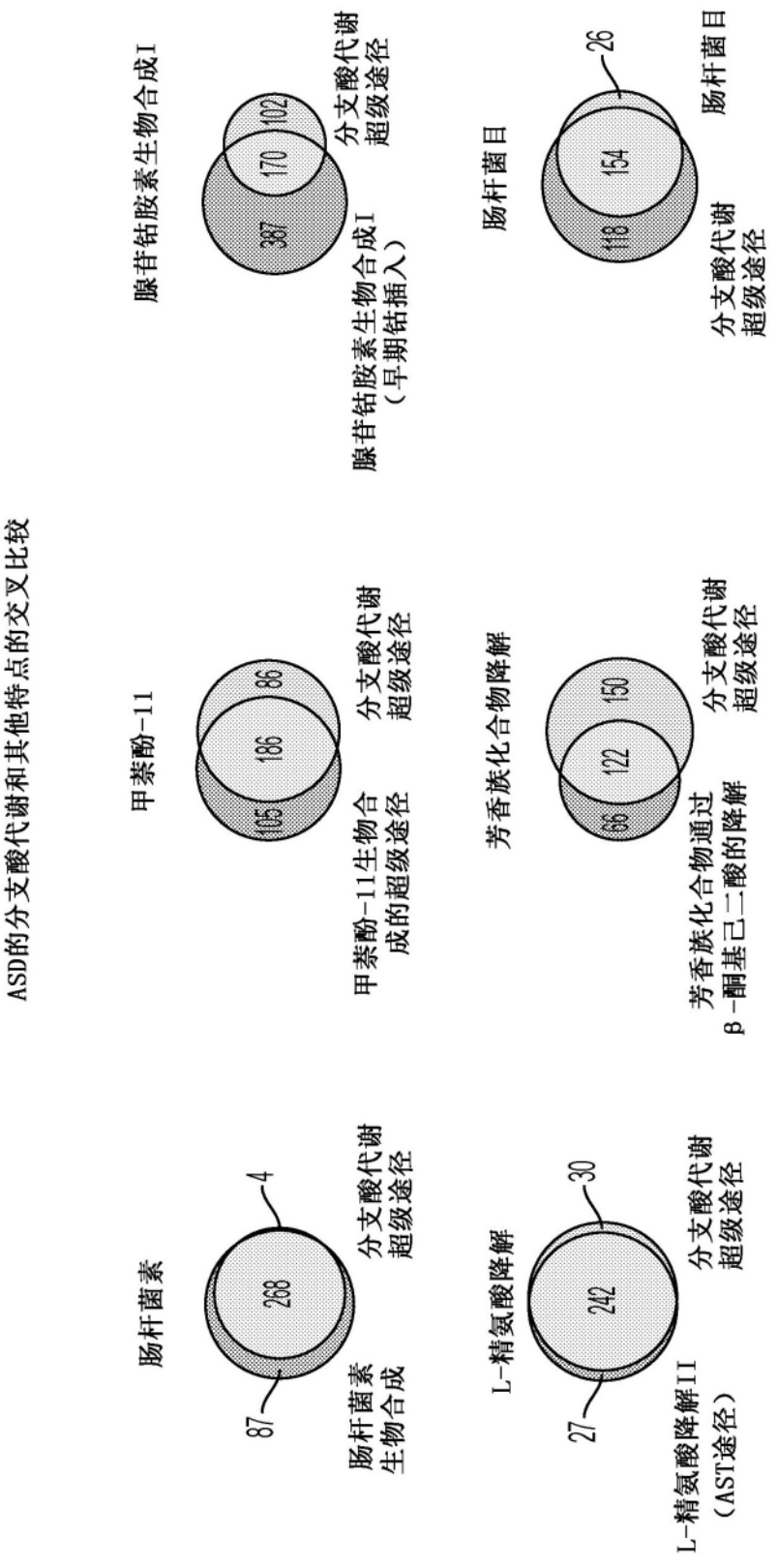

ASD的分支酸代谢和其他特点的交叉比较
肠杆菌素
268
4
87
肠杆菌素
生物合成
分支酸代谢
超级途径
甲萘酚-11
186
86
105
甲萘酚-11生物合
成的超级途径
分支酸代谢
超级途径
腺苷钴胺素生物合成I
170
102
387
腺苷钴胺素生物合成I
（早期钴插入）
分支酸代谢
超级途径
L-精氨酸降解
242
30
27
L-精氨酸降解II
（AST途径）
分支酸代谢
超级途径
芳香族化合物降解
122
150
65
芳香族化合物通过
β-酮基己二酸的降解
分支酸代谢
超级途径
肠杆菌目
154
26
118
分支酸代谢
超级途径
肠杆菌目

