

通过调节氨基酸水平治疗阿尔茨海默病的方法

技术领域

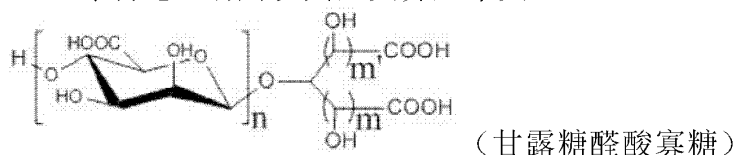
本发明涉及阿尔茨海默病（AD）的治疗。更具体地，本发明涉及利用脑-肠轴关联以抑制阿尔茨海默病进展。

背景技术

阿尔茨海默病（AD）是一种起病隐匿的进行性发展的神经系统退行性疾病。临床上以记忆障碍、失语、失用、失认、视空间技能损害、执行功能障碍以及人格和行为改变等全面性痴呆表现为特征。阿尔茨海默病的两个病理特点是细胞外 β -淀粉样蛋白沉积（老年斑），和细胞内神经原纤维缠结（双螺旋丝）。 β -淀粉样蛋白沉积和神经原纤维缠结导致突触和神经元的损失，这导致在大脑的受损区域的严重萎缩，典型地始于颞叶。由 β -淀粉样蛋白肽和神经原纤维缠结导致这种损害的机制还没有被完全理解。

中国科学院药物创新研究院/上海药物研究所研究员耿美玉带领科研团队研发的甘露糖醛酸寡糖是具有我国自主知识产权的新型口服抗阿尔茨海默病（AD）创新药物。2018 年 7 月 17 日，临床 III 期揭盲试验结果显示，甘露糖醛酸寡糖在认知功能改善的主要疗效指标上达到预期，具有极显著的统计学意义和临床意义，且不良反应事件发生率与安慰剂组相当，安全性好，适合长期服用。甘露糖醛酸寡糖成为 16 年来全球 AD 治疗领域首个在临床 III 期试验中获得成功的药物。

关于甘露糖醛酸寡糖，已经提交了多件相关中国专利。CN2017114675966 描述了甘露糖醛二酸的组合物。CN2016100697039 描述了低聚甘露糖醛二酸的制备方法。CN2018107134113 描述了甘露糖醛二酸的组合物在治疗帕金森氏症中的应用。CN2015104243401 描述了还原端 1 位为羧基的甘露糖醛酸寡糖及其衍生物在治疗帕金森氏症中的应用。这些专利通过引用以其全文并入本文。



本领域需要更多可用于治疗阿尔茨海默病的药物。

发明内容

在本发明中，发明人提供了 AD 进展中肠道微生物区系生态失调与神经炎症之间的因果关系。具体地，肠道微生物区系组成的变化可导致菌群代谢物——如苯丙氨酸和异亮氨酸的外周积聚，其促进 AD 进展中外周促炎型——I 型 T 辅助（Th1）细胞的增殖和分化。外周免疫细胞向大脑浸润并增强神经炎症。重要的是，外周血中如苯丙氨酸和异亮氨酸的升高在两个独立的 AD 导致的轻度认知障碍（MCI）患者队列中得到确认。发明人还显示，在中国的 III 期临床试验中表现出可靠和一致的认知改善的甘露糖醛酸寡糖重塑肠道菌群平衡，降低血液中菌群氨基酸代谢物的积聚，抑制神经炎症。总的来说，发明人的发现突出了肠道生态失调促进的神经炎症在 AD 进展中的作用，并提出了通过干预脑-肠轴进行 AD 治疗的新策略。

在一个方面，本发明提供了用于调节哺乳动物外周血中的氨基酸水平的试剂在制备用于在受试者中治疗阿尔茨海默病的药物中的用途。

在另一个方面，本发明提供了一种用于在受试者中治疗阿尔茨海默病的药物组合物，所述药物组合物包含有效量的用于调节哺乳动物外周血中的氨基酸水平的试剂。

在又一个方面，本发明提供了一种用于筛选可用于治疗阿尔茨海默病的候选药物的方法，其包括：

a) 向具有一定的外周血中氨基酸水平的哺乳动物模型施用测试试剂，和

b) 选择调节所述氨基酸水平的测试试剂作为可用于治疗阿尔茨海默病的候选药物。

在又一个方面，本发明提供了一种治疗阿尔茨海默病患者的方法，其包括：

(a) 检测所述患者的氨基酸水平并与相应正常群体的相应氨基酸水平进行比较以选择其水平与所述相应正常群体的相应氨基酸水平不同的氨基酸；

(b) 向所述患者施用用于调节哺乳动物外周血中的氨基酸水平的试剂以调节所选择的氨基酸的水平以使其接近或达到所述相应正常群体的相应氨基酸水平。

附图说明

图 1. 5XFAD 转基因（Tg）小鼠中疾病进展期间的肠道生态失调和免疫细胞变化。

(a) 在 2、3、5、7 和 9 个月在 5XFAD 转基因 (Tg) 小鼠中, 以及在 2 个月在野生型 (WT) 小鼠中, 海马中突触素的相对 RNA 表达水平的变化 ($n=5-12$) 数据表示为相对于肌动蛋白表达水平的平均值 $\pm$ 平均值标准偏差 ($\text{mean} \pm \text{sem}$)。* $P<0.05$, ** $P<0.01$, 单因素方差分析 ($F(5, 43)=2.952$)。

(b) 在评估 5XFAD 转基因 (Tg) 小鼠在 2、3、5、7 和 9 个月时以及野生型 (WT) 小鼠在 2 个月时的辨别学习能力的测试中, 达到 80% 成功所花费的以 10^4 秒计的时间的变化 (参见方法) ($n=4-8$)。数据表示为平均值 $\pm$ 平均值标准偏差 ($\text{mean} \pm \text{sem}$)。* $P<0.05$, 学生 t 检验。
s, 秒。

(c) WT 和 5XFAD 转基因 (Tg) 小鼠的肠道微生物组组成在不同时间点进行操作分类单位 (OTU) 水平上的主成分分析 (PCA) ($n=4-10$)。点的形状和颜色表示来自不同月份来自每个个体的样品。彩色椭圆表示每个测试组内的 0.95 置信区间 (CI) 范围。M, 月。

(d) 在不同月份的 5XFAD 转基因 (Tg) 小鼠的肠道微生物组中, 存在于总体群体的至少 10% 中的操作分类单位 (OTU) 的相对丰度变化, 在流图上在门水平上着色) ($n=4-10$)。在图上标注两个最丰富的门, 拟杆菌门 (*Bacteroidetes*) 和厚壁菌门 (*Firmicutes*)。颜色表示肠道微生物区系中的不同门。

(e) IBA1 免疫荧光染色的阳性密度的变化, 反映 5XFAD 转基因 (Tg) 小鼠在 2、3、5、7 和 9 个月海马中的小胶质细胞激活相对于 2 月龄野生型 (WT) 小鼠的值) ($n=2-7$)。数据表示为平均值 $\pm$ 平均值标准偏差 ($\text{mean} \pm \text{sem}$); 线用三次样条曲线拟合。Y 轴的 IBA1 数值为每个时间点转基因动物的荧光染色表达量相对于同一时间点野生型动物荧光染色表达量的相对值。

(f) 在 2、3、5、7 和 9 个月在 5XFAD 转基因 (Tg) 小鼠的全脑匀浆中检测到的激活的 M1 和 M2 型小胶质细胞的变化) ($n=4-8$)。通过流式细胞术检测 M1 型小胶质细胞 ($\text{CD45}^{\text{low}}\text{CD11b}^+\text{CX3CR1}^+\text{Siglec-H}^+\text{F4/80}^+\text{CD86}^+$) 和 M2 型小胶质细胞 ($\text{CD45}^{\text{low}}\text{CD11b}^+\text{CX3CR1}^+\text{Siglec-H}^+\text{F4/80}^+\text{CD206}^+$), 并且它们的细胞计数是相对于 $\text{CD45}^{\text{low}}\text{CD11b}^+$ 细胞的频率呈现。红点和线: M1 型小胶质细胞。绿点和线: M2 型小胶质细胞。数据表示为平均值 $\pm$ 平均值标准偏差 ($\text{mean} \pm \text{sem}$); 线用三次样条曲线拟合。

(g) 如通过流式细胞术检测的, 在不同时间点 5XFAD 转基因 (Tg) 小鼠 (红点和线) 和 WT 小鼠 (黑点和线) 的全脑匀浆中检测到的浸润

性细胞 ($CD45^{high}$) 的变化。(Tg 小鼠: 2 月龄, $n=5$; 3 月龄, $n=4$; 5 月龄, $n=4$; 7 月龄, $n=7$; 9 月龄, $n=3$ 。WT 小鼠: $n=6$ 。) 细胞计数是相对于 $CD45^{+}$ 细胞的频率呈现, 并格式化为平均值 $\pm$ 平均值标准偏差 ($mean \pm sem$)。线用三次样条曲线拟合。

5 (h) 在不同时间点 5XFAD 转基因 (Tg) 小鼠中 $CD45^{high}$ 细胞的变化 ($n=4-8$)。在条形图上, 细胞计数是相对于 $CD45^{high}$ 细胞的频率呈现。颜色表示 $CD45^{high}$ 细胞的不同亚型: Neu, 中性粒细胞; DC, 树突状细胞; NK, 自然杀伤细胞; Mo/M ϕ : 单核细胞和巨噬细胞; B, B 细胞; 其他, 未分类的细胞。

10 (i) 如通过流式细胞术检测的, 在 2、3、5、7 和 9 个月在 5XFAD 转基因 (Tg) 小鼠 (红点和线) 的全脑匀浆中检测到的浸润性 $CD4^{+}$ T 细胞 ($CD45^{high}CD4^{+}$) 的变化 ($n=4-8$)。细胞计数是相对于 $CD45^{high}$ 细胞的频率呈现, 并格式化为平均值 $\pm$ 平均值标准偏差 ($mean \pm sem$)。线用三次样条曲线拟合。

15 (j) 在 2、3、5、7 和 9 个月时在 5XFAD 转基因 (Tg) 小鼠的全脑匀浆中检测到的浸润性外周 Th1 和 Th2 细胞的变化 ($n=4-8$)。通过流式细胞术检测 Th1 细胞 ($CD45^{high}CD4^{+}CXCR3^{+}CCR6^{-}$) 和 Th2 细胞 ($CD45^{high}CD4^{+}CXCR3^{-}CCR6^{-}CCR4^{+}$), 并且相对于 $CD45^{high}CD4^{+}$ T 细胞的频率呈现。红点和线: Th1 细胞。绿点和线: Th2 细胞。数据表示为平均值 $\pm$ 平均值标准偏差 ($mean \pm sem$)。线用三次样条曲线拟合。

20 (k) 在早期 (2-3 个月) 或晚期 (7-9 个月) 分别在 Th2/M2 相关阶段和 Th1/M1 相关阶段期间的大脑淋巴细胞与肠道微生物区系 (种水平) 的相关性分析 (左图) ($n=4-8$)。所有与 5XFAD 小鼠的大脑淋巴细胞计数显著相关的细菌列于右侧小图中。带有黄色星号 (*) 的红色 (正相关) 或蓝色 (负相关) 方块表示通过 Pearson 相关系数测量的 P 值 <0.05 的显著相关性。

图 2. 肠道微生物区系是免疫细胞浸润和小胶质细胞激活所需要的。

30 (a) 经口强饲抗生素 3 个月对 7 月龄的 5XFAD 转基因 (Tg) 小鼠中的肠道微生物的相对丰度的影响 ($n=6-7$)。ABX, 由氨苄青霉素 (0.1 mg/mL)、链霉素 (0.5 mg/mL) 和粘菌素 (0.1 mg/mL) 组成的混合抗生素混合物。不同属的肠道微生物用不同的颜色表示, 它们相对丰度的变化在条形图上呈现。

35 (b-c) 口服强饲抗生素 3 个月对 7 月龄的 5XFAD 转基因 (Tg) 小鼠的大脑匀浆中 Th1 细胞 (b) 和 M1 型小胶质细胞 (c) 的频率的影响。

Th1 细胞 ($CD45^{\text{high}}CD4^+CXCR3^+CCR6^-$) 的细胞计数是相对于 $CD45^{\text{high}}CD4^+$ T 细胞的频率呈现 (b), 而 M1 型小胶质细胞 ($CD45^{\text{low}}CD11b^+CX3CR1^+Siglec-H^+F4/80^+CD86^+$) 的细胞计数是相对于 $CD45^{\text{low}}CD11b^+$ 细胞的频率呈现 (c)。两者均通过流式细胞术检测。数据表示为平均值 $\pm$ 平均值标准偏差 (mean $\pm$ sem)。

(d) 共同居住的 WT, WT 和 5XFAD 转基因 (Tg) 小鼠 (n=6-7) 中肠道微生物在属水平上的相对丰度。所有三组小鼠都是 7 月龄。不同的颜色代表不同的属。共同居住的 WT: 与 Tg 小鼠一同居住的 WT 小鼠。

(e-f) 7 月龄的共同居住的 WT, WT 和 5XFAD 转基因 (Tg) 小鼠 (n=6-7) 在 7 个月时大脑匀浆中 Th1 细胞 (e) 和 M1 型小胶质细胞 (f) 的频率变化。Th1 细胞 ($CD45^{\text{high}}CD4^+CXCR3^+CCR6^-$) 是相对于 $CD45^{\text{high}}CD4^+$ T 细胞的频率呈现 (e), 而 M1 型小胶质细胞 ($CD45^{\text{low}}CD11b^+CX3CR1^+Siglec-H^+F4/80^+CD86^+$) 的频率是相对于 $CD45^{\text{low}}CD11b^+$ 细胞的频率呈现 (f)。两者均通过流式细胞术检测。数据表示为平均值 $\pm$ 平均值标准偏差 (mean $\pm$ sem)。** $P<0.01$, * $P<0.05$ 学生 t 检验。

(g) 7 月龄的 WT, 共同居住的 WT 和 5XFAD 转基因 (Tg) 小鼠 (n=6-7) 的大脑匀浆中细胞因子蛋白的水平, 如通过细胞因子抗体阵列检测的。所有三组小鼠都是 7 月龄。热图中的颜色表示通过 Row Z-Score 标准化的相对细胞因子水平; 红色表示上调的细胞因子, 蓝色表示下调的细胞因子。

图 3. OM1 对 APP/PS1 小鼠模型的行为变化的影响

(a) OM1 的结构。OM1 是酸性线性寡糖的混合物, 其聚合度范围为二聚体至十聚体, 平均分子量为约 1 kDa。

(b) Morris Water Maze (MWM) 测试的逃避潜伏时间结果作为 APP/PS1 小鼠的空间学习和记忆的度量。将 9 月龄的 APP/PS1 小鼠用 50 mpk 和 100 mpk 的 OM1 处理 3 个月直至 12 月龄。然后, 空间学习和记忆能力的 MWM 测试另外进行 6 天, 在该测试期间, 连续施用 OM1。将逃避潜伏时间开始 (秒) 测量为测试的最终读出之一 (参见方法)。更高的逃避潜伏时间显示这些小鼠将花费更多时间来达到目标, 这指示更严重受损的空间学习和记忆能力。(n=11-14)。数据表示为平均值 $\pm$ 平均值标准偏差 (mean $\pm$ sem)。黑色星号表示 WT 与 APP/PS1 组之间的比较。蓝色星号表示 OM1 (100 mpk) 处理与 APP/PS1 组之间的比较。
* $P<0.05$, *** $P<0.001$, 双因素方差分析。

(c) MWM 测试的平台区域穿梭 (platform-site crossover) 结果的次数作为 APP/PS1 小鼠的空间学习和记忆的量度。将 9 月龄的 APP/PS1 小鼠用 50 mpk 和 100 mpk 的 OM1 处理 3 个月直至 12 月龄。然后，空间学习和记忆能力的 MWM 测试进行另外 6 天，在该测试期间，连续施用 OM1。平台区域穿梭的次数测量为测试的其他读出 (参见方法)。更多次数的平台区域穿梭指示较不严重受损的空间学习和记忆能力。

(n=11-17)。* $P<0.05$ ，*** $P<0.001$ ，单因素方差分析 ($F(3, 55)=6.542$)。

(d) APP/PS1 小鼠中使用 Y 迷宫测试的空间工作记忆的准确度。将 9 月龄的 APP/PS1 小鼠用 50 mpk 和 100 mpk 的 OM1 处理 3 个月直至 12 月龄。然后进行 Y 迷宫测试，在该测试期间，连续施用 OM1。Y 迷宫的准确度是正确进臂次数和总进臂次数之间的比率 (参见方法)。更高的准确度指示较少严重受损的工作记忆能力。(n=17-20)。数据表示为平均值 $\pm$ 平均值标准偏差 (mean $\pm$ sem)。* $P<0.05$ ，** $P<0.01$ ，*** $P<0.001$ ，单因素方差分析 ($F(3, 71)=12.39$)。

15

图 4. OM1 通过修复肠道微生物区系来减轻神经炎症。

(a) 基于 7 月龄的 5XFAD (Tg) 小鼠和经 OM1 处理的 Tg 小鼠的 Bray-Curtis 距离，肠道微生物组组成在操作分类单位 (OTU) 水平上的主坐标分析 (PCoA) (n=7)。点的形状和颜色表示来自每个个体的样品。彩色椭圆表示每个测试组内的 0.95 置信区间 (CI) 范围。PC，主成分。

(b) 7 月龄的 5XFAD (Tg) 小鼠和经 OM1 处理的 Tg 小鼠 (n=17) 在种水平上的肠道微生物区系变化的热图。热图上的颜色表示通过 Row Z-Score 标准化的肠道微生物区系的相对丰度；红色表示上调的细菌，蓝色表示下调的细菌。

(c) 在 7 月龄的 5XFAD (Tg) 小鼠口服强饲 OM1 之前 (左) 和之后 (右)，肠道微生物组 (以蓝色圆圈旁边的数字指定) 与大脑淋巴细胞 (彩色圆圈) 之间的相关性联系的变化。右侧列出了每个肠道微生物组的名称。

(d) OM1 处理对 7 月龄的 5XFAD (Tg) 小鼠的大脑 Th1 细胞的频率的影响 (n=5-7)。通过流式细胞术检测，Th1 细胞计数 ($CD45^{\text{high}}CD4^+CXCR3^+CCR6^-$) 是相对于 $CD45^{\text{high}}CD4^+$ T 细胞计数呈现。数据表示为平均值 $\pm$ 平均值标准偏差 (mean $\pm$ sem)。* $P<0.05$ ，*** $P<0.001$ ，学生 t 检验。