图9D

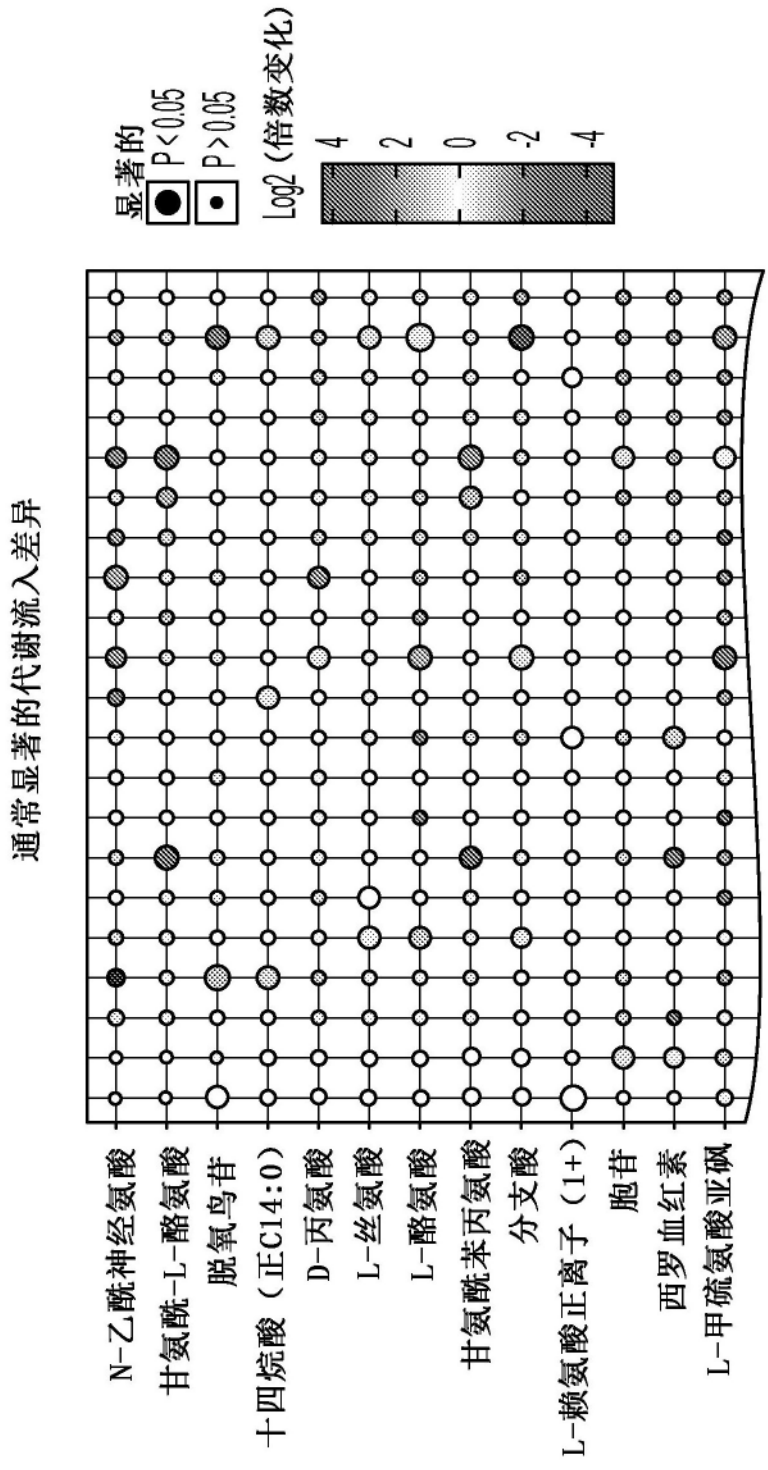

显著的
P<0.05
P>0.05
Log2（倍数变化）
4
2
0
-2
-4
通常显著的代谢流入差异
N-乙酰神经氨酸
甘氨酰-L-酪氨酸
脱氧鸟苷
十四烷酸（正C14:0）
D-丙氨酸
L-丝氨酸
L-酪氨酸
甘氨酰苯丙氨酸
分支酸
L-赖氨酸正离子（1+）
胞苷
西罗血红素
L-甲硫氨酸亚砜