(e) OM1 处理对 7 月龄的 5XFAD (Tg) 小鼠的海马切片中检测到

的 IBA1 免疫荧光染色的阳性信号密度的影响，反映了小胶质细胞的激活 (n=4-6)。数据表示为平均值 $\pm$ 平均值标准偏差 (mean $\pm$ sem)。

* $P < 0.05$ ，单因素方差分析 (F (2, 15) = 21.94)。

(f) 如通过细胞因子抗体阵列检测的，OM1 处理对 7 月龄的 5XFAD (Tg) 小鼠的大脑匀浆中细胞因子蛋白的水平的影响 (n=5-6)。热图上的颜色表示通过 Row Z-Score 标准化的相对细胞因子水平；红色表示上调的细胞因子，蓝色表示下调的细胞因子。

(g-h) OM1 对 7 月龄的 5XFAD (Tg) 小鼠的海马中 A β 阳性区域 (g) 和 tau 阳性区域 (h) 的影响，在大脑切片中评估 (n=4-7)。数据表示为平均值 $\pm$ 平均值标准偏差 (mean $\pm$ sem)。A β 分析：** $P < 0.01$ ，* $P < 0.05$ (F (2, 14) = 22.78)。tau 分析：* $P < 0.05$ ，*** $P < 0.001$ (F (2, 15) = 13.06)，单因素方差分析。

(i) 在评估 7 月龄的 5XFAD (Tg) 小鼠的辨别学习能力的测试中，OM1 对于获得 80% 成功所花费的以 10^4 秒计的时间 (参见方法) 的影响 (n=10-13)。花费的时间是指达到 80% 表现水平的时间 (秒)；花费的时间越长，认知障碍越严重 (参见方法)。*** $P < 0.001$ ，* $P < 0.05$ ，(F(2,31) = 9.751)，单因素方差分析。

图 5. OM1 通过约束氨基酸代谢来抑制神经炎症。

(a) 使用 MBROLE，经 OM1 处理或未处理的 7 月龄的 5XFAD (Tg) 小鼠的 31 种粪便代谢物的途径富集分析 (n=6-8)。富集结果列表以 KEGG 模块和 KEGG 酶相互作用呈现，并使用 $P < 0.05$ 的标准筛选。

(b) 使用随机森林分类 (树木数量：500；预测因子数量：7；随机性：开启；参见方法)，在疾病进展期间可以区分 WT (n=30) 和 Tg (n=26) 小鼠的血液氨基酸列表。

(c) WT, Tg 和经 OM1 处理的 Tg 小鼠 (n=6-11) 的粪便中组氨酸、苯丙氨酸和异亮氨酸水平的变化。红色，上调；蓝色，下调。

(d) WT, Tg 和经 OM1 处理的 Tg 小鼠 (n=6-7) 的血液中组氨酸、苯丙氨酸和异亮氨酸水平的变化。红色，上调；蓝色，下调。

(e) OM1 对苯丙氨酸和异亮氨酸诱导的初始 CD4⁺ T 细胞 (Th0 细胞) 向 Th1 细胞分化的影响。在苯丙氨酸 (1 mM) 和异亮氨酸 (1 mM) 存在下，将初始 CD4⁺ T 细胞在有/无 OM1 的情况下培养 3 天。通过流式细胞术测试 Th1 (CD4⁺IFN- γ ⁺) 细胞的频率。数据表示为平均值 $\pm$ 平均值标准偏差 (mean $\pm$ sem)；每组 n=3 个重复。左，** $P < 0.01$ ，* $P < 0.05$ ，单因素方差分析 (F (2, 6) = 15.64)。右，** $P < 0.01$ ，* $P < 0.05$ ，单因素

方差分析 ($F(2, 6) = 10.35$)。

(f) OM1 对苯丙氨酸和异亮氨酸诱导的 Th1 细胞增殖的影响。将初始 $CD4^+$ T 细胞用 CellTrace 染色, 并在苯丙氨酸 (1 mM) 和异亮氨酸 (1 mM) 存在下, 在有/无 OM1 的情况下培养 3 天。通过流式细胞术测试 Th1 ($CD4^+IFN-\gamma^+$) 细胞中 CellTrace 荧光的密度。数据表示为平均值 $\pm$ 平均值标准偏差 (mean $\pm$ sem), $n=3$ 。* $P<0.05$, *** $P<0.0001$, 单因素方差分析 ($F(4, 9) = 28.34$)。

(g) 腹膜内 (i.p.) 注射苯丙氨酸和异亮氨酸 ($n=6$) 4 天后的血液 Th1 细胞变化。*** $P<0.0001$, 单因素方差分析 ($F(2, 21) = 101.8$)。

(h) 健康对照 (HC) 和 AD 导致的轻度认知障碍患者 (MCI) 的氨基酸变化的随机森林分类 (第一队列, AD 导致的 MCI, $n=9$; HC, $n=18$)。

(i) 健康对照 (HC) 和 AD 导致的轻度认知障碍患者 (MCI) 的血液中 Th1 细胞的频率 (第一队列, AD 导致的 MCI, $n=8$; HC, $n=9$)。* $P<0.05$, 学生 t 检验。纵坐标是 Th1 细胞/ $CD4^+$ T 细胞的百分比。

(j) 健康对照 (HC) 和 AD 导致的轻度认知障碍患者 (MCI) 的血液中的苯丙氨酸和异亮氨酸水平 (第二队列, 两组均为 $n=22$)。* $P<0.05$ (苯丙氨酸), * $P<0.05$ (异亮氨酸), 学生 t 检验。

图 6. AD 进展中神经炎症的示意图和干预策略。

在 AD 进展期间肠道微生物区系的变化导致紊乱的氨基酸代谢, 其促进在血液中初始 $CD4^+$ T 细胞分化成 Th1 细胞。同时, 氨基酸和 Th1 细胞可以通过血液循环浸润到大脑中。外周免疫细胞浸润和小胶质细胞激活导致大脑中的病理性神经炎症, 导致认知障碍。口服施用 OM1 可以修复肠道微生物区系, 抑制氨基酸异常产生, 并减少外周免疫细胞向大脑浸润, 最终解决神经炎症。

图 7

(a-b) 5XFAD 转基因 (Tg) 小鼠 (2、3、5、7 和 9 月龄) 的海马切片中 $A\beta$ 阳性区域 (a) 和磷酸化-tau (p-TAU) 阳性区域 (b) 相对于 2 月龄的野生型 (WT) 小鼠的变化 ($n=2-7$)。呈现了代表性荧光图像; 比例尺代表 100 μm 。折线图总结了来自所有个体点的相对于 WT 小鼠的结果, 并且表示为平均值 $\pm$ 平均值标准偏差 (mean $\pm$ sem)。线用三次样条曲线拟合。M, 月。

(c) 来自 WT 和 5XFAD 转基因 (Tg) 小鼠 (2、3、5、7 和 9 月龄)

的肠道微生物组组成在操作分类单位(OTU)水平上的主成分分析(PCA)的主成分(PC) 1 (n=4-10)。红点和线, Tg 小鼠; 蓝点和线, WT 小鼠。自然连接成线而不拟合。使用双尾 Wilcoxon 秩和 (ranked-sum) 检验; *表示与同组中的 2 月龄相比的显著性差异。* $P<0.05$, ** $P<0.01$ 。

5 #表示与年龄匹配的 WT 小鼠相比的显著性差异。# $P<0.05$; ## $P<0.01$; ### $P<0.001$ 。

(d) 5XFAD 转基因 (Tg) 小鼠 (2、3、5、7 和 9 月龄) 的肠道微生物在科水平上的相对丰度的变化 (n=4-10)。不同的颜色代表不同的科。

10 (e) 5XFAD 转基因 (Tg) 小鼠 (2、3、5、7 和 9 月龄) 的肠道微生物组组成的线性判别分析效应量 (LEfSe) 分析的分枝图 (n=4-10)。在每个月具有最高判别力的细菌在图上标注。颜色表示每个月富集的细菌类群。外圆到内圆表示不同分类级别 (由外向内: 门, 纲, 目, 科, 属)。M, 月。疣微菌门 (Verrucomicrobia); α -变形杆菌纲 (alphaproteobacteria); 拟杆菌门 (Bacteroidetes); 普雷沃氏菌科 (Prevotellaceae); Erysipelotrichia; 厚壁菌门 (Firmicutes); Lachnospirillum。

20 (f) 3、6、8、9、12 和 14 月龄的 APP/PS1 转基因小鼠的肠道微生物组在 OTU 水平上的 PCA 分析 (n=4-12)。颜色和形状表示来自不同月份的数据。彩色椭圆表示每个测试组内的 0.95 置信区间 (CI) 范围。PC, 主成分。

(g) 3、6、8、9、12 和 14 月龄的 APP/PS1 转基因小鼠的肠道微生物在门水平上的相对丰度的变化 (n=4-12)。颜色表示不同的门或属。M, 月。

25 (h) 5XFAD 转基因 (Tg) 小鼠 (2、3、5、7 和 9 月龄) 相对于 2 月龄野生型 (WT) 小鼠 (n=2-7) 的海马切片中 IBA1 阳性的变化的代表荧光图。比例尺在小框 (上) 中代表 500 μm , 在大框 (下) 中代表 250 μm 。M, 月。

30 (i) 如通过流式细胞术检测的, 在 3、6、9 和 14 月龄的 APP/PS1 小鼠的全脑匀浆中检测到的浸润性细胞 ($\text{CD45}^{\text{high}}$) 的频率的变化 (n=5-8)。细胞计数是相对于 CD45^+ 细胞的频率呈现, 并格式化为平均值 $\pm$ 平均值标准偏差 (mean $\pm$ sem)。线用三次样条曲线算法拟合。

(j) 如通过流式细胞术检测的, 在 3、6、9 和 14 月龄的 APP/PS1 小鼠的全脑匀浆中浸润性外周 Th1 细胞的频率的变化 (n=3-8)。Th1 细胞 ($\text{CD45}^{\text{high}}\text{CD4}^+\text{CXCR3}^+\text{CCR6}^-$) 是相对于 $\text{CD45}^{\text{high}}\text{CD4}^+$ T 细胞的频率

呈现。数据表示为平均值 $\pm$ 平均值标准偏差 (mean $\pm$ sem)。线用三次样条曲线算法拟合。

图 8. 来自 Mouseac 数据库的 2、4、8 和 18 月龄的 5 种动物模型和野生型 (WT) 小鼠的 AD 的标志的变化。

(a) A β 斑块或 tau 神经原纤维缠结的相对密度的变化 (每组为 n=4)。数据表示为平均值 $\pm$ 平均值标准偏差 (mean $\pm$ sem)。颜色表示不同的模型；线使用多项式算法拟合。

(b) 突触素的 log₂ 标准化表达水平的变化 (每组为 n=4)。数据表示为平均值 $\pm$ 平均值标准偏差 (mean $\pm$ sem)。颜色表示不同的模型；线使用多项式算法拟合。

(c-d) CD86 和 ARG1 的 log₂ 标准化表达水平的变化，表示 M1 和 M2 细胞计数的变化 (每组为 n=4)。数据表示为平均值 $\pm$ 平均值标准偏差 (mean $\pm$ sem)。颜色表示不同的模型；线使用多项式算法拟合。

(e-h) TIPM、CCL3、GATA-3 和 MIF 的 log₂ 标准化表达水平的变化，代表 Th1 和 Th2 计数的变化 (每组为 n=4)。数据表示为平均值 $\pm$ 平均值标准偏差 (mean $\pm$ sem)。颜色表示不同的模型；线使用多项式算法拟合。

图 9.

(a) 共同居住对于在 7 月龄时评估 WT，共同居住的 WT 和 5XFAD 转基因 (Tg) 小鼠的辨别学习能力的试验中达到 80% 成功所花费的以 10⁴ 秒计的时间的影响 (参见方法) (n=5-8)。花费的时间是指达到 80% 表现水平的时间 (秒)；花费的时间越长，认知障碍越严重 (参见方法)。

(b) 使用 WT 或 5XFAD 转基因 (Tg) 小鼠的粪便，进行粪便微生物区系移植 (FMT) 对注射有 A β 的 WT 受体小鼠的大脑免疫细胞 (Th1 和 Th2) 计数的影响 (参见方法)。Th1 细胞 (CD45^{high}CD4⁺CXCR3⁺CCR6⁻) 和 Th2 细胞 (CD45^{high}CD4⁺CXCR3⁻CCR6⁻CCR4⁺) (n=6-8) 是相对于 CD45^{high}CD4⁺ T 细胞呈现；数据表示为平均值 $\pm$ 平均值标准偏差 (mean $\pm$ sem)。*P<0.05，学生 t 检验。

(c) 来自 2 月龄的 WT 小鼠的 FMT 对 5XFAD 转基因 (Tg) 小鼠的大脑 Th1 细胞的影响。(n=6-7)。数据表示为平均值 $\pm$ 平均值标准偏差 (mean $\pm$ sem)。*P<0.05，学生 t 检验。

图 10.

(a) 口服 OM1 处理的 7 月龄 5XFAD 转基因 (Tg) 小鼠 (n=5-7) 的肠道微生物组组成的线性判别分析效应量 (LEfSe) 的分支图。具有最高判别力的细菌门在图上标注。蓝色, 7 月龄 Tg 小鼠中富集的细菌。红色, 接受 OM1 的 7 月龄 Tg 小鼠中富集的细菌。外圆到内圆表示不同分类级别 (由外向内: 门, 纲, 目, 科, 属)。M, 月。

(b-c) 7 月龄 5XFAD 转基因 (Tg) 小鼠中 OM1 导致的微生物种上调和下调的微生物区系与大脑免疫细胞亚型的频率之间的相关性。具有黄色星号 (*) 的红色 (正相关) 或蓝色 (负相关) 方块具有 P 值 < 0.05 , 如通过 Pearson 相关系数测量的。方块内的数字表示相关系数。

(d) WT、Tg 和 OM1 处理的 Tg 的大脑海马中的 IBA1 染色、A β 沉积和 Tau 磷酸化的代表性图像。比例尺代表 250 μm 。使用显示成深棕色的底物 3,3'-二氨基联苯胺 (DAB) 使阳性信号可视化。

(e) 来自 WT, Tg 和 OM1 处理的 Tg 的 FMT 对海马注射 A β 的 C57 小鼠中的大脑 Th1 细胞的影响 (n=4-5)。数据表示为平均值 $\pm$ 平均值标准偏差 (mean $\pm$ sem)。

(f) 抗生素处理 (氨苄青霉素 (0.1 mg/mL)、链霉素 (0.5 mg/mL) 和粘菌素 (0.1 mg/mL)) 对口服 OM1 处理的 6 月龄 APP/PS1 转基因模型小鼠的肠道微生物在属水平上的相对丰度的影响 (n=6-8)。颜色表示不同的属。

(g) OM1 对经抗生素处理的 6 月龄 APP/PS1 小鼠的大脑 Th1 细胞频率的影响 (参见方法)。Th1 细胞 (CD45^{high}CD4⁺CXCR3⁺CCR6⁻) 是相对于 CD45^{high}CD4⁺ T 细胞呈现 (n=6-8), 并且数据表示为平均值 $\pm$ 平均值标准偏差 (mean $\pm$ sem)。从左到右: * $P < 0.05$, 学生 t 检验。NS, 无显著性。

(h) OM1 对经抗生素处理的 6 月龄 APP/PS1 小鼠的海马切片中检测到的 IBA1 阳性免疫荧光染色的相对密度的影响 (n=4-6; 参见方法)。IBA1 阳性区域反映了小胶质细胞的激活。数据表示为平均值 $\pm$ 平均值标准偏差 (mean $\pm$ sem)。*** $P < 0.0001$, 学生 t 检验。NS, 无显著性。

(i) 在有或没有抗生素的情况下, APP/PS1 和 OM1 处理的 APP/PS1 小鼠的大脑中的 IBA1 代表性免疫荧光染色。使用显示成绿色的 FITC 缀合二抗使 IBA1 可视化。用显示成蓝色的 DAPI 染色核。比例尺代表 250 μm 。

(j) 如通过细胞因子抗体阵列检测的, OM1 对 7 月龄 APP/PS1 小鼠的大脑匀浆中的细胞因子水平的影响 (n=5-6)。热图中的颜色表示通过 Row Z-Score 标准化的相对细胞因子水平; 红色表示上调的细胞因子,

蓝色表示下调的细胞因子。

图 11.

(a) OM1 对细菌上清液刺激的初始 CD4 T 细胞分化为 Th1 和 Th2 细胞的影响。培养初始 CD4 T 细胞，并在有/无 OM1 的情况下加入来自 5XFAD 小鼠的微生物区系的上清液 3 天。通过流式细胞术计数 Th1 (CD4⁺IFN- γ ⁺) 细胞和 Th2 (CD4⁺IL-4⁺) 细胞。数据表示为平均值 $\pm$ 平均值标准偏差 (mean $\pm$ sem)；每组 n=3 个重复。

(b-c) 火山图描绘了原始数据中显著代谢物的分布，代表 7 月龄的 WT 和 Tg 小鼠 (n=6-8) (b) 和 7 月龄的用或未用 OM1 处理的 Tg 小鼠 (n=6) (c) 的肠道粪便代谢组学。红点表示显著的代谢物。显著性定义为学生 t 检验的 p 值 < 0.05，并且处理 (T) 与野生型 (WT) 之间的倍数变化 (FC) < 0.83 或 > 1.2。x 轴显示 log₂FC，y 轴显示 -log₁₀P。

(d-e) 在 Tg 与 WT 小鼠之间有区别地调节的 786 种代谢物 (n=6-8) (d)，以及在经 OM1 处理和未处理的 Tg 小鼠之间有区别地调节的 149 种代谢物的热图 (e)。通过将显著峰的分子质量数据 (m/z) 与在线 METLIN 数据库匹配来识别和注释这些代谢物。

(f) 维恩图显示在 Tg 与 WT 小鼠之间 (T_W) 以及在经 OM1 处理与未处理的 Tg 小鼠之间 (Ttreat_T) (n=6-8) 通常失调的肠道粪便代谢物。124 种代谢物在两个比较中具有相反的模式，即在 T_W 中高且在 Ttreat_T 中低或者在 T_W 中低且在 Ttreat_T 中高。

(g) 热图显示在 WT、Tg 和经 OM1 处理的 Tg 组 (n=6-8) 之间有区别地调节的，并且可以与所有三个数据库 (人类代谢组数据库 (Human Metabolites Database, HMDB)，METLIN，京都基因和基因组百科全书 (Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes, KEGG)) 匹配的 31 种识别的代谢物。红色，上调；蓝色，下调。

(h) 使用随机森林算法计算的，疾病进展期间所有氨基酸的接受者操作特征 (ROC) 曲线和曲线下面积 (AUC) 值。

(i) 粪便微生物组移植 (FMT) 对血液中苯丙氨酸和异亮氨酸的影响。将 2 月龄的 WT 小鼠的粪便移植到 7 月龄的 Tg 小鼠中 (n=6-7)。苯丙氨酸，***P < 0.001 (F (2, 17) = 26.59)。异亮氨酸，**P < 0.01 (Tg 相对于 WT)，**P < 0.01 (Tg+FMT 相对于 Tg)，单因素方差分析 (F (2, 17) = 8.181)。

(j) 不同月 (M) 龄的 WT、共同居住的 WT 和 Tg 的血液样品中的氨基酸的水平。红色，上调；蓝色，下调。

(k) 初始 CD4 T 细胞对苯丙氨酸的摄取。将初始 CD4 T 细胞在有/无 ^{13}C 标记的苯丙氨酸的情况下培养 0.5 小时。测试与苯丙氨酸相关的化合物的质谱。 ^{13}C -苯丙氨酸以 5 mmol/L 的浓度施用，通过 L 型氨基酸转运体而被摄取。

5 图 12. JPH203 50 mg/kg 有效抑制大脑内 Th1 细胞比例。

图 13. 施用 OM1 后与对照相比肠菌 OTU 水平结构变化趋势-PCoA 分析苯丙氨酸降解菌移植 1 周后对粪便中苯丙氨酸含量的影响。

图 14. 施用 OM1 后与对照相比肠菌属水平相对丰度变化趋势苯丙氨酸降解菌移植 1 周后对血中 Th1 细胞比例的影响。

10 图 15. 施用 OM1 后与对照相比大脑细胞因子含量变化趋势。

图 16. 施用用于调节肠道微生物的相对丰度的试剂：OM1 或粪菌（肠道微生物复合物）前后肠道微生物分布变化。

图 17. AD 和 HC 的门水平和属水平的差异，部分具体列出。AD：AD 病人；HC：Healthy control 健康对照。

15 图 18. AD 和 HC 的部分显著改变菌群(属 genus 及种 species 级别)。AD：AD 病人；HC：Healthy control 健康对照。

图 19. 与 AD 相关的氨基酸列表。使用 Multivariate ROC curve based exploratory analysis (Explorer) 分析不同月龄野生型小鼠和 5XFAD 小鼠的血液氨基酸，寻找潜在的氨基酸组合作为区分野生型小鼠和 5XFAD 小鼠的标志物。以下为按照选择频率排序的前 15 个氨基酸以及所有排序的列表。

图 20. 6.5 月龄 5XFAD 小鼠在接受 100mpk OM1 治疗 1 个月后，具有恢复到野生小鼠趋势的血液氨基酸。

25 图 21. 6.5 月龄 5XFAD 小鼠在接受 100mpk OM1 治疗 1 个月后，具有恢复到野生小鼠趋势的粪便氨基酸。

图 22. OM1 给药后逆转的细胞因子列表。6.5 月龄 5XFAD 小鼠在接受 100mpk OM1 治疗 1 个月后，具有恢复到野生小鼠趋势的脑内细胞因子。

30 图 23. 不同月龄 APP/PS1 小鼠的大脑 M1 细胞变化趋势。

具体实施方式

现将描述某些示例性实施方式以提供对本文公开的产品、方法和用途的结构、功能、制备和应用的原理的全面理解。这些实施方式的一个或多个实施例将在后文中举例说明。本领域技术人员将理解，本文具体描述和在附图中具体举例说明的产品、方法和用途是非限制性的示例性

实施方式，而本发明的范围仅由权利要求书限定。结合一个示例性实施方式举例说明或描述的特征可以与其它实施方式的特征结合。这样的修改和变化有意包括在本发明的范围内。本文引用的全部公开文献、专利和专利申请均通过引用全文并入本文。

5 在描述本发明的上下文中（特别是在以下权利要求的上下文中）除非本文另有说明或与上下文明显矛盾，否则术语“一个/一种(a/an)”和“该/所述(the)”以及类似指示的使用应被解释为涵盖单数和复数。除非另有说明，否则术语“包含”，“具有”，“包括”和“含有”应被解释为开放式术语（即，“包括，但不限于”），但也包括“基本上由.....组成”和“由.....
10 组成”的部分封闭或封闭式术语。除非本文另有说明，否则本文中对数值范围的记载仅旨在用作独立地提及落入该范围内的每个单独值的简写方法，并且每个单独值并入本说明书中，如同其在本文中独立地记载。除非本文另有说明或上下文明显矛盾，否则本文所述的所有方法均可以任何合适的顺序进行。除非另外声明，否则本文提供的任何和所有实例或
15 示例性语言（例如，“如”）的使用仅旨在更好地说明本发明，而不对本发明的范围构成限制。本说明书中的任何语言都不应被解释为表示任何未要求保护的要素对于本发明的实践是必要的。所有百分比均为重量百分比，并且所有重量百分比均基于组合物的总重量（在任何任选的浓缩和/或稀释之前）。提到“一个或多个/一种或多种”包括“两个或更多个/两
20 种或更多种”和“三个或更多/三种或更多种”等等。

本文描述了本发明的优选实施方式。在阅读前文的描述后，那些优选实施方式的变化对于本领域普通技术人员可以变得显而易见。发明人预期熟练技术人员适当地采用这样的变化，并且发明人希望本发明以不同于本文具体描述的方式实施。因此，本发明包括适用法律允许的所附
25 权利要求中记载的主题内容的所有修改和等同方式。而且，除非本文另有说明或上下文明显矛盾，否则本发明涵盖上述要素的所有可能变化方式的任意组合。

在本申请中出现一系列列举数值的所有地方，应理解任意所列举的数值可以是数值范围的上限或下限。还应理解本发明涵盖所有这样的数值范围，即具有数值上限和数值下限的组合的一个范围，其中上限和下
30 限各自的数值都可以是本发明中列举的任意数值。本发明提供的范围应理解为包括该范围内的所有值。例如，1-10 应理解为包括值 1、2、3、4、5、6、7、8、9 和 10 中的全部，并视情况包括分数值。表达为“至多(up to)”某个值（例如至多 5）的范围应理解为所有值（包括该范围的上限），
35 例如 0、1、2、3、4 和 5，并视情况包括分数值。至多一周或在一周内

应理解为包括 0.5、1、2、3、4、5、6 或 7 天。类似地，由“至少”限定的范围应理解为包括所提供的较低值和所有更高的值。

除非另有指出，所有百分比形式是重量/重量。

如本发明所用，“约”应理解为包括在平均值的三个标准偏差内或特定领域中的标准公差范围内。在某些实施方式中，约应理解为不超过 0.5 的变异。“约”修饰其后所有列举的值。例如，“约 1、2、3”表示“约 1”、“约 2”、“约 3”。

除非上下文另有明确指出，术语“或”在本发明中包含性地用以指术语“和/或”并可与其互换地使用。

术语“例如”在本发明中用以指短语“例如但不限于”并可与其互换地使用。

本领域技术人员应理解，上文在各个实施方式中记载的技术特征可以单独或组合地与本发明的各个方面的技术方案组合使用。

发明人采用由于严重的、加速的认知障碍而广泛用于 AD 研究的 5XFAD 转基因 (Tg) 小鼠模型。通过分析在 AD 进展的不同阶段中 Tg 小鼠和 WT 小鼠的肠型 (enterotype)，发现 Tg 小鼠的肠道微生物区系是高度动态的 (图 1d)。在 2-3 月龄时，拟杆菌门 (*Bacteroidetes*)，厚壁菌门 (*Firmicutes*) 和疣微菌门 (*Verrucomicrobia*) 是三种最丰富的细菌门 (分别为 46.8%，32.3% 和 12.6%)，而 7-9 个月阶段，厚壁菌门 (*Firmicutes*) 变成主要细菌，而拟杆菌门 (*Bacteroidetes*) 和疣微菌门 (*Verrucomicrobia*) 的丰度明显降低。这与 WT 小鼠的肠道微生物区系形成鲜明对比。

发明人还对外周免疫细胞 Th1 和 Th1 和小胶质细胞 M1 和 M2 进行了分析，发现 CD4⁺ 细胞的两种主要亚型——浸润性 Th1 和 Th2 细胞——表现出与小胶质细胞的两种主要亚型——M1 和 M2 小胶质细胞——相似的动态 (图 1f 和图 1j)。在早期，主要为 Th2 细胞和神经保护性 M2 小胶质细胞，而在晚期，主要为 Th1 细胞和促炎性 M1 小胶质细胞。发明人认为随着肠道微生物区系模式发生转变，免疫细胞群体倾向于变为 Th1 和 M1 占主导的状态。

发明人还分析了 Tg 小鼠中肠道微生物区系的丰度与脑免疫细胞之间的关联。注意到早期 (2-3 个月) 的细菌组成与大脑中的 M2 和 Th2 细胞计数高度相关 (图 1k，上图)，而在晚期 (7-9 个月)，细菌模式变化与 M1 和 Th1 细胞高度相关 (图 1k，下图)。总体而言，这些结果表明 AD 进展期间，肠道细菌与外周免疫细胞浸润和神经炎症发生相关。

进一步地，发明人揭示了肠道微生物区系的生态失调是各种外周免

疫细胞（包括 CD4⁺和 CD8⁺ T 细胞，B 细胞，自然杀伤（NK）细胞，中性粒细胞，树突状细胞（DC）和单核细胞）向大脑浸润所需要的。其中，Th1 细胞是特别值得注意的，因为在 AD 进展期间与 M1 小胶质细胞激活密切相关。鉴于大脑中 Th1 与 M1 小胶质细胞之间公认的功能性串扰⁶⁰，发明人提出，肠道生态失调促进 Th1 细胞浸润，以允许其与 M1 小胶质细胞发生局部串扰，进而触发小胶质细胞分化为促炎状态。通过本研究中获得的一系列发现，这种机制洞察得到了加强。首先，AD 进展期间肠道微生物区系组成的动态变化与 Th1 细胞浸润的升高显著相关。其次，通过抗生素处理来消融肠道微生物区系阻断了 AD 小鼠中的 Th1 细胞浸润和进而 M1 小胶质细胞激活（图 2a-c）。第三，长期粪便细菌暴露（共同居住实验）和来自 AD 小鼠的粪便细菌的粪便微生物区系移植两者均明显增强 WT 小鼠中的 Th1 细胞浸润（图 2e）和 M1 小胶质细胞激活，而 WT 小鼠粪便反向粪便微生物区系移植到 Tg 小鼠中减少了受体 Tg 小鼠的 Th1 细胞（图 9c）。发明人的研究结果作为总体突出了肠道微生物区系在 AD 进展中作为促进 Th1/M1 小胶质细胞主导的神经炎症的驱动因素。

在 AD 中连接肠道微生物区系失调和神经炎症的因果关系仍不清楚。在本研究中，发明人检测到超过 100 种代谢物在 AD 小鼠中与 WT 小鼠相比显著改变。其中，最显著的变化发生在氨基酸中，特别是苯丙氨酸相关途径中的那些氨基酸。发明人能够确认苯丙氨酸和异亮氨酸的丰度在 AD 小鼠的粪便和血液中相对于 WT 小鼠增加。体外和体内功能评估两者揭示了苯丙氨酸和异亮氨酸在促进外周炎性 Th1 细胞的分化和增殖方面的作用。使用抗生素消融肠道微生物区系导致血液苯丙氨酸和异亮氨酸、Th1 细胞浸润、和 M1 细胞激活的同时下降。这些发现强调了肠道微生物区系异常产生苯丙氨酸和异亮氨酸在激发 Th1 细胞主导的神经炎症中的作用。与此观点一致，发明人检测到 AD 导致的 MCI 患者的血液中苯丙氨酸/异亮氨酸浓度和 Th1 细胞计数与健康对照组相比更高。

新浮现的数据显示，多糖或寡糖具有调节肠道微生物区系的优势⁶²。甘露糖醛酸寡糖是基于糖类的抗 AD 药物，在中国最近完成的 III 期临床试验中，已被证实改善轻度至中度 AD 患者的认知障碍。甘露糖醛酸寡糖具有良好的耐受性，具有与安慰剂对照类似的安全性。在本研究中，发明人发现 OM1 有效地修复了肠道微生物区系（图 4a-b；图 10a），减少了粪便和血液中苯丙氨酸和异亮氨酸的量（图 5c-d），并减轻了 Th1 相关神经炎症（图 4g-i）。值得注意的是，经 OM1 处理的 Tg 粪便可以

很大程度上模仿 OM1 处理本身的治疗效果，并且抗生素处理消除了其治疗效果。这些发现提供了重要证据，表明 OM1 的治疗效果主要是通过肠道微生物组的修复。因此，OM1 可以提供以微生物区系为中心的抗 AD 策略的有吸引力的方法，值得进一步研究。

5 所有这些发现允许发明人在理解 AD 发病机制方面提出概念上的进展。AD 不仅仅是局部 A β 驱动的大脑疾病，而是其发展还需要肠、大脑和中间炎症因子之间的全身性相互作用（图 6）。在 A β 沉积的情况下，AD 进展期间改变的肠道微生物区系组成引起氨基酸（特别是苯丙氨酸和异亮氨酸）异常升高。这些氨基酸促进外周 Th1 细胞通过血液循环浸润到大脑中。浸润性外周 Th1 细胞可以与大脑中的 M1 小胶质细胞局部串扰，导致病理性神经炎症和认知障碍。这些对 AD 发病机理的机制见解可以通过修复肠道微生物区系以有利于抗神经炎症响应，提供新的治疗解决方案。

发明人的研究结果可以对 AD 诊断和治疗具有转化意义。特定细菌（例如，Th1/M1 相关细菌）、氨基酸（例如，苯丙氨酸和异亮氨酸）和大脑浸润性免疫细胞组成（例如，Th1 细胞主导）或其一种或多种的组合可以用作 AD 导致的 MCI 患者的早期诊断性生物标志物，值得在大型 AD 患者队列中进一步验证。

更重要的是，已确定的 OM1 以微生物区系为中心的抗 AD 效应将通过重塑肠道微生物区系为 AD 治疗开辟新的治疗途径，并通过探索糖类的巨大化学空间来指导未来开发有效疗法。

发明人识别的众多与脑-肠轴相关的特征肠道微生物、氨基酸、免疫细胞和细胞因子各自构成了肠道微生物谱（profile）、氨基酸谱、免疫细胞谱和细胞因子谱。这些谱（例如肠道微生物谱）中的一个或多个在正常和疾病个体之间表现出差异。本发明旨在通过检测或调节这些谱（例如肠道微生物谱）中的一个或多个而检测或调节个体的状态。在一些实施方式中，对于诊断目的而言，可以检测个体的谱（例如肠道微生物谱）以与相应正常个体的具有正常特征的谱（例如肠道微生物谱）和/或相应疾病个体的具有疾病特征的谱（例如肠道微生物谱）进行比较，从而确定个体是处于正常状态或是处于疾病状态，由此诊断个体。在一些实施方式中，对于治疗目的而言，可以使个体的具有疾病特征的谱（例如肠道微生物谱）向相应正常个体的具有正常特征的谱（例如肠道微生物谱）调节，从而使个体的疾病状态调节向正常状态调节，由此治疗个体。

因此在一个方面，本发明提供了用于调节哺乳动物外周血中的氨基酸水平的试剂在制备用于在受试者中治疗阿尔茨海默病的药物中的用

途。

在另一个方面，本发明提供了一种用于在受试者中治疗阿尔茨海默病的药物组合物，所述药物组合物包含有效量的用于调节哺乳动物外周血中的氨基酸水平的试剂。

- 5 在一些实施方式中，氨基酸是选自以下中的一种或多种：4-OH 脯氨酸、乙酰鸟氨酸、丙氨酸、 α -氨基己二酸、天冬酰胺、天冬氨酸、不对称二甲基精氨酸、 β -丙氨酸、肌肽、瓜氨酸、肌酐、GABA、谷氨酸、谷氨酰胺、甘氨酸、组氨酸、牛磺酸、异亮氨酸、犬尿氨酸、亮氨酸、赖氨酸、蛋氨酸、蛋氨酸亚砷、鸟氨酸、苯丙氨酸、哌啶酸、脯氨酸、
10 腐胺、焦谷氨酸、丝氨酸、血清素、牛磺酸、苏氨酸、色氨酸、酪氨酸和缬氨酸；优选是选自苯丙氨酸、异亮氨酸、血清素、组氨酸和乙酰鸟氨酸中的一种或多种；更优选是苯丙氨酸和/或异亮氨酸；最优选是苯丙氨酸。

- 15 在一些实施方式中，试剂包含选自以下中的一种或多种：氨基酸降解通路中的酶，氨基酸合成通路中的酶的抑制剂、氨基酸配体，氨基酸转运体的激动剂或抑制剂，用于调节肠道微生物的相对丰度的试剂、或其组合。

- 20 在一些实施方式中，用于调节肠道微生物的相对丰度的试剂选自糖类药物、肠道微生物复合物、或其组合；其中所述糖类药物选自单糖、二糖、寡糖、多糖、或其衍生物、或者其和/或其衍生物的组合；优选寡糖和多糖；更优选甘露糖醛酸寡糖或包含甘露糖醛酸寡糖的组合物；其中所述肠道微生物复合物包含选自厚壁菌门、拟杆菌门、变形菌门、放线菌门、梭杆菌门、蓝藻菌门、疣微菌门或其组合中的一种或多种。

- 25 在一些实施方式中，氨基酸降解酶选自以下中的一种或多种：苯丙氨酸-4-羟化酶；苯丙氨酸 2-单氧酶；过氧化氢酶-过氧化物酶；苯乙醛合成酶；芳族-L-氨基酸/L-色氨酸脱羧酶；苯丙氨酸脱羧酶；苯丙氨酸 N-酰基转移酶；天冬氨酸氨基转移酶；酪氨酸氨基转移酶；L-氨基酸氧化酶；苯丙氨酸脱氢酶；芳族氨基酸转氨酶；组氨醇磷酸盐氨基转移酶；芳族氨基酸氨基转移酶 II；苯丙氨酸消旋酶；苯丙氨酸氨裂解酶；苯丙
30 氨酸/酪氨酸氨裂解酶；支链氨基酸氨基转移酶；L-氨基酸氧化酶。