图10A

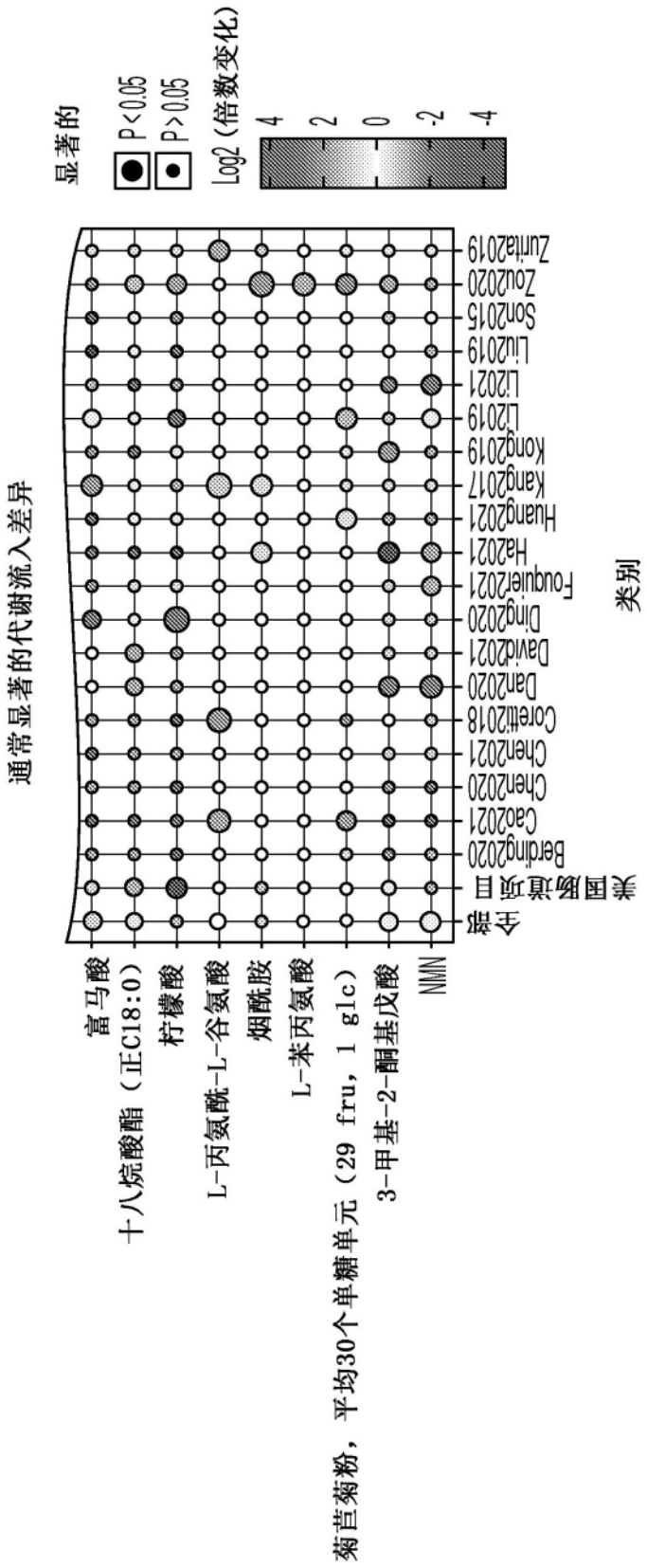

显著的
P<0.05
P>0.05
log2（倍数变化）
4
2
0
-2
-4
通常显著的代谢流入差异
富马酸
十八烷酸酯（正C18:0）
柠檬酸
L-丙氨酰-L-谷氨酸
烟酰胺
L-苯丙氨酸
菊苣菊粉，平均30个单糖单元（29 fru，1 glc）
3-甲基-2-酮基戊酸
NMN
全部
类固醇类道项目
Berdingq2020
Cao2021
Chen2020
Chen2021
Coreil2018
Dan2020
Davi2021
Ding2020
Fouquier2021
Ha2021
Huang2021
Kang2017
Kongq2019
Li2019
Li2021
Liu2019
Son2015
Zou2020
Zuria2019
类别