在一些实施方式中，氨基酸降解酶选自以下中的一种或多种：苯丙氨酸-4-羟化酶；芳族-L-氨基酸/L-色氨酸脱羧酶；天冬氨酸氨基转移酶；酪氨酸氨基转移酶，TAT；L-氨基酸氧化酶。

- 35 在一些实施方式中，氨基酸降解酶是通过载体递送，优选所述载体是能够表达所述氨基酸降解酶的微生物，优选细菌，更优选大肠杆菌。

在一些实施方式中，通过检测来自所述受试者的外周血样品，试剂使所述氨基酸水平调节约 5、10、15、20、25、30、35、40、45、50、55、60、65、70、75、80、85、90、95、100、105、110、115、120、125、130、135、140、145、150、155、160、165、170、175、180、185、190、195、200、205、210、215、220、225、230、235、240、245、250、255、260、265、270、275、280、285、290、295、300 μM 或更多；和/或使得所述氨基酸水平接近或达到相应正常受试者的相应氨基酸水平。

在一些实施方式中，通过检测来自所述受试者的粪便样品，试剂使所述氨基酸水平调节约 100、200、300、400、500、600、700、800、900、1000、1100、1200、1300、1400、1500、1600、1700、1800、1900、2000、2100、2200、2300、2400、2500、2600、2700、2800、2900、3000 $\mu\text{mol/g}$ 或更多；和/或使得所述氨基酸水平接近或达到相应正常受试者的相应氨基酸水平。

在一些实施方式中，调节哺乳动物外周血中的氨基酸水平是提高哺乳动物外周血中的一种或多种氨基酸的水平和/或降低哺乳动物外周血中的一种或多种氨基酸的水平；优选降低选自以下中的一种或多种氨基酸的水平：4-OH 脯氨酸、乙酰鸟氨酸、丙氨酸、 α -氨基己二酸、天冬酰胺、天冬氨酸、不对称二甲基精氨酸、 β -丙氨酸、肌肽、瓜氨酸、肌酐、GABA、谷氨酸、谷氨酰胺、甘氨酸、组氨酸、牛磺酸、异亮氨酸、犬尿氨酸、亮氨酸、赖氨酸、蛋氨酸、蛋氨酸亚砷、鸟氨酸、苯丙氨酸、哌啶酸、脯氨酸、腐胺、焦谷氨酸、丝氨酸、血清素、牛磺酸、苏氨酸、色氨酸、酪氨酸和缬氨酸；更优选降低哺乳动物外周血中选自苯丙氨酸、异亮氨酸、血清素、组氨酸和乙酰鸟氨酸中的一种或多种氨基酸的水平；还更优选降低哺乳动物外周血中的苯丙氨酸和/或异亮氨酸的水平；最优选降低哺乳动物外周血中的苯丙氨酸的水平。

在又一个方面，本发明提供了一种用于筛选可用于治疗阿尔茨海默病的候选药物的方法，其包括：

a) 向具有一定的外周血中氨基酸水平的哺乳动物模型施用测试试剂，和

b) 选择调节所述氨基酸水平的测试试剂作为可用于治疗阿尔茨海默病的候选药物。

在一些实施方式中，方法还包括向具有一定的外周血中氨基酸水平的哺乳动物模型施用作为阳性对照的 GV-971，优选选择与所述 GV-971 基本上一致地调节所述氨基酸水平的测试试剂。

在一些实施方式中，方法还包括向具有一定的外周血中氨基酸水平

的哺乳动物模型施用所选择的测试试剂以进行验证，其中通过检测来自所述哺乳动物模型的外周血样品，所选择的测试试剂使所述氨基酸水平调节约 5、10、15、20、25、30、35、40、45、50、55、60、65、70、75、80、85、90、95、100、105、110、115、120、125、130、135、140、145、150、155、160、165、170、175、180、185、190、195、200、205、210、215、220、225、230、235、240、245、250、255、260、265、270、275、280、285、290、295、300 μM 或更多；和/或使得所述氨基酸水平接近或达到相应正常哺乳动物模型的相应氨基酸水平。

在一些实施方式中，方法还包括向具有一定的外周血中氨基酸水平的哺乳动物模型施用所选择的测试试剂以进行验证，其中通过检测来自所述哺乳动物模型的粪便样品，所选择的测试试剂使所述氨基酸水平调节约 100、200、300、400、500、600、700、800、900、1000、1100、1200、1300、1400、1500、1600、1700、1800、1900、2000、2100、2200、2300、2400、2500、2600、2700、2800、2900、3000 $\mu\text{mol/g}$ 或更多；和/或使得所述氨基酸水平接近或达到相应正常哺乳动物模型的相应氨基酸水平。

在一些实施方式中，氨基酸是选自以下中的一种或多种：4-OH 脯氨酸、乙酰鸟氨酸、丙氨酸、 α -氨基己二酸、天冬酰胺、天冬氨酸、不对称二甲基精氨酸、 β -丙氨酸、肌肽、瓜氨酸、肌酐、GABA、谷氨酸、谷氨酰胺、甘氨酸、组氨酸、牛磺酸、异亮氨酸、犬尿氨酸、亮氨酸、赖氨酸、蛋氨酸、蛋氨酸亚砷、鸟氨酸、苯丙氨酸、哌啶酸、脯氨酸、腐胺、焦谷氨酸、丝氨酸、血清素、牛磺酸、苏氨酸、色氨酸、酪氨酸和缬氨酸；优选是选自苯丙氨酸、异亮氨酸、血清素、组氨酸和乙酰鸟氨酸中的一种或多种；更优选是苯丙氨酸和/或异亮氨酸；最优选是苯丙氨酸。

在一些实施方式中，调节氨基酸水平是提高一种或多种氨基酸的水平和/或降低一种或多种氨基酸的水平；优选降低哺乳动物外周血中选自苯丙氨酸、异亮氨酸、血清素、组氨酸和乙酰鸟氨酸中的一种或多种氨基酸的水平；更优选降低哺乳动物外周血中的苯丙氨酸和/或异亮氨酸的水平；最优选降低哺乳动物外周血中的苯丙氨酸的水平。

在又一个方面，本发明提供了一种治疗阿尔茨海默病患者的方法，其包括：

(a) 检测所述患者的氨基酸水平并与相应正常群体的相应氨基酸水平进行比较以选择其水平与所述相应正常群体的相应氨基酸水平不同的氨基酸；

(b)向所述患者施用用于调节哺乳动物外周血中的氨基酸水平的试剂以调节所选择的氨基酸的水平以使其接近或达到所述相应正常群体的相应氨基酸水平。

- 5
- 10
- 15
- 20
- 25
- 30
- 35
- 40
- 45
- 50
- 55
- 60
- 65
- 70
- 75
- 80
- 85
- 90
- 95
- 100
- 105
- 110
- 115
- 120
- 125
- 130
- 135
- 140
- 145
- 150
- 155
- 160
- 165
- 170
- 175
- 180
- 185
- 190
- 195
- 200
- 205
- 210
- 215
- 220
- 225
- 230
- 235
- 240
- 245
- 250
- 255
- 260
- 265
- 270
- 275
- 280
- 285
- 290
- 295
- 300
- 305
- 310
- 315
- 320
- 325
- 330
- 335
- 340
- 345
- 350
- 355
- 360
- 365
- 370
- 375
- 380
- 385
- 390
- 395
- 400
- 405
- 410
- 415
- 420
- 425
- 430
- 435
- 440
- 445
- 450
- 455
- 460
- 465
- 470
- 475
- 480
- 485
- 490
- 495
- 500
- 505
- 510
- 515
- 520
- 525
- 530
- 535
- 540
- 545
- 550
- 555
- 560
- 565
- 570
- 575
- 580
- 585
- 590
- 595
- 600
- 605
- 610
- 615
- 620
- 625
- 630
- 635
- 640
- 645
- 650
- 655
- 660
- 665
- 670
- 675
- 680
- 685
- 690
- 695
- 700
- 705
- 710
- 715
- 720
- 725
- 730
- 735
- 740
- 745
- 750
- 755
- 760
- 765
- 770
- 775
- 780
- 785
- 790
- 795
- 800
- 805
- 810
- 815
- 820
- 825
- 830
- 835
- 840
- 845
- 850
- 855
- 860
- 865
- 870
- 875
- 880
- 885
- 890
- 895
- 900
- 905
- 910
- 915
- 920
- 925
- 930
- 935
- 940
- 945
- 950
- 955
- 960
- 965
- 970
- 975
- 980
- 985
- 990
- 995
- 1000
- 1005
- 1010
- 1015
- 1020
- 1025
- 1030
- 1035
- 1040
- 1045
- 1050
- 1055
- 1060
- 1065
- 1070
- 1075
- 1080
- 1085
- 1090
- 1095
- 1100
- 1105
- 1110
- 1115
- 1120
- 1125
- 1130
- 1135
- 1140
- 1145
- 1150
- 1155
- 1160
- 1165
- 1170
- 1175
- 1180
- 1185
- 1190
- 1195
- 1200
- 1205
- 1210
- 1215
- 1220
- 1225
- 1230
- 1235
- 1240
- 1245
- 1250
- 1255
- 1260
- 1265
- 1270
- 1275
- 1280
- 1285
- 1290
- 1295
- 1300
- 1305
- 1310
- 1315
- 1320
- 1325
- 1330
- 1335
- 1340
- 1345
- 1350
- 1355
- 1360
- 1365
- 1370
- 1375
- 1380
- 1385
- 1390
- 1395
- 1400
- 1405
- 1410
- 1415
- 1420
- 1425
- 1430
- 1435
- 1440
- 1445
- 1450
- 1455
- 1460
- 1465
- 1470
- 1475
- 1480
- 1485
- 1490
- 1495
- 1500
- 1505
- 1510
- 1515
- 1520
- 1525
- 1530
- 1535
- 1540
- 1545
- 1550
- 1555
- 1560
- 1565
- 1570
- 1575
- 1580
- 1585
- 1590
- 1595
- 1600
- 1605
- 1610
- 1615
- 1620
- 1625
- 1630
- 1635
- 1640
- 1645
- 1650
- 1655
- 1660
- 1665
- 1670
- 1675
- 1680
- 1685
- 1690
- 1695
- 1700
- 1705
- 1710
- 1715
- 1720
- 1725
- 1730
- 1735
- 1740
- 1745
- 1750
- 1755
- 1760
- 1765
- 1770
- 1775
- 1780
- 1785
- 1790
- 1795
- 1800
- 1805
- 1810
- 1815
- 1820
- 1825
- 1830
- 1835
- 1840
- 1845
- 1850
- 1855
- 1860
- 1865
- 1870
- 1875
- 1880
- 1885
- 1890
- 1895
- 1900
- 1905
- 1910
- 1915
- 1920
- 1925
- 1930
- 1935
- 1940
- 1945
- 1950
- 1955
- 1960
- 1965
- 1970
- 1975
- 1980
- 1985
- 1990
- 1995
- 2000
- 2005
- 2010
- 2015
- 2020
- 2025
- 2030
- 2035
- 2040
- 2045
- 2050
- 2055
- 2060
- 2065
- 2070
- 2075
- 2080
- 2085
- 2090
- 2095
- 2100
- 2105
- 2110
- 2115
- 2120
- 2125
- 2130
- 2135
- 2140
- 2145
- 2150
- 2155
- 2160
- 2165
- 2170
- 2175
- 2180
- 2185
- 2190
- 2195
- 2200
- 2205
- 2210
- 2215
- 2220
- 2225
- 2230
- 2235
- 2240
- 2245
- 2250
- 2255
- 2260
- 2265
- 2270
- 2275
- 2280
- 2285
- 2290
- 2295
- 2300
- 2305
- 2310
- 2315
- 2320
- 2325
- 2330
- 2335
- 2340
- 2345
- 2350
- 2355
- 2360
- 2365
- 2370
- 2375
- 2380
- 2385
- 2390
- 2395
- 2400
- 2405
- 2410
- 2415
- 2420
- 2425
- 2430
- 2435
- 2440
- 2445
- 2450
- 2455
- 2460
- 2465
- 2470
- 2475
- 2480
- 2485
- 2490
- 2495
- 2500
- 2505
- 2510
- 2515
- 2520
- 2525
- 2530
- 2535
- 2540
- 2545
- 2550
- 2555
- 2560
- 2565
- 2570
- 2575
- 2580
- 2585
- 2590
- 2595
- 2600
- 2605
- 2610
- 2615
- 2620
- 2625
- 2630
- 2635
- 2640
- 2645
- 2650
- 2655
- 2660
- 2665
- 2670
- 2675
- 2680
- 2685
- 2690
- 2695
- 2700
- 2705
- 2710
- 2715
- 2720
- 2725
- 2730
- 2735
- 2740
- 2745
- 2750
- 2755
- 2760
- 2765
- 2770
- 2775
- 2780
- 2785
- 2790
- 2795
- 2800
- 2805
- 2810
- 2815
- 2820
- 2825
- 2830
- 2835
- 2840
- 2845
- 2850
- 2855
- 2860
- 2865
- 2870
- 2875
- 2880
- 2885
- 2890
- 2895
- 2900
- 2905
- 2910
- 2915
- 2920
- 2925
- 2930
- 2935
- 2940
- 2945
- 2950
- 2955
- 2960
- 2965
- 2970
- 2975
- 2980
- 2985
- 2990
- 2995
- 3000
- 3005
- 3010
- 3015
- 3020
- 3025
- 3030
- 3035
- 3040
- 3045
- 3050
- 3055
- 3060
- 3065
- 3070
- 3075
- 3080
- 3085
- 3090
- 3095
- 3100
- 3105
- 3110
- 3115
- 3120
- 3125
- 3130
- 3135
- 3140
- 3145
- 3150
- 3155
- 3160
- 3165
- 3170
- 3175
- 3180
- 3185
- 3190
- 3195
- 3200
- 3205
- 3210
- 3215
- 3220
- 3225
- 3230
- 3235
- 3240
- 3245
- 3250
- 3255
- 3260
- 3265
- 3270
- 3275
- 3280
- 3285
- 3290
- 3295
- 3300
- 3305
- 3310
- 3315
- 3320
- 3325
- 3330
- 3335
- 3340
- 3345
- 3350
- 3355
- 3360
- 3365
- 3370
- 3375
- 3380
- 3385
- 3390
- 3395
- 3400
- 3405
- 3410
- 3415
- 3420
- 3425
- 3430
- 3435
- 3440
- 3445
- 3450
- 3455
- 3460
- 3465
- 3470
- 3475
- 3480
- 3485
- 3490
- 3495
- 3500
- 3505
- 3510
- 3515
- 3520
- 3525
- 3530
- 3535
- 3540
- 3545
- 3550
- 3555
- 3560
- 3565
- 3570
- 3575
- 3580
- 3585
- 3590
- 3595
- 3600
- 3605
- 3610
- 3615
- 3620
- 3625
- 3630
- 3635
- 3640
- 3645
- 3650
- 3655
- 3660
- 3665
- 3670
- 3675
- 3680
- 3685
- 3690
- 3695
- 3700
- 3705
- 3710
- 3715
- 3720
- 3725
- 3730
- 3735
- 3740
- 3745
- 3750
- 3755
- 3760
- 3765
- 3770
- 3775
- 3780
- 3785
- 3790
- 3795
- 3800
- 3805
- 3810
- 3815
- 3820
- 3825
- 3830
- 3835
- 3840
- 3845
- 3850
- 3855
- 3860
- 3865
- 3870
- 3875
- 3880
- 3885
- 3890
- 3895
- 3900
- 3905
- 3910
- 3915
- 3920
- 3925
- 3930
- 3935
- 3940
- 3945
- 3950
- 3955
- 3960
- 3965
- 3970
- 3975
- 3980
- 3985
- 3990
- 3995
- 4000
- 4005
- 4010
- 4015
- 4020
- 4025
- 4030
- 4035
- 4040
- 4045
- 4050
- 4055
- 4060
- 4065
- 4070
- 4075
- 4080
- 4085
- 4090
- 4095
- 4100
- 4105
- 4110
- 4115
- 4120
- 4125
- 4130
- 4135
- 4140
- 4145
- 4150
- 4155
- 4160
- 4165
- 4170
- 4175
- 4180
- 4185
- 4190
- 4195
- 4200
- 4205
- 4210
- 4215
- 4220
- 4225
- 4230
- 4235
- 4240
- 4245
- 4250
- 4255
- 4260
- 4265
- 4270
- 4275
- 4280
- 4285
- 4290
- 4295
- 4300
- 4305
- 4310
- 4315
- 4320
- 4325
- 4330
- 4335
- 4340
- 4345
- 4350
- 4355
- 4360
- 4365
- 4370
- 4375
- 4380
- 4385
- 4390
- 4395
- 4400
- 4405
- 4410
- 4415
- 4420
- 4425
- 4430
- 4435
- 4440
- 4445
- 4450
- 4455
- 4460
- 4465
- 4470
- 4475
- 4480
- 4485
- 4490
- 4495
- 4500
- 4505
- 4510
- 4515
- 4520
- 4525
- 4530
- 4535
- 4540
- 4545
- 4550
- 4555
- 4560
- 4565
- 4570
- 4575
- 4580
- 4585
- 4590
- 4595
- 4600
- 4605
- 4610
- 4615
- 4620
- 4625
- 4630
- 4635
- 4640
- 4645
- 4650
- 4655
- 4660
- 4665
- 4670
- 4675
- 4680
- 4685
- 4690
- 4695
- 4700
- 4705
- 4710
- 4715
- 4720
- 4725
- 4730
- 4735
- 4740
- 4745
- 4750
- 4755
- 4760
- 4765
- 4770
- 4775
- 4780
- 4785
- 4790
- 4795
- 4800
- 4805
- 4810
- 4815
- 4820
- 4825
- 4830
- 4835
- 4840
- 4845
- 4850
- 4855
- 4860
- 4865
- 4870
- 4875
- 4880
- 4885
- 4890
- 4895
- 4900
- 4905
- 4910
- 4915
- 4920
- 4925
- 4930
- 4935
- 4940
- 4945
- 4950
- 4955
- 4960
- 4965
- 4970
- 4975
- 4980
- 4985
- 4990
- 4995
- 5000
- 5005
- 5010
- 5015
- 5020
- 5025
- 5030
- 5035
- 5040
- 5045
- 5050
- 5055
- 5060
- 5065
- 5070
- 5075
- 5080
- 5085
- 5090
- 5095
- 5100
- 5105
- 5110
- 5115
- 5120
- 5125
- 5130
- 5135
- 5140
- 5145
- 5150
- 5155
- 5160
- 5165
- 5170
- 5175
- 5180
- 5185
- 5190
- 5195
- 5200
- 5205
- 5210
- 5215
- 5220
- 5225
- 5230
- 5235
- 5240
- 5245
- 5250
- 5255
- 5260
- 5265
- 5270
- 5275
- 5280
- 5285
- 5290
- 5295
- 5300
- 5305
- 5310
- 5315
- 5320
- 5325
- 5330
- 5335
- 5340
- 5345
- 5350
- 5355
- 5360
- 5365
- 5370
- 5375
- 5380
- 5385
- 5390
- 5395
- 5400
- 5405
- 5410
- 5415
- 5420
- 5425
- 5430
- 5435
- 5440
- 5445
- 5450
- 5455
- 5460
- 5465
- 5470
- 5475
- 5480
- 5485
- 5490
- 5495
- 5500
- 5505
- 5510
- 5515
- 5520
- 5525
- 5530
- 5535
- 5540
- 5545
- 5550
- 5555
- 5560
- 5565
- 5570
- 5575
- 5580
- 5585
- 5590
- 5595
- 5600
- 5605
- 5610
- 5615
- 5620
- 5625
- 5630
- 5635
- 5640
- 5645
- 5650
- 5655
- 5660
- 5665
- 5670
- 5675
- 5680
- 5685
- 5690
- 5695
- 5700
- 5705
- 5710
- 5715
- 5720
- 5725
- 5730
- 5735
- 5740
- 5745
- 5750
- 5755
- 5760
- 5765
- 5770
- 5775
- 5780
- 5785
- 5790
- 5795
- 5800
- 5805
- 5810
- 5815
- 5820
- 5825
- 5830
- 5835
- 5840
- 5845
- 5850
- 5855
- 5860
- 5865
- 5870
- 5875
- 5880
- 5885
- 5890
- 5895
- 5900
- 5905
- 5910
- 5915
- 5920
- 5925
- 5930
- 5935
- 5940
- 5945
- 5950
- 5955
- 5960
- 5965
- 5970
- 5975
- 5980
- 5985
- 5990
- 5995
- 6000
- 6005
- 6010
- 6015
- 6020
- 6025
- 6030
- 6035
- 6040
- 6045
- 6050
- 6055
- 6060
- 6065
- 6070
- 6075
- 6080
- 6085
- 6090
- 6095
- 6100
- 6105
- 6110
- 6115
- 6120
- 6125
- 6130
- 6135
- 6140
- 6145
- 6150
- 6155
- 6160
- 6165
- 6170
- 6175
- 6180
- 6185
- 6190
- 6195
- 6200
- 6205
- 6210
- 6215
- 6220
- 6225
- 6230
- 6235
- 6240
- 6245
- 6250
- 6255
- 6260
- 6265
- 6270
- 6275
- 6280
- 6285
- 6290
- 6295
- 6300
- 6305
- 6310
- 6315
- 6320
- 6325
- 6330
- 6335
- 6340
- 6345
- 6350
- 6355
- 6360
- 6365
- 6370
- 6375
- 6380
- 6385
- 6390
- 6395
- 6400
- 6405
- 6410
- 6415
- 6420
- 6425
- 6430
- 6435
- 6440
- 6445
- 6450
- 6455
- 6460
- 6465
- 6470
- 6475
- 6480
- 6485
- 6490
- 6495
- 6500
- 6505
- 6510
- 6515
- 6520
- 6525
- 6530
- 6535
- 6540
- 6545
- 6550
- 6555
- 6560
- 6565
- 6570
- 6575
- 6580
- 6585
- 6590
- 6595
- 6600
- 6605
- 6610
- 6615
- 6620
- 6625
- 6630
- 6635
- 6640
- 6645
- 6650
- 6655
- 6660
- 6665
- 6670
- 6675
- 6680
- 6685
- 6690
- 6695
- 6700
- 6705
- 6710
- 6715
- 6720
- 6725
- 6730
- 6735
- 6740
- 6745
- 6750
- 6755
- 6760
- 6765
- 6770
- 6775
- 6780
- 6785
- 6790
- 6795
- 6800
- 6805
- 6810
- 6815
- 6820
- 6825
- 6830
- 6835
- 6840
- 6845
- 6850
- 6855
- 6860
- 6865
- 6870
- 6875
- 6880
- 6885
- 6890
- 6895
- 6900
- 6905
- 6910
- 69

门	拟杆菌门 (Bacteroidetes)
门	变形菌门 (Proteobacteria)
门	放线菌门 (Actinobacteria)
门	梭杆菌门 (Fusobacteria)
门	蓝藻菌门 (Cyanobacteria)
门	疣微菌门 (Verrucomicrobia)

在一些实施方式中，肠道微生物是选自下表中的纲或其组合中的一种或多种：

纲	Bacteroidia
纲	Clostridia
纲	Gammaproteobacteria
纲	Bacilli
纲	Negativicutes
纲	Actinobacteria
纲	Fusobacteriia
纲	Betaproteobacteria
纲	Alphaproteobacteria

- 5 在一些实施方式中，肠道微生物是选自下表中的目或其组合中的一种或多种：

目	Bacteroidales
目	Clostridiales
目	Enterobacteriales
目	Selenomonadales
目	Lactobacillales
目	Bifidobacteriales
目	Fusobacteriales
目	Burkholderiales
目	Bacillales

在一些实施方式中，肠道微生物是选自下表中的科或其组合中的一种或多种：

科	Rikenellaceae
---	---------------

科	Ktedonobacteraceae
科	Nannocystaceae

在一些实施方式中，肠道微生物是选自下表中的属或其组合中的一种或多种：

属	Lachnospiraceae_NK4A136_group
属	Alistipes
属	Ruminococcus_1
属	Ruminococcaceae_UCG-002
属	Ruminococcaceae_UCG-005
属	Coprococcus_2
属	Tyzzarella_4
属	Lachnospiraceae_UCG-001
属	Anaerotruncus
属	Cloacibacterium
属	norank_f_Ktedonobacteraceae
属	Nannocystis
属	norank_f_Hydrogenophilaceae

- 5 在一些实施方式中，肠道微生物是选自下表中的种或其组合中的一种或多种：

种	unclassified_g_Subdoligranulum
种	unclassified_g_Alistipes
种	uncultured_organism_g_Parasutterella
种	unclassified_g_Tyzzarella_4
种	uncultured_organism_g_Ruminococcaceae_UCG-005
种	uncultured_organism_g_Anaerotruncus
种	uncultured_Alistipes_sp._g_Alistipes
种	Lachnospiraceae_bacterium_TF01-11
种	unclassified_g_Anaerotruncus
种	unclassified_g_norank_o_Mollicutes_RF9
种	uncultured_bacterium_g_Family_XIII_AD3011_group
种	uncultured_bacterium_g_norank_f_Christensenellaceae
种	uncultured_bacterium_g_Cloacibacterium

种	uncultured_organism_g_Peptococcus
种	Mycobacterium_celatum_g_Mycobacterium
种	unclassified_g_Oceanobacillus
种	Alistipes_putredinis_DSM_17216
种	Prevotella_loescheii
种	uncultured_bacterium_g_norank_o_MBA03
种	Eubacterium_brachy
种	uncultured_bacterium_adhufec108
种	uncultured_Clostridiales_bacterium_g_norank_f_Ktedonobacteraceae
种	Nannocystis_pusilla
种	bacterium_2013Ark19i
种	Auxenochlorella_protothecoides_g_norank
种	uncultured_Bacteroidetes_bacterium_g_Dinghuibacter

发明人发现多种肠道微生物涉及根据本发明的脑-肠轴。如实施例所示，在 WT 小鼠与 TG 小鼠之间，一些肠道微生物的水平发生变化，而在施用例如 OM1 后，这些肠道微生物的水平向 WT 小鼠方向恢复。这样的肠道微生物构成了肠道微生物谱。如前所述，这样的谱可以用于诊断和/或治疗目的。

在一些实施方式中，受试者中选自上表的门、纲、目、科、属和种的一种或多种（即 1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30、31、32、33、34、35、36、37、38、39、40、41、42、43、44、45、46、47、48、49、50、51、52、53、54、55、56、57、58、59、60、61、62、63、64、65、66 或 67 种）肠道微生物的水平相对于相应正常受试者的相应肠道微生物的水平变化（例如，上升或下降）指示所述受试者处于患有 AD 的风险中或者患有 AD。在一个实施方式中，受试者的由上表的门、纲、目、科、属和种的肠道微生物构成的肠道微生物谱中 1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30、31、32、33、34、35、36、37、38、39、40、41、42、43、44、45、46、47、48、49、50、51、52、53、54、55、56、57、58、59、60、61、62、63、64、65、66、67、68、69、70、71、72、73、74、75、76、77、78、79、80、81、82、83、84、

85、86、87、88、89、90、91、92、93、94、95、96、97、98、99 或 100% 的种类的肠道微生物的水平相对于相应正常受试者的相应肠道微生物的水平变化（例如，上升或下降）指示所述受试者处于患有 AD 的风险中或者患有 AD。

5 在一些实施方式中，患有 AD 的受试者中选自上表的门、纲、目、科、属和种的一种或多种（即 1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30、31、32、33、34、35、36、37、38、39、40、41、42、43、44、45、46、47、48、49、50、51、52、53、54、55、56、57、58、59、10 60、61、62、63、64、65、66 或 67 种）肠道微生物的水平相对于相应正常受试者的相应肠道微生物的水平朝向所述相应正常受试者的相应肠道微生物的水平变化（例如，上升或下降）指示所述受试者得到适当的治疗。在一个实施方式中，患有 AD 的受试者的由上表的门、纲、目、科、属和种的肠道微生物构成的肠道微生物谱中1、2、3、4、5、6、7、15 8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30、31、32、33、34、35、36、37、38、39、40、41、42、43、44、45、46、47、48、49、50、51、52、53、54、55、56、57、58、59、60、61、62、63、64、65、66、67、68、69、70、71、72、73、74、75、76、77、78、79、80、81、82、83、84、85、86、87、20 88、89、90、91、92、93、94、95、96、97、98、99 或 100%的种类的肠道微生物的水平相对于相应正常受试者的相应肠道微生物的水平朝向所述相应正常受试者的相应肠道微生物的水平变化（例如，上升或下降）指示所述受试者得到适当的治疗。

肠道微生物的相对丰度可以采用本发明的组合物或方法通过以下方式改变：施用包含相关微生物区系的组合物，或者施用包含显著提高和/25 或降低相关肠道微生物的相对丰度的一种或多种化合物的组合物。

拟杆菌门包含三个大的细菌纲：拟杆菌纲（*Bacteroidia*）、黄杆菌纲（*Flavobacteria*）和鞘脂杆菌纲（*Sphingobacteria*），它们分布在环境中，包括土壤中、沉积物中、海水中以及动物的肠中和皮肤上。

30 变形菌门是最大的细菌门。这些生物体显示了极高的代谢多样性并代表了大多数已知细菌的医学、工业和农业重要性。这在进化上、地质上和环境上都很重要。所有的变形菌门细菌都是革兰氏阴性的，其外壁由脂多糖组成。许多具有气体囊泡、鞭毛，或者能够通过滑动而移动；它们可以具有柄、其它附属物或具有形成多细胞子实体的能力。大多数35 成员是兼性或专性厌氧的、化能自养的和异养的，但也有例外。一些种

能够实现光合作用，其它的在细胞内或细胞外存储硫。

厚壁菌门是主要为革兰氏阳性的细菌的门。但是，少许具有导致它们革兰氏染色阴性的多孔假外膜。科学家曾经将厚壁菌门分类为包括所有革兰氏阳性细菌，但是最近已经将它们定义为具有被称为低-G+C 的相关形式的核心组。它们主要是圆形细胞，称为球菌类（单数球菌），或者是杆状形式（杆菌）。许多厚壁菌门产生内生孢子，其具有抗干燥性并能够在极端条件下存活，使得它们能够在各种环境中生存。

改变微生物区系的方法还可以包括测量来自受试者的样品中的一种或多种肠道微生物的相对丰度。在二代测序中，每个 sample 都会测到许多序列，经过预处理后使用序列聚类算法将相似度（similarity）为 97% 以上的序列放在一起，组成一个 OTU。于是可以得到 OTU_table，一个给出每个 sample 中每个 OTU 包含多少 reads 数目的矩阵，即每个 sample 对应每个 OTU 中的序列 reads 数目。相对丰度是以每个 sample(每行)为 100%，计算各 OTU 的 reads 数目占一个 sample 中所有的 reads 数目的百分比。因此，相对丰度即指样品中各微生物的序列数的相对百分比。相对丰度可以通过本发明描述的方法或本领域已知可用于检测其的方法检测，如 16S rRNA 基因的检测。

可以通过从受试者中获得样品来测量肠道微生物的相对丰度。所述样品可以是唾液，粪便和胃、肠和/或直肠内含物；来自于消化道组织（如口腔组织、食道、胃、小肠、回肠、盲肠、结肠和/或直肠）的组织样品；胃肠组织内的腹水；以及可能被熟悉微生物区系测定的人员所使用的其它任何样品。

可以将一种或多种肠道微生物的相对丰度与相应肠道微生物的正常相对丰度相比较。正常相对丰度可以是来自具有相似年龄、性别、种族等的一个或多个受试者。正常相对丰度可以是来自响应于处理或治疗干预或显示了处理或治疗干预的有益结果的具有相似年龄、性别、种族等的健康受试者。在具体实施方式中，正常相对丰度是健康受试者的肠道微生物的相对丰度。

本发明的方法和组合物可以涉及改变一种或多种肠道微生物的相对丰度。示例性实施方式可以涉及用于通过向受试者施用肠道微生物以改变肠道微生物的相对丰度的方法或组合物。取决于期望的结果（如，代谢产物减少、淋巴细胞向大脑浸润减少、小胶质细胞激活减少、神经炎症减轻、认知改善、阿尔茨海默病症状缓解）和个体受试者，受试者中的肠道微生物的相对丰度可以被调节 1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、

27、28、29、30、31、32、33、34、35、36、37、38、39、40、41、42、
43、44、45、46、47、48、49、50、51、52、53、54、55、56、57、58、
59、60、61、62、63、64、65、66、67、68、69、70、71、72、73、74、
75、76、77、78、79、80、81、82、83、84、85、86、87、88、89、90、
5 91、92、93、94、95、96、97、98、99、100%或更多，或者任意前述值
作为端点构成的范围或其中的任意值，例如约 7%至约 28%等或约 7%、
14%、21%、28%等；和/或使得所述受试者的肠道微生物的相对丰度接
近或达到相应正常受试者的相应肠道微生物的相对丰度。

如本文各处所述，本发明旨在使有别于相应正常受试者的相应指标
10 的指标向相应正常受试者的相应指标的方向调节，以使被调节的指标接
近或达到相应正常受试者的相应指标。该调节适用于本文所述待调节或
已调节的各种指标。显然，达到相应正常受试者的相应指标是理想的，
但接近相应正常受试者的相应指标也是期望的。因此，本发明旨在使其中
15 一种或多种指标有待调节的个体的一种或多种指标接近或达到相应正
常受试者的相应指标。如本文所用，术语“接近或达到”是指调节前的指
标与相应正常受试者的相应指标之间的差异在调节后相对于该差异缩小
大于或等于约 0、1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、
15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30、
31、32、33、34、35、36、37、38、39、40、41、42、43、44、45、46、
20 47、48、49、50、51、52、53、54、55、56、57、58、59、60、61、62、
63、64、65、66、67、68、69、70、71、72、73、74、75、76、77、78、
79、80、81、82、83、84、85、86、87、88、89、90、91、92、93、94、
95、96、97、98、99、100%，或者任意前述值作为端点构成的范围或其
中的任意值，例如约 7%至约 28%等或约 7%、14%、21%、28%等。调
25 节前的指标与相应正常受试者的相应指标之间的差异在调节后相对于该
差异缩小约 100%时，调节后的指标即达到相应正常受试者的相应指标。
本领域技术人员理解，具体差值将取决于，例如，调节对象、指标类型、
测量方法等等。

能够使其中一种或多种指标有待调节的个体的一种或多种指标接近
30 或达到相应正常受试者的相应指标的试剂是治疗期望的。这样的试剂的
选择可以是，例如，基于与作为阳性对照的试剂（例如 OM1）进行比较。
优选地，选择与作为阳性对照的试剂（例如 OM1）基本上一致地调节相
关指标的测试试剂。

另一方面，其中一种或多种指标有待调节的个体的一种或多种指标
35 与参比指标（例如，用于诊断阿尔茨海默病或用于识别阿尔茨海默病患

者中的糖类药物敏感性患者的参比指标)基本上一致可以指示所述个体处于患有阿尔茨海默病的风险中或者患有阿尔茨海默病。

如本文所用,术语“基本上一致”是指将测试指标标准化至参比指标(即参比指标作为 100%),测试指标与参比指标相差小于或等于约 0、1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30、31、32、33、34、35、36、37、38、39、40、41、42、43、44、45、46、47、48、49、50、51、52、53、54、55、56、57、58、59、60、61、62、63、64、65、66、67、68、69、70、71、72、73、74、75、76、77、78、79、80、81、82、83、84、85、86、87、88、89、90、91、92、93、94、95、96、97、98、99、100%,或者任意前述值作为端点构成的范围或其中的任意值,例如约 7%至约 28%等或约 7%、14%、21%、28%等。本领域技术人员理解,具体差值将取决于,例如,调节对象、指标类型、测量方法等等。

在一些实施方式中,用于调节肠道微生物的相对丰度的试剂包含肠道微生物复合物。在一些实施方式中,所述肠道微生物复合物包含来源于粪便材料或菌库的微生物。在一些实施方式中,所述粪便材料来源于正常受试者或阿尔茨海默病患者。

菌库的定义:为了得到每个 OTU 对应的物种分类信息,采用 RDP classifier 贝叶斯算法对 97%相似水平的 OTU 代表序列进行分类学分析,并分别在各个分类水平:domain(域),kingdom(界),phylum(门),class(纲),order(目),family(科),genus(属),species(种)统计各样本的群落组成。用于菌群 16S 分析的物种分类数据库比对数据库使用 silva132/16S:silva132/16S(<http://www.arb-silva.de>)。

代谢物参与

发明人发现,肠道微生物的一些代谢物如氨基酸参与本发明所研究的 AD 脑-肠轴。这些氨基酸可以是,例如,选自下表中的一种或多种;优选是选自苯丙氨酸、异亮氨酸、血清素、组氨酸和乙酰鸟氨酸中的一种或多种;更优选是苯丙氨酸和/或异亮氨酸;最优选是苯丙氨酸。