图10A续

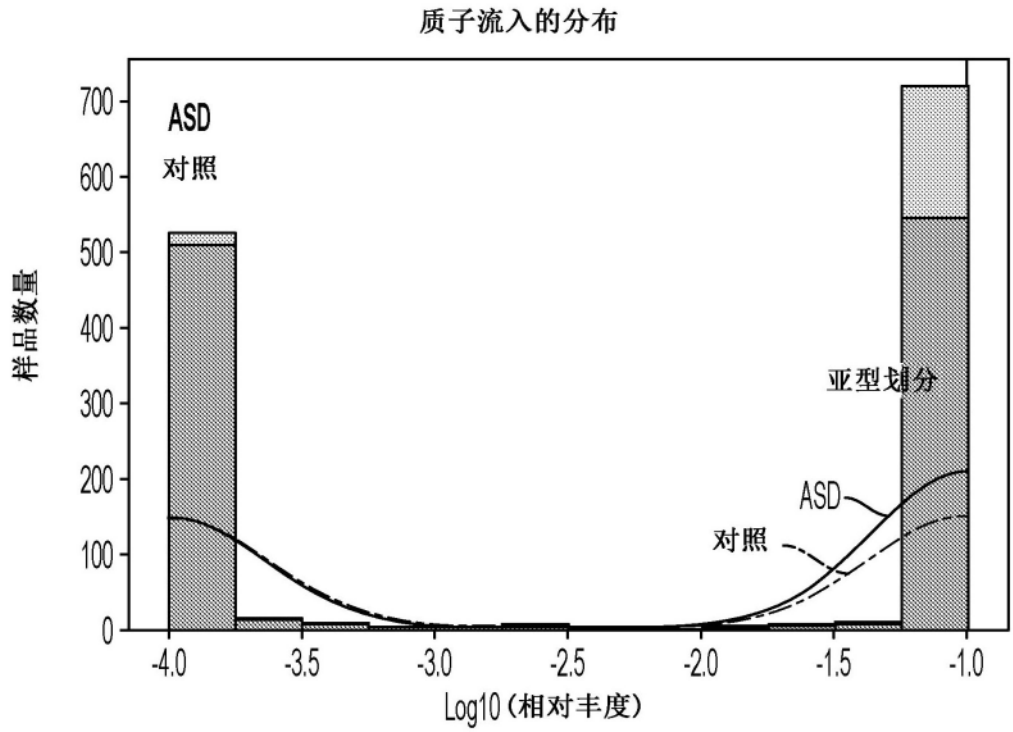

质子流入的分布
ASD
对照
样品数量
700
600
500
400
300
200
100
0
-4.0
-3.5
-3.0
-2.5
-2.0
-1.5
-1.0
Log10(相对丰度)
亚型划分
ASD
对照

图10B


1.0
0.8
0.6
0.4
0.2
0.0
-0.2
-0.4
亚型关联评估
0.8 0.53 0.27 队列-Ha2021
0.8 0.53 0.27 受试者地点-韩国
0.59 0.32 0.27 队列-Li2021
0.95 0.7 0.25 队列-Ding2020
0.36 0.2 0.16 队列-Dan2020
0.28 0.13 0.15 队列-Li2019
0.56 0.43 0.13 队列-Huang2021
0.54 0.42 0.13 性别-未知
0.38 0.25 0.13 GI症状-无
0.33 0.23 0.1 对照类型-年龄性别匹配-wMoms
0.42 0.32 0.095 受试者地点-中国
0.37 0.28 0.092 队列-Chen2020
0.49 0.4 0.09 测序深度-高于30000类别
0.31 0.23 0.084 可变区-V1V2
0.54 0.46 0.081 可变区-V4
0.39 0.31 0.079 队列-David2021
0.86 0.79 0.076 受试者地点-厄瓜多尔
0.86 0.79 0.076 队列-Zurita2019
0.54 0.46 0.076 对照类型-年龄性别匹配
0.41 0.33 0.076 队列-Berding2020
0.49 0.42 0.069 可变区-V3V4
0.4 0.33 0.067 受试者地点-加拿大
1 0.93 0.067 队列-Coretti2018
0.67 0.6 0.067 队列-Liu2019
1 0.93 0.067 受试者地点-意大利
0.48 0.42 0.061 所有-所有
0.47 0.41 0.06 研究类型-横断面
0.49 0.44 0.054 GI症状-未知
类别

图10C

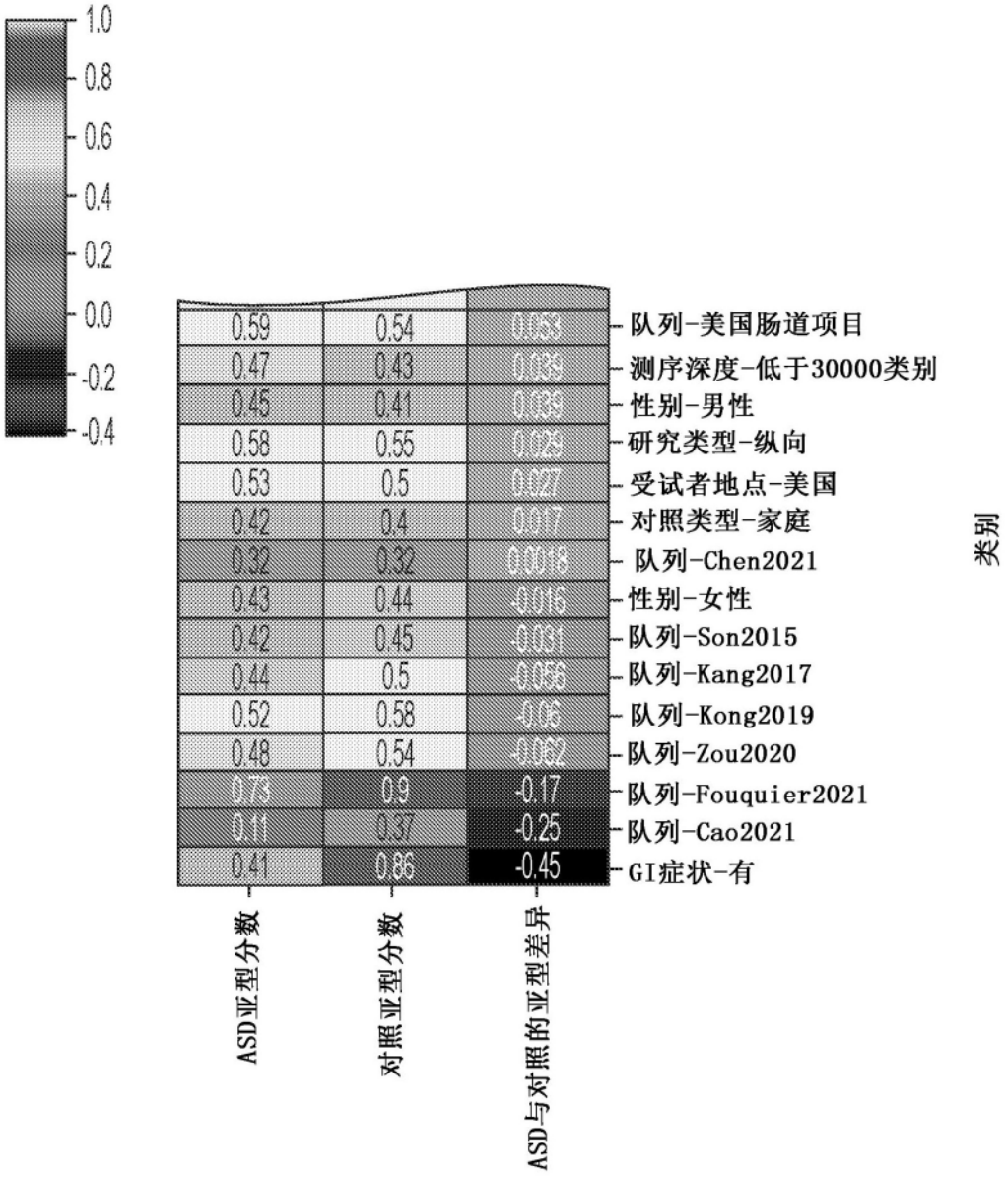

1.0
0.8
0.6
0.4
0.2
0.0
-0.2
-0.4
0.59 0.54 0.053 队列-美国肠道项目
0.47 0.43 0.039 测序深度-低于30000类别
0.45 0.41 0.039 性别-男性
0.58 0.55 0.029 研究类型-纵向
0.53 0.5 0.027 受试者地点-美国
0.42 0.4 0.017 对照类型-家庭
0.32 0.32 0.0018 队列-Chen2021
0.43 0.44 -0.016 性别-女性
0.42 0.45 -0.031 队列-Son2015
0.44 0.5 -0.056 队列-Kang2017
0.52 0.58 -0.06 队列-Kong2019
0.48 0.54 -0.062 队列-Zou2020
0.73 0.9 -0.17 队列-Fouquier2021
0.11 0.37 -0.25 队列-Cao2021
0.41 0.86 -0.45 GI症状-有
类别
ASD亚型分数
对照亚型分数
ASD与对照的亚型差异