4-OH Proline	4-OH 脯氨酸
Acetylornithine	乙酰鸟氨酸
Alanine	丙氨酸
Alpha-Aminoadipic Acid	α -氨基己二酸
Asparagine	天冬酰胺

Aspartic Acid	天冬氨酸
Asymmetric Dimethylarginine	不对称二甲基精氨酸
Beta-Alanine	β -丙氨酸
Carnosine	肌肽
Citrulline	瓜氨酸
Creatinine	肌酐
Gaba	GABA
Glutamic Acid	谷氨酸
Glutamine	谷氨酰胺
Glycine	甘氨酸
Histidine	组氨酸
Hypotaurine	牛磺酸
Isoleucine	异亮氨酸
Kynurenine	犬尿氨酸
Leucine	亮氨酸
Lysine	赖氨酸
Methionine	蛋氨酸
Methionine Sulfoxide	蛋氨酸亚砷
Ornithine	鸟氨酸
Phenylalanine	苯丙氨酸
Pipecolic Acid	哌啶酸
Proline	脯氨酸
Putrescine	腐胺
Pyroglutamic Acid	焦谷氨酸
Serine	丝氨酸
Serotonin	血清素
Taurine	牛磺酸
Threonine	苏氨酸
Tryptophan	色氨酸
Tyrosine	酪氨酸
Valine	缬氨酸

发明人发现多种氨基酸涉及根据本发明的脑-肠轴。如实施例所示，

在 WT 小鼠与 TG 小鼠之间，一些氨基酸的水平发生变化，而在施用例如 OM1 后，这些氨基酸的水平向 WT 小鼠方向恢复。这样的氨基酸构成了氨基酸谱。如前所述，这样的谱可以用于诊断和/或治疗目的。

在一些实施方式中，受试者中选自上表的一种或多种（即 1、2、3、
5 4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、
21、22、23、24、25、26、27、28、29、30、31、32、33、34、35 或 36
种）氨基酸的水平相对于相应正常受试者的相应氨基酸的水平的变化（例
如，上升或下降）指示所述受试者处于患有 AD 的风险中或者患有 AD。
在一个实施方式中，受试者的由上表的氨基酸构成的氨基酸谱中 1、2、
10 3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、
21、22、23、24、25、26、27、28、29、30、31、32、33、34、35、36、
37、38、39、40、41、42、43、44、45、46、47、48、49、50、51、52、
53、54、55、56、57、58、59、60、61、62、63、64、65、66、67、68、
69、70、71、72、73、74、75、76、77、78、79、80、81、82、83、84、
15 85、86、87、88、89、90、91、92、93、94、95、96、97、98、99 或 100%
的种类的氨基酸的水平相对于相应正常受试者的相应氨基酸的水平的变
化（例如，上升或下降）指示所述受试者处于患有 AD 的风险中或者患
有 AD。

在一些实施方式中，患有 AD 的受试者中选自上表的一种或多种（即
20 1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、
19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30、31、32、33、34、
35 或 36 种）氨基酸的水平相对于相应正常受试者的相应氨基酸的水平
朝向所述相应正常受试者的相应氨基酸的水平的变化（例如，上升或下
降）指示所述受试者得到适当的治疗。在一个实施方式中，患有 AD 的
25 受试者的由上表的氨基酸构成的氨基酸谱中 1、2、3、4、5、6、7、8、
9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、
25、26、27、28、29、30、31、32、33、34、35、36、37、38、39、40、
41、42、43、44、45、46、47、48、49、50、51、52、53、54、55、56、
57、58、59、60、61、62、63、64、65、66、67、68、69、70、71、72、
30 73、74、75、76、77、78、79、80、81、82、83、84、85、86、87、88、
89、90、91、92、93、94、95、96、97、98、99 或 100% 的种类的氨基
酸的水平的水平相对于相应正常受试者的相应氨基酸的水平朝向所述相应正常
受试者的相应氨基酸的水平的变化（例如，上升或下降）指示所述受试
者得到适当的治疗。

35 发明人发现受试者中的上表中的一种或多种氨基酸的水平与相应正

常受试者的相应氨基酸水平不一致，这可以归因于受试者的疾病状态。当受试者的氨基酸水平低于相应正常受试者的相应氨基酸水平，所述氨基酸水平旨在被上调。当受试者的氨基酸水平高于相应正常受试者的相应氨基酸水平，所述氨基酸水平旨在被下调。

5 在一些实施方式中，上表中的一种或多种氨基酸低于相应正常受试者的相应氨基酸水平。在一些实施方式中，上表中的一种或多种氨基酸高于相应正常受试者的相应氨基酸水平。在一些实施方式中，上表中的一种或多种氨基酸低于相应正常受试者的相应氨基酸水平，同时另外的一种或多种氨基酸高于相应正常受试者的相应氨基酸水平。上调或下调
10 在一些情况下可以取决于，例如，调节对象、指标类型、测量方法等等。

在一些实施方式中，谷氨酰胺水平低于相应正常受试者的相应氨基酸水平。在一些实施方式中，蛋氨酸水平低于相应正常受试者的相应氨基酸水平。在一些实施方式中，谷氨酰胺和蛋氨酸两者水平低于相应正常受试者的相应氨基酸水平。

15 在一些实施方式中，谷氨酰胺水平高于相应正常受试者的相应氨基酸水平。在一些实施方式中，蛋氨酸水平高于相应正常受试者的相应氨基酸水平。在一些实施方式中，谷氨酰胺和蛋氨酸两者水平高于相应正常受试者的相应氨基酸水平。

在一些实施方式中，苯丙氨酸、异亮氨酸、血清素、组氨酸和乙酰
20 鸟氨酸中的一种、两种、三种、四种或五种的水平高于相应正常受试者的相应氨基酸水平。在一些实施方式中，苯丙氨酸和/或异亮氨酸的水平高于相应正常受试者的相应氨基酸水平。在一些实施方式中，苯丙氨酸的水平高于相应正常受试者的相应氨基酸水平。

在一些实施方式中，谷氨酰胺和蛋氨酸两者的水平低于相应正常受
25 试者的相应氨基酸水平，而 4-OH 脯氨酸、乙酰鸟氨酸、丙氨酸、 α -氨基己二酸、天冬酰胺、天冬氨酸、不对称二甲基精氨酸、 β -丙氨酸、肌肽、瓜氨酸、肌酐、GABA、谷氨酸、甘氨酸、组氨酸、牛磺酸、异亮氨酸、犬尿氨酸、亮氨酸、赖氨酸、蛋氨酸亚砷、鸟氨酸、苯丙氨酸、
30 哌啶酸、脯氨酸、腐胺、焦谷氨酸、丝氨酸、血清素、牛磺酸、苏氨酸、色氨酸、酪氨酸和缬氨酸中的一种或多种的水平高于相应正常受试者的相应氨基酸水平。

在一些实施方式中，4-OH 脯氨酸、乙酰鸟氨酸、丙氨酸、 α -氨基
35 己二酸、天冬酰胺、天冬氨酸、不对称二甲基精氨酸、 β -丙氨酸、肌肽、瓜氨酸、肌酐、GABA、谷氨酸、谷氨酰胺、甘氨酸、组氨酸、牛磺酸、异亮氨酸、犬尿氨酸、亮氨酸、赖氨酸、蛋氨酸、蛋氨酸亚砷、鸟氨酸、

苯丙氨酸、哌啶酸、脯氨酸、腐胺、焦谷氨酸、丝氨酸、血清素、牛磺酸、苏氨酸、色氨酸、酪氨酸和缬氨酸中的一种或多种的水平高于相应正常受试者的相应氨基酸水平。

5 在一些实施方式中，上表中的一种或多种氨基酸被上调。在一些实施方式中，上表中的一种或多种氨基酸被下调。在一些实施方式中，上表中的一种或多种氨基酸被上调，同时另外的一种或多种氨基酸被下调。上调或下调在一些情况下可以取决于，例如，调节对象、指标类型、测量方法等等。

10 在一些实施方式中，谷氨酰胺被上调。在一些实施方式中，蛋氨酸被上调。在一些实施方式中，谷氨酰胺和蛋氨酸两者被上调。

在一些实施方式中，谷氨酰胺被下调。在一些实施方式中，蛋氨酸被下调。在一些实施方式中，谷氨酰胺和蛋氨酸两者被下调。

15 在一些实施方式中，苯丙氨酸、异亮氨酸、血清素、组氨酸和乙酰鸟氨酸中的一种、两种、三种、四种或五种被下调。在一些实施方式中，苯丙氨酸和/或异亮氨酸被下调。在一些实施方式中，苯丙氨酸被下调。

20 在一些实施方式中，谷氨酰胺和蛋氨酸两者被上调，而 4-OH 脯氨酸、乙酰鸟氨酸、丙氨酸、 α -氨基己二酸、天冬酰胺、天冬氨酸、不对称二甲基精氨酸、 β -丙氨酸、肌肽、瓜氨酸、肌酐、GABA、谷氨酸、甘氨酸、组氨酸、牛磺酸、异亮氨酸、犬尿氨酸、亮氨酸、赖氨酸、蛋氨酸亚砷、鸟氨酸、苯丙氨酸、哌啶酸、脯氨酸、腐胺、焦谷氨酸、丝氨酸、血清素、牛磺酸、苏氨酸、色氨酸、酪氨酸和缬氨酸中的一种或多种被下调。

25 在一些实施方式中，4-OH 脯氨酸、乙酰鸟氨酸、丙氨酸、 α -氨基己二酸、天冬酰胺、天冬氨酸、不对称二甲基精氨酸、 β -丙氨酸、肌肽、瓜氨酸、肌酐、GABA、谷氨酸、谷氨酰胺、甘氨酸、组氨酸、牛磺酸、异亮氨酸、犬尿氨酸、亮氨酸、赖氨酸、蛋氨酸、蛋氨酸亚砷、鸟氨酸、苯丙氨酸、哌啶酸、脯氨酸、腐胺、焦谷氨酸、丝氨酸、血清素、牛磺酸、苏氨酸、色氨酸、酪氨酸和缬氨酸中的一种或多种被下调。发明人发现，免疫细胞如初始 T 细胞 (naïve T cell) 或称未分化 T 细胞在一些情况下摄取氨基酸，如所示例的苯丙氨酸和异亮氨酸，例如通过某些转运体，如所示例的 SLC7A5，而被驱动分化成特定类型的 T 细胞，如 Th1 细胞。发明人发现，通过各种手段阻止向 Th1 细胞分化导致 Th1 主导状态，可以治疗 Th1 主导相关疾病。这样的手段包括但不限于降低相关氨基酸的水平，阻止免疫细胞摄取相关氨基酸，等等。

35 SLC7A5 被称为 L 型氨基酸转运蛋白 1 (LAT1)，属于 APC 超家族，

形成通过保守二硫键与糖蛋白 CD98 (SLC3A2) 相互作用的异二聚体氨基酸转运体。CD98 (4F2hc, SLC3A2) 是 II 型糖蛋白, 其作为 LAT1 的伴侣蛋白起作用, 稳定并促进其向质膜的易位。该复合物负责在关键身体区域如胎盘和血脑屏障中摄取必需氨基酸。底物包括一系列大的中性氨基酸, 如酪氨酸, 亮氨酸, 异亮氨酸, 缬氨酸和苯丙氨酸, 以及包括 L-DOPA 和加巴喷丁的药物。

可以通过用各种试剂 (例如酶) 降解氨基酸来降低相关氨基酸的水平, 进而减少初始 T 细胞分化成 Th1 细胞。下表所示的酶可以用于降解相关氨基酸, 如苯丙氨酸和异亮氨酸。所示酶可以通过各种手段递送到受试者的相关部分, 例如肠道或外周循环 (如外周血), 以起到降解氨基酸的作用。例如, 所示酶可以通过将表达所示酶的微生物 (例如, 大肠杆菌) 递送到相关部位以在相关部位表达所示酶而递送到相关部位。所述微生物可以表达所示酶中的一种或多种。本领域技术人员理解, 任何可以经过各种递送途径 (例如, 经口) 递送到相关部位而不丧失在相关部位表达所示酶的能力的微生物均可用于递送所示酶。例如, 工程化以表达用于降解苯丙氨酸的酶的大肠杆菌被用作苯丙氨酸降解菌, 通过口服施用于小鼠, 降低了小鼠体内苯丙氨酸含量, 如通过检测粪便中的苯丙氨酸含量所示, 并且降低了 Th1 细胞比例, 如通过检测外周血中的 Th1 细胞比例所示。

20

可用于降解苯丙氨酸的酶

	转化产物	代谢酶
1	酪氨酸 Tyrosine	苯 丙 氨 酸 -4- 羟 化 酶 , Phenylalanine-4-hydroxylase, PAH, 优选的
2	2- 苯 基 - 苯 乙 酰 胺 , 2-Phenyl-acetamide	苯 丙 氨 酸 2- 单 氧 酶 , Phenylalanine 2-monooxygenase, PAO
		过氧化氢酶-过氧化物酶, Catalase-peroxidase, katG
3	苯 基 - 苯 乙 醛 , Phenyl-acetaldehyde	苯 乙 醛 合 成 酶 , Phenylacetaldehyde synthase, PAAS
4	苯 基 - 乙 胺 , Phenyl-ethylamine	芳 族 -L- 氨 基 酸 /L- 色 氨 酸 脱 羧 酶 , Aromatic-L-amino-acid/L-tryptophan decarboxylase, DDC, 优选的
		苯 丙 氨 酸 脱 羧 酶 , Phenylalanine

		decarboxylase, AADC
5	N-酰基-L-苯丙氨酸， N-Acetyl-L-phenylalanine	苯丙氨酸 N-酰基转移酶， Phenylalanine N-acetyltransferase
6	苯丙酮酸盐， Phenylpyruvate	天冬氨酸氨基转移酶， Aspartate aminotransferase, AST，优选的
		酪氨酸氨基转移酶， Tyrosine aminotransferase, TAT，优选的
		L-氨基酸氧化酶， L-Amino-acid oxidase, IL4I1，优选的
		苯丙氨酸脱氢酶， Phenylalanine dehydrogenase
		芳族氨基酸转氨酶 Aromatic-amino-acid transaminase
		组氨醇磷酸盐氨基转移酶， Histidinol-phosphate aminotransferase
		芳族氨基酸氨基转移酶 II， Aromatic amino acid aminotransferase II, AR09
7	D-苯丙氨酸， D-Phenylalanine	苯丙氨酸消旋酶， Phenylalanine racemase
8	反式肉桂酸盐， Trans-Cinnamate	苯丙氨酸氨裂解酶， Phenylalanine ammonia-lyase, PAL
		苯丙氨酸 / 酪氨酸氨裂解酶， Phenylalanine/tyrosine ammonia-lyase, PTAL

可用于降解异亮氨酸的酶

	转化产物	代谢酶
1	(S)-3-甲基-2-氧代戊酸盐， (S)-3-Methyl-2-oxopentanoate	支链氨基酸氨基转移酶， Branched-chain amino acid aminotransferase
		L-氨基酸氧化酶， L-Amino-acid oxidase, IL4I1

可以通过用转运体抑制剂抑制初始 T 细胞借助其摄取相关氨基酸的转运体来阻止免疫细胞摄取相关氨基酸，进而减少初始 T 细胞分化成 Th1 细胞。例如，苯丙氨酸和异亮氨酸共用转运体 SLC7A5。可用于抑制转运体 SLC7A5 的抑制剂包括但不限于本领域已知的 JPH 203、BCH 和 KMH-233。例如，如实施例 4 所示，向小鼠施用 SLC7A5 抑制剂 JPH 203，明显降低小鼠大脑中 Th1 细胞比例。

JPH203 是可获自日本 J-Pharma 的化学合成的低分子量化合物 (http://www.j-pharma.com/b3_e.html)，选择性抑制 LAT1，CAS 号为 1037592-40-7 (<https://www.medkoo.com/products/9544>)。

BCH 是已知的 LAT1 抑制剂，CAS 号为 20448-79-7 (https://www.tocris.com/cn/products/bch_5027)。

KMH-233 是已知的 LAT1 抑制剂，CAS 号为 1941174-13-5 (<https://www.medkoo.com/products/9545>)。

本领域技术人员理解，可用于阻止初始 T 细胞分化成 Th1 细胞的手段不限于此。任何可用于阻止初始 T 细胞受到肠道微生物和/或其代谢物的影响而分化成 Th1 细胞的手段均可用于降低 Th1 比例，缓解或逆转如本文所述的 Th1 主导状态。

发明人发现多种细胞因子涉及根据本发明的脑-肠轴。如实施例所示，在 WT 小鼠与 TG 小鼠之间，一些细胞因子的水平发生变化，而在施用例例如 OM1 后，这些细胞因子的水平向 WT 小鼠方向恢复。这样的细胞因子构成了细胞因子谱。如前所述，这样的谱可以用于诊断和/或治疗目的。

在一些实施方式中，受试者中选自以下的一种或多种（即 1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30 或 31 种）细胞因子的水平相对于相应正常受试者的相应细胞因子的水平的变化（例如，上升或下降）指示所述受试者处于患有 AD 的风险中或者患有 AD：OPG、Resistin、TARC、VEGF、Chemerin、IL-9、MMP-2、VEGF-D、TCA-3、gp130、MMP-10、6Ckine、VEGF-B、IL-22、IL-1a、IFN γ R1、Granzyme B、LIX、CT-1、CD27L、Endoglin、TRANSC、MCSF、4-1BB、Leptin R、CD36、TremL 1、VEGF R2、TGF β 1、IL-3 R β 、H60。在一个实施方式中，受试者的由以下细胞因子构成的细胞因子谱中 1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30、31、32、33、34、35、36、37、38、39、40、41、42、43、44、45、46、47、48、49、50、51、52、53、54、55、56、57、

58、59、60、61、62、63、64、65、66、67、68、69、70、71、72、73、74、75、76、77、78、79、80、81、82、83、84、85、86、87、88、89、90、91、92、93、94、95、96、97、98、99 或 100%的种类的细胞因子的水平相对于相应正常受试者的相应细胞因子的水平的变化（例如，上升或下降）指示所述受试者处于患有 AD 的风险中或者患有 AD：OPG、Resistin、TARC、VEGF、Chemerin、IL-9、MMP-2、VEGF-D、TCA-3、gp130、MMP-10、6Ckine、VEGF-B、IL-22、IL-1a、IFNg R1、Granzyme B、LIX、CT-1、CD27L、Endoglin、TRANCE、MCSF、4-1BB、Leptin R、CD36、TremL 1、VEGF R2、TGFb1、IL-3 Rb、H60。