图10C续

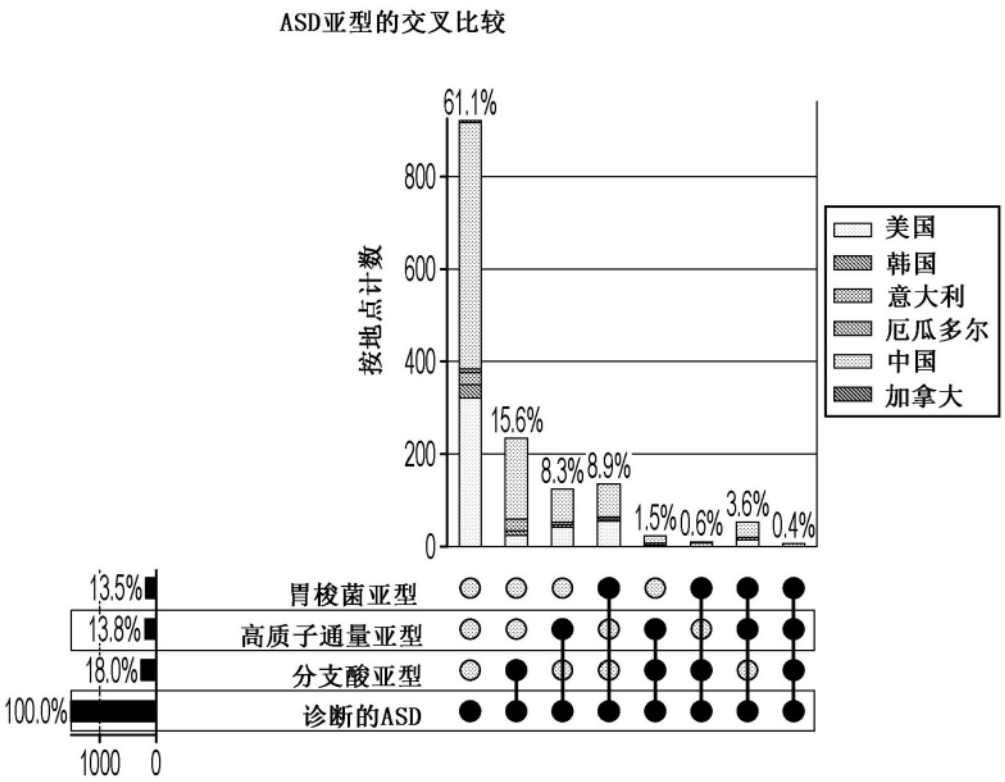

ASD亚型的交叉比较
按地点计数
800
600
400
200
0
61.1%
15.6%
8.3%
8.9%
1.5%
0.6%
3.6%
0.4%
美国
韩国
意大利
厄瓜多尔
中国
加拿大
13.5%
13.8%
18.0%
100.0%
胃梭菌亚型
高质子通量亚型
分支酸亚型
诊断的ASD
1000
0

图11

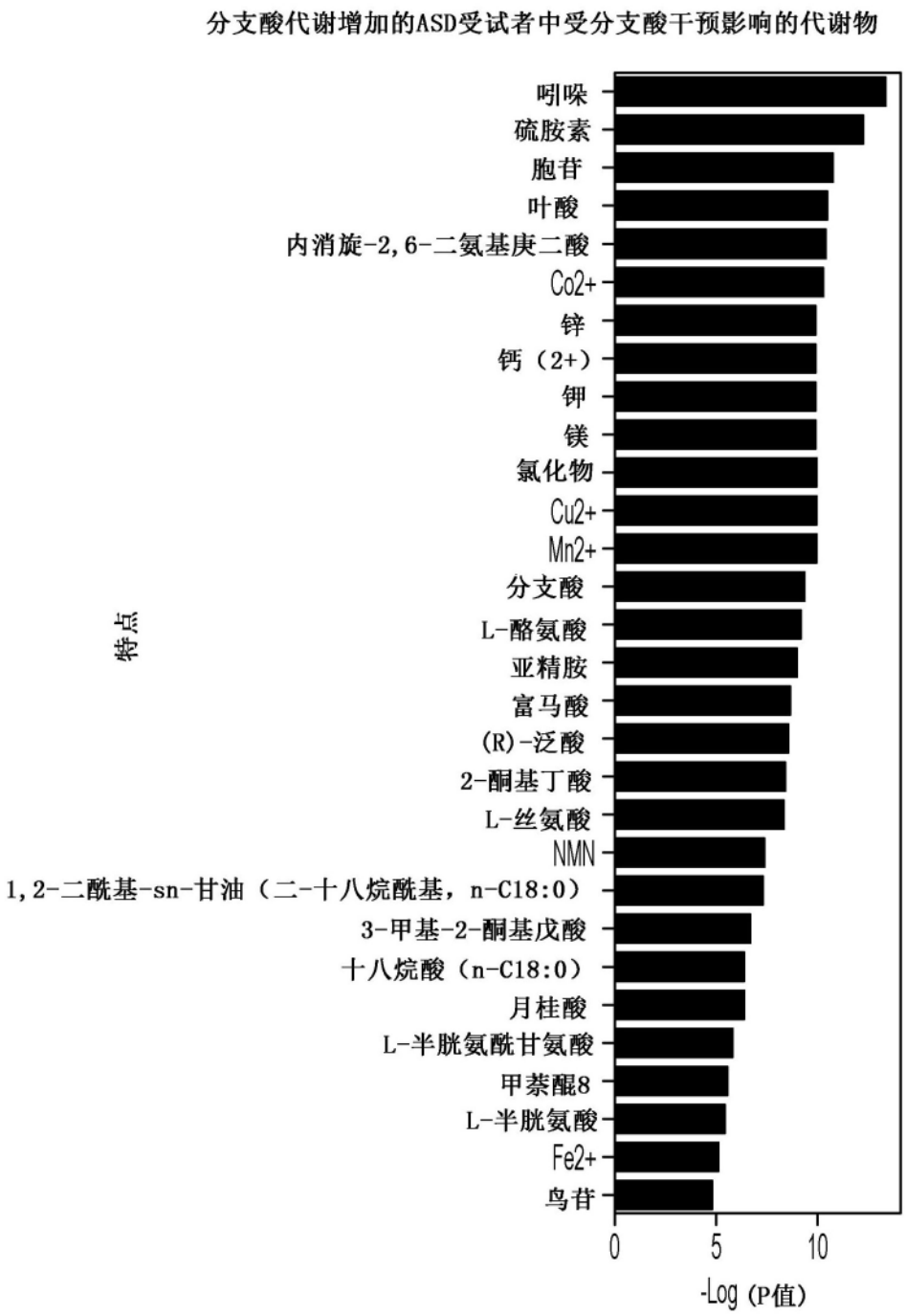

分支酸代谢增加的ASD受试者中受分支酸干预影响的代谢物
吲哚
硫胺素
胞苷
叶酸
内消旋-2,6-二氨基庚二酸
Co2+
锌
钙（2+）
钾
镁
氯化物
Cu2+
Mn2+
分支酸
L-酪氨酸
亚精胺
富马酸
(R)-泛酸
2-酮基丁酸
L-丝氨酸
NMN
1,2-二酰基-sn-甘油（二-十八烷酰基，n-C18:0）
3-甲基-2-酮基戊酸
十八烷酸（n-C18:0）
月桂酸
L-半胱氨酰甘氨酸
甲萘醌8
L-半胱氨酸
Fe2+
鸟苷
特点
0
5
10
-Log (P值)