10 在一些实施方式中，患有 AD 的受试者中选自以下的一种或多种（即 1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30 或 31 种）细胞因子的水平相对于相应正常受试者的相应细胞因子的水平朝向所述相应正常受试者的相应细胞因子的水平的变化（例如，上升或下降）指示所述受试者得到适当的治疗：OPG、Resistin、TARC、VEGF、Chemerin、IL-9、MMP-2、VEGF-D、TCA-3、gp130、MMP-10、6Ckine、VEGF-B、IL-22、IL-1a、IFNg R1、Granzyme B、LIX、CT-1、CD27L、Endoglin、TRANCE、MCSF、4-1BB、Leptin R、CD36、TremL 1、VEGF R2、TGFb1、IL-3 Rb、H60。在一个实施方式中，患有 AD 的受试者的由以下细胞因子构成的细胞因子谱中 1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30、31、32、33、34、35、36、37、38、39、40、41、42、43、44、45、46、47、48、49、50、51、52、53、54、55、56、57、58、59、60、61、62、63、64、65、66、67、68、69、70、71、72、73、74、75、76、77、78、79、80、81、82、83、84、85、86、87、88、89、90、91、92、93、94、95、96、97、98、99 或 100%的种类的细胞因子的水平相对于相应正常受试者的相应细胞因子的水平朝向所述相应正常受试者的相应细胞因子的水平的变化（例如，上升或下降）指示所述受试者得到适当的治疗：OPG、Resistin、TARC、VEGF、Chemerin、IL-9、MMP-2、VEGF-D、TCA-3、gp130、MMP-10、6Ckine、VEGF-B、IL-22、IL-1a、IFNg R1、Granzyme B、LIX、CT-1、CD27L、Endoglin、TRANCE、MCSF、4-1BB、Leptin R、CD36、TremL 1、VEGF R2、TGFb1、IL-3 Rb、H60。

本发明提供可以直接或间接改变肠道微生物的相对丰度至预定水平（如，治疗水平）持续预定时间量（如，直到使用下一剂量）的组合物。所述预定水平可以从导致治疗响应（如，代谢产物减少、淋巴细胞向大

脑浸润减少、小胶质细胞激活减少、神经炎症减轻、认知改善、阿尔茨海默病症状缓解)的所测量的微生物区系的相对丰度而获得。

在一些实施方式中,本发明的方法、试剂或组合物可以包含充分纯化或富集的肠道微生物,使得所述试剂或组合物可以包含按所述试剂或组合物的重量计至少约 5 重量%、10 重量%、20 重量%、30 重量%、40 重量%、50 重量%、60 重量%、70 重量%、80 重量%、85 重量%、90 重量%、95 重量%、99 重量%或更多的期望的肠道微生物,和/或少于约 40 重量%、30 重量%、20 重量%、15 重量%、14 重量%、13 重量%、12 重量%、11 重量%、10 重量%、9 重量%、8 重量%、7 重量%、6 重量%、5 重量%、4 重量%、3 重量%、2 重量%、1 重量%或更少的非期望的肠道微生物。

根据本发明的调节肠道微生物的相对丰度的试剂和组合物可以导致改变的代谢功能。例如,改变的代谢功能可以包括微生物代谢物氨基酸水平调节。

在一些实施方式中,通过检测来自受试者的外周血样品,本发明的方法、试剂和组合物可以使氨基酸水平调节约 5、10、15、20、25、30、35、40、45、50、55、60、65、70、75、80、85、90、95、100、105、110、115、120、125、130、135、140、145、150、155、160、165、170、175、180、185、190、195、200、205、210、215、220、225、230、235、240、245、250、255、260、265、270、275、280、285、290、295、300 μM 或更多,或者任意前述值作为端点构成的范围或其中的任意值;和/或使得所述氨基酸水平接近或达到相应正常受试者的相应氨基酸水平。

在一些实施方式中,通过检测来自受试者的粪便样品,本发明的方法、试剂和组合物可以使所述氨基酸水平调节约 100、200、300、400、500、600、700、800、900、1000、1100、1200、1300、1400、1500、1600、1700、1800、1900、2000、2100、2200、2300、2400、2500、2600、2700、2800、2900、3000 $\mu\text{mol/g}$ 或更多,或者任意前述值作为端点构成的范围或其中的任意值;和/或使得所述氨基酸水平接近或达到相应正常受试者的相应氨基酸水平。

在一些实施方式中,本发明的方法、试剂和组合物可以导致改变的免疫细胞浸润到大脑中。例如,促炎型 Th1 细胞占 CD4^+ T 细胞的比例降低。在一些实施方式中,本发明的试剂和组合物可以使来自受试者的样品中促炎型 Th1 细胞占 CD4^+ T 细胞的比例降低约 1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30、31、32、33、34、35、36、37、38、39、

40、41、42、43、44、45、46、47、48、49、50、51、52、53、54、55、
56、57、58、59、60、61、62、63、64、65、66、67、68、69、70、71、
72、73、74、75、76、77、78、79、80、81、82、83、84、85、86、87、
88、89、90、91、92、93、94、95、96、97、98、99、100%或更多；和
5 /或使得促炎型 Th1 细胞占 CD4⁺ T 细胞的比例接近或达到相应正常受试
者的相应促炎型 Th1 细胞占 CD4⁺ T 细胞的比例。

在一些实施方式中，本发明的方法、试剂和组合物可以使初始 T 细胞对氨基酸的相对摄取水平降低。在一些实施方式中，本发明的试剂和组合物可以使初始 T 细胞对氨基酸的相对摄取水平降低约 5、10、15、
10 20、25、30、35、40、45、50、55、60、65、70、75、80、85、90、95、
100、105、110、115、120、125、130、135、140、145、150、155、160、
165、170、175、180、185、190、195、200、205、210、215、220、225、
230、235、240、245、250、255、260、265、270、275、280、285、290、
295、300 或更多；和/或使得初始 T 细胞对氨基酸的相对摄取水平接近
15 或达到相应正常受试者的相应初始 T 细胞对氨基酸的相对摄取水平。

在一些实施方式中，本发明的方法、试剂和组合物可以导致改变的大脑中小胶质细胞激活。例如，改变的大脑中小胶质细胞激活可以包括使大脑中小胶质细胞激活增加或减少。大脑中小胶质细胞激活可以增加或减少约 1 至 100%，例如约 1%、2%、3%、4%、5%、10%、15%、20%、
20 25%、30%、35%、40%、45%、50%、55%、60%、65%、70%、75%、
80%、85%、90%、95%或 99%或 100%，或者任意前述值作为端点构成的范围或其中的任意值，例如约 7%至约 28%等或约 7%、14%、21%、
28%等。

在一些实施方式中，本发明的方法、试剂和组合物可以导致改变的
25 IBA1 水平。例如，改变的 IBA1 水平可以包括使 IBA1 水平增加或减少。
IBA1 水平可以增加或减少约 0 至约 3000 相对水平，例如约 0、50、100、
150、200、250、300、350、400、450、500、550、600、650、700、750、
800、850、900、950、1000、1050、1100、1150、1200、1250、1300、
1350、1400、1450、1500、1550、1600、1650、1700、1750、1800、1850、
30 1900、1950、2000、2050、2100、2150、2200、2250、2300、2350、2400、
2450、2500、2550、2600、2650、2700、2750、2800、2850、2900、2950、
3000 相对水平，或者任意前述值作为端点构成的范围或其中的任意值，
例如约 500 至约 3000 等或约 500、1000、1500 等。

35 制剂

本发明的试剂或药物组合物可以包含可以调节受试者中的肠道微生物的相对丰度的肠道微生物。肠道微生物可以是存活的（活的）、休眠的、无活性的或死的细菌。本发明的试剂或药物组合物可以包含可以调节受试者中的肠道微生物的相对丰度的化合物或试剂。一种或多种化合物或试剂可以用于改变受试者中的微生物区系。这样的化合物或试剂可以包括但不限于抗生素处理和/或抗菌剂，益生元，如细菌细胞壁成分、细菌核酸（如 DNA 和 RNA）、细菌膜成分和细菌结构成分（如蛋白质、糖类、脂质和它们的组合，如脂蛋白、糖酯和糖蛋白）、有机酸、无机酸、碱、蛋白质和肽、酶和辅酶、氨基酸和核酸、糖、脂质、糖蛋白、脂蛋白、糖酯、维生素、生物活性化合物、包含无机成分的代谢产物、小分子如含氮分子或含亚硫酸的分子、抗性淀粉、马铃薯淀粉或高直链淀粉、改性淀粉（包括羧基化淀粉、乙酰化淀粉、丙酸化淀粉和丁酸化淀粉）、非消化的寡糖，如低聚果糖、低聚葡萄糖、低聚木糖、低聚半乳糖、阿拉伯糖基木聚糖、阿拉伯半乳聚糖、半乳甘露聚糖、聚葡萄糖、低聚果糖、菊糖以及这些的衍生物，但是不排除能够发挥益生元作用的其它寡糖、其它可溶纤维及其组合。糖可以选自单糖、二糖、寡糖、多糖、或其衍生物、或者其和/或其衍生物的组合；优选寡糖和多糖；更优选甘露糖醛酸寡糖。

本发明的试剂或药物组合物还可以包含例如氨基酸、氨基糖、糖醇、蛋白质、糖类、单糖、二糖、寡糖、多糖、核酸、缓冲剂、表面活性剂、脂质、脂质体、其它赋形剂以及它们的混合物。其它有用成分可以包括类固醇、消炎剂、非类固醇抗炎剂、止痛剂、细胞、抗炎剂、生长因子、生长因子片段、小分子创伤愈合刺激剂、激素、细胞因子、肽、抗体、酶、分离的细胞、血小板、免疫抑制剂、核酸、细胞类型、病毒、病毒颗粒、必需营养成分、矿物质、金属或维生素以及它们的组合。此外，本发明的试剂和组合物可以包含稀释剂，如水、盐水或缓冲液。

本发明的试剂或药物组合物可以配制为包括药学可接受的载体的药物组合物。如在本文中所使用的，“药学可接受的载体”包括生理相容的任何和所有溶剂、分散介质、涂层、抗菌剂和抗真菌剂、等渗和吸收延迟剂等等。在一个实施方式中，本发明的试剂或药物组合物可以并入适于递送至受试者的药物组合物中。药物组合物还可以包括药学可接受的载体。如在本文中所使用的，“药学可接受的载体”包括生理相容的任何和所有溶剂、分散介质、涂层、抗菌剂和抗真菌剂、等渗和吸收延迟剂等等。药学可接受的载体的例子包括以下的一种或多种：水、盐水、磷酸盐缓冲盐水、葡萄糖、甘油、乙醇等等，以及它们的组合。在许多情

况下，优选地所述组合物中包括等渗剂，如糖，多元醇如甘露醇、山梨醇或氯化钠。

5 药物组合物可以被配制成多种形式。这些包括，例如，液体、半固体和固体制剂形式，如液体溶液（如可注射和可输注溶液）、分散液或悬浮液、片剂、丸剂、粉末、脂质体、栓剂和其它制剂。药物组合物可以被配制用于高药物浓度。药物组合物进一步可以是在操作和储存条件下为无菌和稳定的。可以通过将其与上述列举的一种成分或其组合（如所需要的）并入需要量的合适溶剂中，随后进行过滤除菌来制备无菌注射溶液。

10 药物组合物的示例性形式可以取决于预期的递送模式和治疗应用。在一个实施方式中，药物组合物被配制用于口服递送。一些组合物可以是基于药丸的递送（如在 2010 年 10 月 22 日提交的、名称为“pill catcher”的美国专利申请号 12/976,648 中所公开的）以及延释方法的形式。在一个实施方式中，基于药丸的递送可以是使得递送发生在肠道内的精确位置的系统的一部分。在另一实施方式中，药物组合物可以被配制成延释制剂。在另一实施方式中，药物组合物可以被包封在包衣中，其直到离开病患的胃才开始降解。在另一实施方式中，药物组合物可以与保护所述组合物避免快速释放的载体一起制备，如缓释或控释制剂，包括植入物、透皮贴剂和微包封递送系统。可以使用可生物降解的、生物相容的聚合物，如乙烯-醋酸乙烯酯、聚酐、聚乙醇酸、胶原蛋白、聚原酸酯和聚乳酸。用于制备这种制剂的许多方法已经被授予专利权或是本领域技术人员公知的。见，如，*Sustained and Controlled Release Drug Delivery Systems*, J.R. Robinson, ed., Marcel Dekker, Inc., 纽约，1978。“缓释”指的是相对于通过组合物的常规制剂的递送所实现的释放，所述组合物或其活性化合物在延长的时间期间内释放。

15 20 25

另一类型的药物组合物包括可激活的形式，如用处于休眠或非活性状态（如，冻干状态）的微生物区系配制所述组合物。在组合的组合物中，所述微生物区系可以是处于休眠或非活性状态，或者培育微生物区系的化合物或试剂可以是非活性的。在一个示例的实施方式中，药物组合物可以被配制为包含至少一种休眠或非活性微生物区系以及培育微生物区系的非活性化合物或试剂。

30

所公开的药物组合物和组合的药物组合物也可以被配制成食品、饮料、膳食补充剂和/或添加剂。这样的组合物是适于人和/或动物消费的那些。本领域技术人员可以容易地知道可以用在口服或可摄取制剂中并被认为适于人和/或动物施用的微生物区系的特定制剂。许多组合物被用

35

于制造食品或食品添加剂/补充剂；因此，另一重要方面是提供包括微生物区系的人或动物食品或食品添加剂/补充剂以调节受试者的肠道微生物。

可消费的组合物可以被配制成包括甜味剂、稳定剂或粘合剂、湿润剂 5 剂和/或天然和/或人工调味剂。所述组合物还可以包括天然和/或人工着色剂和防腐剂。在一种实施中，所述组合物可以包括单糖、二糖和多糖，例如但不限于，蔗糖（糖）、右旋糖、麦芽糖、糊精、木糖、核糖、葡萄糖、甘露糖、半乳糖、舒可慢（sucromalt）、果糖（左旋糖）、转化糖、玉米糖浆、麦芽糊精、低聚果糖糖浆、部分水解淀粉、玉米糖浆固 10 形物、聚葡萄糖、可溶性纤维、不溶性纤维、天然蔗汁、明胶、柠檬酸、乳酸、天然色素、天然调味剂、分馏椰子油、巴西棕榈蜡或它们的组合。

剂量

本发明的试剂或组合物可以包含“治疗有效量”或“有效量”的成分。 15 “治疗有效量”指在需要的剂量下及时间段内，有效实现期望的治疗结果的量。试剂或药物组合物的治疗有效量可以根据多种因素（如个体的疾病状态、年龄、性别和大脑以及所述组合物在个体中引起期望的响应的能力）而变化。治疗有效量也是其中试剂或药物组合物的治疗有益效果超越所述试剂或药物组合物的毒性或有害作用的量。在一个示例的实施 20 方式中，试剂或药物组合物的治疗有效量是其中提高一种或多种肠道微生物的相对丰度的量。例如，治疗有效量的用于调节肠道微生物的相对丰度的试剂提高了受试者中的一种或多种肠道微生物的相对丰度。

如本文所用，术语“治疗”一般是指获得需要的药理和/或生理效应。该效应根据完全或部分地预防疾病或其症状，可以是预防性的；和/或根 25 据部分或完全稳定或治愈疾病和/或由于疾病产生的副作用，可以是治疗性的。本文使用的“治疗”涵盖了对患者疾病的任何治疗，包括：（a）预防易感染疾病或症状但还没诊断出患病的患者所发生的疾病或症状；（b）抑制疾病的症状，如抑制疾病进展，阻止疾病发展；或（c）缓解疾病的症状，即，导致疾病或症状退化。

30

适应症

通过本发明的研究，发明人发现异常肠道微生物模式导致初始 T 细胞过度分化成 Th1 细胞，外周血中 Th1 细胞水平异常上升。上升的外周 Th1 细胞水平导致更多的 Th1 细胞浸润到大脑中，引发疾病如阿尔茨海 35 默病。通过恢复肠道微生物区系，可以减少初始 T 细胞分化成 Th1 细胞，

降低外周血中异常上升的 Th1 细胞水平，由此治疗疾病。因此，本发明提供了治疗受试者的高外周血 Th1 细胞水平相关疾病的方法，其包括在受试者中如本文所述调节肠道微生物的相对丰度、如本文所述降低外周血中的氨基酸水平或如本文所述抑制外周血中初始 T 细胞摄取氨基酸。

5 本文所述术语“Th1 主导”与“Th1 细胞主导”可互换使用。在一些情况下，Th1 主导可以用高外周血 Th1 细胞水平来代表。高外周血 Th1 细胞水平可以是指受试者中的外周血 Th1 细胞水平与适合的对照（例如正常对照，如正常人类群体）相比高 1%、2%、3%、4%、5%、10%、15%、20%、25%、30%、35%、40%、45%、50%、55%、60%、65%、70%、
10 75%、80%、85%、90%、95%、100%、150%、200%、250%、300%、350%、400%、450%、500%、550%、600%、650%、700%、750%、800%、850%、900%、950%、1000%或更多，或者任意前述值作为端点构成的范围或其中的任意值，例如约 7%至约 28%等或约 7%、14%、21%、28%等。这样的疾病包括，但不限于，多发性硬化（Multiple Sclerosis）、克
15 罗恩病（Crohn's Disease）、I 型糖尿病（Type 1 Diabetes）、类风湿性关节炎（Rheumatoid Arthritis）；还包括桥本氏甲状腺炎（Hashimoto's thyroiditis）、白癜风（Vitiligo）、干燥综合征（Sjögren's Syndrome）、多囊性卵巢症候群（Polycystic ovarian syndrome, PCOS）、脂泄病（Celiac Disease）、格雷夫氏病（Graves's disease）。

20 如本文所用，术语“受试者”是指任何活的生物体，包括但不限于，人，非人灵长目动物如黑猩猩和其它猿类和猴类，农畜如牛、绵羊、猪、山羊和马，驯养哺乳动物如狗和猫，实验室动物，包括啮齿类动物如小鼠、大鼠、兔子和豚鼠，等。该术语并不指明特定年龄和性别。在一个实施方式中，受试者是人。在本发明的上下文中，术语“受试者”、“个体”
25 和“患者”可互换使用。