图12A

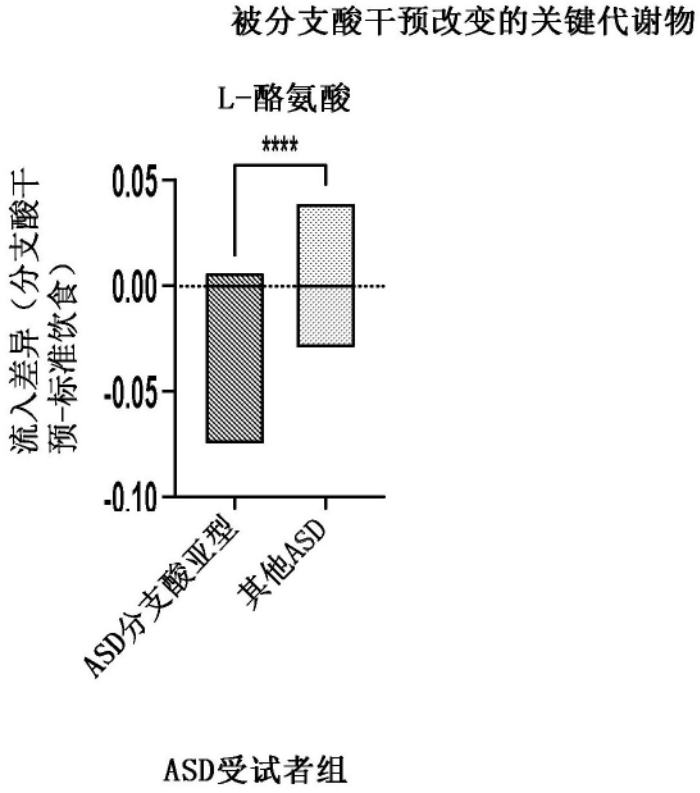

被分支酸干预改变的关键代谢物
L-酪氨酸
****
0.05
0.00
-0.05
-0.10
流入差异（分支酸干预-标准饮食）
ASD分支酸亚型
其他ASD
ASD受试者组

图12B

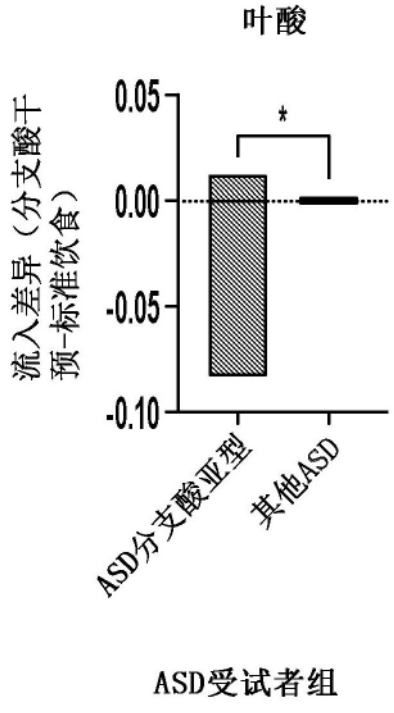

叶酸
*
0.05
0.00
-0.05
-0.10
流入差异（分支酸干预-标准饮食）
ASD分支酸亚型
其他ASD
ASD受试者组

图12C

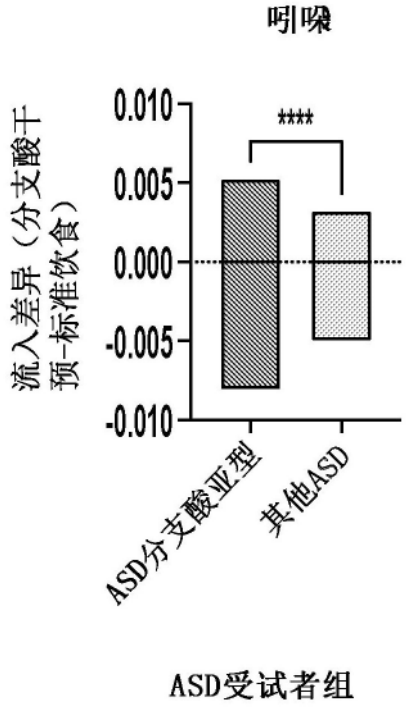

吲哚
流入差异（分支酸干预-标准饮食）
0.010
0.005
0.000
-0.005
-0.010
****
ASD分支酸亚型
其他ASD
ASD受试者组

图12D

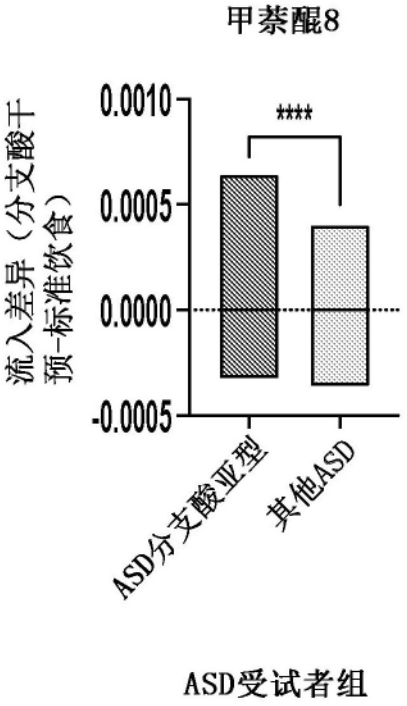

甲萘醌8
流入差异（分支酸干预-标准饮食）
0.0010
0.0005
0.0000
-0.0005
****
ASD分支酸亚型
其他ASD
ASD受试者组

图12E