在一个实施方式中，受试者中的肠道微生物中的一种或多种的相对丰度高于正常受试者。在一个实施方式中，受试者中的肠道微生物中的一种或多种的相对丰度低于正常受试者。在一个实施方式中，受试者中的肠道微生物中的一种或多种的相对丰度高于正常受试者，且另外一种
30 或多种的相对丰都低于受试者。

剂量可以取决于本发明的试剂或药物组合物中存在的微生物区系的类型。剂量还可以根据受试者中存在的一种或多种微生物区系的相对丰度决定。

35 在一种实施方式中，本发明的试剂或药物组合物可以有效改变一种或多种微生物区系的相对丰度。在另一种实施方式中，试剂或药物组合

物可以有效提高或降低受试者中的微生物区系的相对丰度。在一种实施方式中，试剂或药物组合物可以提高或降低受试者中的微生物区系的特定微生物的相对丰度，且降低受试者中的微生物区系的另外的特定微生物的相对丰度。

5 在另一实施方式中，本发明的试剂或药物组合物还可以有效改变受试者中的微生物区系，以使得在施用试剂或药物组合物后，受试者中的微生物区系模拟响应于阿尔兹海默治疗过程的受试者中存在的微生物区系。试剂或药物组合物可以有效改变微生物区系以模拟具有相似大脑、年龄、性别、种族等的正常、健康受试者的微生物区系。

10 可以调整给药方案以提供最适宜的期望反应（如治疗反应或预防反应）。例如，可以递送单一大丸剂，可以随时间递送多个分开的剂量或者所述剂量可以如治疗情况的紧急性所指示的按比例地减少或增加。特别有利的是配制单位剂型的肠胃外组合物以便于剂量的递送和均匀性。如在本文中所使用的单位剂型指的是适于作为用于待治疗的哺乳动物受
15 试者的单一剂量的物理离散单元；每一单元包含与需要的药学载体结合的经计算以产生期望的治疗效果的预定量的活性化合物。用于本发明的单位剂型的规格由下述内容规定或直接取决于下述内容：（a）活性化合物的独特性质和将要实现的具体治疗效果或预防效果，和（b）组合这种活性化合物用于个体治疗的领域中固有的限制。

20 当应用于本发明提供的方法时，本发明的试剂或药物组合物的示例剂量范围可以是每天约 0.001 至约 100 mg/kg 体重，每天约 0.01 至约 50 mg/kg 体重，如每天约 0.05 至约 10 mg/kg 体重，以一个或多个剂量递送，如 1-3 个剂量。准确的剂量将取决于递送的频率和模式、被治疗的受试者的性别、年龄、体重和一般状况，被治疗的状况的性质和严重性，将
25 治疗的任何合并症和本领域技术人员已知的其它因素。

 在一个实施方式中，本发明的试剂或药物组合物包括总浓度在约 0.001 mg/kg 至约 100 mg/kg 的范围中的微生物区系，如疣微菌门。在另一实施方式中，试剂或药物组合物包括总浓度在约 0.1 mg/kg 至约 50 mg/kg 的范围中的微生物区系，如疣微菌门。在再另一实施方式中，试剂或药物组合物包括总浓度在约 1 mg/kg 至约 10 mg/kg 的范围中的微生物区系，如疣微菌门。
30

 在一些方面，本文所述的试剂、组合物或试剂盒以按受试者重量计的剂量施用。在一些实施方式中，本文所述的试剂、组合物或试剂盒包含按受试者重量计的量的本文提到的一种或多种试剂。

35 在一些实施方式中，按受试者重量计，本文所述的试剂、组合物或

试剂盒中的本文提到的一种或多种试剂各自的量在约 1.0 至约 50.0 mg/kg 或更高，优选约 5.0 至 40.0 mg/kg，更优选约 10.0 至 30.0 mg/kg 的范围中。在一些实施方式中，按受试者重量计，本文所述的试剂、组合物或试剂盒中的本文提到的一种或多种试剂各自量为约 1.0、1.5、2.0、
5 2.5、3.0、3.5、4.0、4.5、5.0、5.5、6.0、6.5、7.0、7.5、8.0、8.5、9.0、9.5、10.0、10.5、11.0、11.5、12.0、12.5、13.0、13.5、14.0、14.5、15.0、15.5、16.0、16.5、17.0、17.5、18.0、18.5、19.0、19.5、20.0、20.5、21.0、21.5、22.0、22.5、23.0、23.5、24.0、24.5、25.0、25.5、26.0、26.5、27.0、27.5、28.0、28.5、29.0、29.5、30.0、30.5、31.0、31.5、32.0、32.5、33.0、
10 33.5、34.0、34.5、35.0、35.5、36.0、36.5、37.0、37.5、38.0、38.5、39.0、39.5、40.0、40.5、41.0、41.5、42.0、42.5、43.0、43.5、44.0、44.5、45.0、45.5、46.0、46.5、47.0、47.5、48.0、48.5、49.0、49.5、50.0 mg/kg 或更高，或者任意前述值作为端点构成的范围或其中的任意值，例如约 1.1 至 1.4 mg/kg 等或约 1.1、1.2、1.3、1.4 mg/kg 等。

15 在另一些方面，本文所述的试剂、组合物或试剂盒以固定剂量施用。在一些实施方式中，本文所述的试剂、组合物或试剂盒包含固定量的本文提到的一种或多种试剂。

在一些实施方式中，本文所述的试剂、组合物或试剂盒中的本文提到的一种或多种试剂的量各自独立地是约 1、2、3、4、5、6、7、8、9、
20 10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30、31、32、33、34、35、36、37、38、39、40、41、42、43、44、45、46、47、48、49、50、55、60、65、70、75、80、85、90、95、100、105、110、115、120、125、130、135、140、145、150、155、160、165、170、175、180、185、190、195、200 mg 或更高，或者任意前述值作为端点构成的范围或其中的任意值，例如约 1.1 至 1.4 mg
25 等或约 1.1、1.2、1.3、1.4 mg 等。

在又一些方面，本文所述的试剂、组合物或试剂盒中的部分组分以如上所述的按受试者重量计的剂量施用，而其他组分以如上所述的固定剂量施用。在一些实施方式中，本文所述的试剂、组合物或试剂盒中的
30 部分组分的量是如上所述的以受试者重量计的量，而其他组分是如上所述的固定量。

递送

可以通过本领域已知的多种方法递送或施用本发明的试剂或药物组
35 合物。术语“递送”、“递送至”、“施用”和“施用于”在本文中可互换使用。

如本领域技术人员所意识到的，递送的途径和/或模式将根据期望的结果变化。在一个实施方式中，本发明的试剂或药物组合物是经口递送。在另一实施方式中，本发明的试剂或药物组合物是口服递送。在另一实施方式中，本发明的试剂或药物组合物是经鼻递送。递送的再另一模式可以包括递送至肠的方法和组合。

本发明的试剂或药物组合物可以被递送至受试者内的靶区域和/或结构。在肠道内可以被靶向的区域可以包括但不限于，胃、胆胰支(limb)、Roux 支、共用支、回肠、盲肠或结肠。可以靶向于构成具有特定 pH 范围、温度、湿度和代谢产物内含物的分化生态区位的结构。与改变的微生物区系谱相关的疾病或状况可以表现出新微生物的存在、正常微生物的缺乏或者微生物比例的变化。

本发明的试剂或药物组合物的递送可以被靶向于受试者中的一个或多个区域。所述区域可以包括但不限于肠道中的区域。在一个示例的实施方式中，所述递送被靶向于口腔，肠道中的胃、胆胰支、Roux 支、共用支、小肠、回肠、盲肠、大肠或结肠。所述递送还可以靶向于受试者中的一个或多个组织。所述组织可以包括肠道中的任何组织，如胃、胆胰支、Roux 支、共用支、小肠、回肠、盲肠、大肠或结肠。

本发明的试剂或药物组合物中的组分可以各自分开配制，或者其中的部分或全部共同配制。在一个实施方式中，本发明的试剂或药物组合物可以配制成适合于单次或多次施用的试剂或药物组合物。

本发明的试剂或药物组合物中的组分可以各自单独施用，或者其中的部分或全部共同施用。本发明的试剂或药物组合物中的组分可以基本上不同时施用，或者其中的部分或全部基本上同时施用。

本发明的试剂或药物组合物中的组分可以各自独立地以适合的各种途径施用，包括，但不限于，口服或肠胃外（通过静脉内、肌内、局部或皮下途径）。在一些实施方式中，本发明的试剂或药物组合物的组分可以各自独立地口服施用或注射施用，例如静脉注射或腹腔注射。

本发明的试剂或药物组合物中的组分可以各自独立地是适合的剂型，包括，但不限于，片剂、含片、丸剂、胶囊剂（例如硬胶囊、软胶囊、肠溶胶囊、微囊剂）、酞剂、颗粒剂、糖浆剂、注射剂（肌肉内、静脉内、腹腔内）、颗粒剂、乳剂、悬浮液、溶液、分散剂和用于口服或非口服给药的缓释制剂的剂型。

本发明的试剂或药物组合物中的组分可以各自独立地含有药学上可接受的载体和/或赋形剂。

本发明的试剂或药物组合物中的组分可以各自独立地每 1 天、每 2

天、每 3 天、每 4 天、每 5 天、每 6 天，每周、每 2 周、每 3 周或每月或以更低的频率施用。

本发明的试剂或药物组合物中的组分可以各自独立地每天施用 1 次、2 次、3 次、4 次、5 次、6 次、7 次、8 次、9 次或 10 次或更多次。

5 本发明的试剂或药物组合物中的组分可以各自独立地连续 1 天、2 天、3 天、4 天、5 天、6 天、7 天、8 天、9 天、10 天、11 天、12 天、13 天、14 天、15 天、16 天、17 天、18 天、19 天、20 天、21 天、22 天、23 天、24 天、25 天、26 天、27 天、28 天、29 天或 30 天或更久施用。

10 本发明的试剂或药物组合物中的组分中的一种组分可以在另一种组分之前或之后 1 天、2 天、3 天、4 天、5 天、6 天、7 天、8 天、9 天或 10 天或更多天施用。例如，在一个实施方式中，在第 1 天施用本发明的试剂或药物组合物中的组分 1，并在 2 天后（即，第 3 天）施用本发明的试剂或药物组合物中的组分 2，和在又 3 天后（即，第 6 天）施用本
15 发明的试剂或药物组合物中的组分 1。

本发明的试剂或药物组合物的递送也可以重复一次或多次本发明的试剂或药物组合物的重复递送可以是在疾病治疗之前和/或之后的一次或多次。重复递送可以是以与初始递送相似的方式。

本发明的试剂或药物组合物还可以与可以包括治疗剂、预防剂或诊断剂的药剂一起施用，所述治疗剂、预防剂或诊断剂选自小分子，核酸，
20 蛋白质，如多肽的益生元，包括细菌成分（如细菌细胞壁成分（如肽聚糖）、细菌核酸（如 DNA 和 RNA）、细菌膜成分以及细菌结构成分（如蛋白质、碳水化合物、脂质和这些的组合物，如脂蛋白、糖酯和糖蛋白））、细菌代谢产物、有机酸、无机酸、碱、蛋白质和肽、酶和辅酶、氨基酸
25 和核酸、糖类、脂质、糖蛋白、脂蛋白、糖酯、维生素、生物活性化合物、包含无机成分的代谢产物、小分子（例如含氮分子或含亚硫酸的分子）、抗性淀粉、马铃薯淀粉或高直链淀粉、改性淀粉（包括羧基化淀粉、乙酰化淀粉、丙酸化淀粉和丁酸化淀粉）、非消化的寡糖如低聚果糖、低聚葡萄糖、低聚木糖、低聚半乳糖、阿拉伯糖基木聚糖、阿拉伯
30 半乳聚糖、半乳甘露聚糖、聚葡聚糖、低聚果糖、菊糖以及这些的衍生物的益生元，但是不排除能够发挥益生元作用的其它寡糖、其它可溶纤维及其组合。在一个实施方式中，递送的药剂是递送的小分子，所述小分子具有低的口服生物利用度并对宿主肠的微生物区位起作用。低的口服生物利用度在药物中通常是不希望的，因为经肠吸收是大多数口服治疗的
35 目标。

本发明的试剂或药物组合物还可以与上述药剂在同一组合物中施用，或者可以与在本发明的试剂或药物组合物之前、同时和/或之后施用的药剂分别施用。可以在施用药剂之前至少约 1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30、31 天或更多天施用本发明的试剂或药物组合物。还可以在施用药剂之后至少约 1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30、31 天或更多天施用本发明的试剂或药物组合物。可以与施用药剂同时施用本发明的试剂或药物组合物。

10 本发明的试剂或药物组合物还可以由至少部分可植入的系统递送。所述可植入的系统可以是本领域已知和使用的任何系统。所述系统可以包括可编程的泵（如通常用于向糖尿病患者递送胰岛素的那些）。这些部件中的一种或多种可以是模块化的并与可能包括端口、针、贴片等等的经皮递送系统连接。在一个示例的实施方式中，所述可植入的系统包
15 括储库和端口。该储库可能包括用于容纳所述组合物的可再填充或可重装载容器。在另一实施方式中，所述系统可以包括导管。在另一实施方式中，所述可植入系统是经腔导管。所述系统还可以被配置成以规定的剂量和/或规定的间隔递送所述组合物。所述规定的剂量和/或规定的间隔可以由本领域技术人员确定。

20 本发明的一些实施方式通过下文的非限制性实施例说明。

实施例

材料和方法

25 **动物。**将 Tg 小鼠和共同居住的 WT 小鼠（通过交配 Tg 小鼠和 C57 小鼠产生的相应 WT 小鼠）在出生后在同一笼中饲养。将 WT 小鼠（C57）在分开的笼中饲养以避免微生物区系交叉转移。将所有小鼠保持在 23°C 的室内，12 小时（h）光-暗循环。在处理前将小鼠随机分配到不同组。对于 Tg 小鼠的时程分析，在 2、3、5、7 和 9 月龄时处死雄性和雌性 Tg
30 小鼠。收集小鼠大脑并染色用于免疫细胞分析和细胞因子分析。在处死小鼠之前，收集粪便用于肠道微生物区系分析。对于 OM1 处理，在 6.5 月龄的时候，基于 III 期试验中的 450 mg b.i.d.（每天两次），通过口服给药每天一次用 100 mg/kg 剂量的 OM1 处理 Tg 小鼠一个月。进行行为测试以监测最后一次处理后的认知活动。然后将小鼠的大脑和粪便用于
35 不同的分析。对于行为测试，通过辨别学习测试不同月份的 Tg 小鼠和

WT 小鼠以及处理后的小鼠，如先前报道的。在 PhenoTyper (HomeCage) 中发生的所有小鼠运动由计算机化跟踪系统记录，其计算达到 80% 表现标准所需要的进入时间和次数 (Noldus, Ethovision)。对于苯丙氨酸和异亮氨酸腹腔内注射处理，用 50 mg/kg 的苯丙氨酸或异亮氨酸处理 4 月龄的 C57 小鼠 4 天。对于苯丙氨酸和异亮氨酸海马注射，4 月龄的 C57 小鼠以 120 mmol/L 注射 3 μ L 苯丙氨酸或异亮氨酸。10 天后，对这些小鼠进行使用 FACS 的血液样品分析和行为测试。

对于 APP/PS1 小鼠时间点分析，在 3、9 和 14 月龄时处死小鼠和年龄匹配的野生型小鼠。收集小鼠大脑和血液用于不同分析。在处死之前，收集小鼠粪便用于微生物区系分析。对于 APP/PS1 小鼠处理，通过口服强饲每天一次用 50 mg/kg 的 OM1 处理用或未用抗生素处理 3 个月的 6 月龄的小鼠。进行行为测试以监测最后一次处理后的认知活动。动物实验经 Shanghai SIPPR-Bk Lab Animal Co., Ltd 的伦理委员会批准 (编号: 2016002)。

15

粪便样品 DNA 提取和 PCR 扩增。在 DNA 提取和分析之前，将所有粪便样品在 -80°C 下冷冻。根据制造商方案使用 E.Z.N.A.® soil DNA Kit (Omega Biotek, Norcross, GA, U.S.) 从粪便样品提取微生物 DNA。通过 NanoDrop 2000 UV-vis 分光光度计 (Thermo Scientific, Wilmington, USA) 测定最终 DNA 浓度和纯化，并通过 1% 琼脂糖凝胶电泳检查 DNA 质量。通过热循环 PCR 系统 (GeneAmp 9700, ABI, USA) 用引物 338F (5'-ACTCCTACGGGAGGCAGCAG-3') 和 806R (5'-GGACTACHVGGGTWTCTAAT-3') 扩增细菌 16S rRNA 基因的 V3-V4 高变区。使用以下程序进行 PCR 反应: 95°C 下变性 3 分钟 (min), 95°C 下 27 个 30 秒循环, 55°C 下退火 30s, 72°C 下延伸 45s, 72°C 下最终延伸 10 分钟。PCR 反应在含有 4 μ L 5 $\times$ FastPfu Buffer, 2 μ L 2.5 mmol/L dNTP, 0.8 μ L 每种引物 (5 μ mol/L), 0.4 μ L FastPfu Polymerase 和 10 ng 模板 DNA 的 20 μ L 混合物中一式三份进行。从 2% 琼脂糖凝胶中提取所得 PCR 产物，并使用 AxyPrep DNA Gel Extraction Kit (Axygen Biosciences, Union City, CA, USA) 进一步纯化，并根据制造商方案使用 QuantiFluor™-ST (Promega, USA) 定量。简并引物是指代表编码单个氨基酸所有不同碱基可能性的不同序列的混合物。为了增加特异性，可以参考密码子使用表，根据不同生物的碱基使用偏好，减少简并性。核苷酸链中除出现正常的 A、T、G、C 四种碱基符号外还出现如 R、Y、M、K 等其它字母，其中 R=A/G, Y=C/T, M=A/C, K=G/T, S=C/G,

35

W= A/T, H= A/C/T, B= C/G/T, V=A/C/G, D=A/G /T,N=A/C/G/T。

Illumina MiSeq 测序。根据 Majorbio Bio-Pharm Technology Co. Ltd. (中国上海) 的标准方案, 在 Illumina MiSeq 平台 (Illumina, San Diego, USA) 上以等摩尔和成对末端测序 (2×300) 合并纯化的扩增子。

处理测序数据。原始 fastq 文件被多路分解, 通过 Trimmomatic 进行质量过滤, 并基于以下标准通过 FLASH 合并: (i) 读取结果是在 50 bp 滑动窗口上接受平均质量分数<20 的任何位点处截断; (ii) 引物完全匹配, 允许 2 个核苷酸的错配, 并除去含有含糊碱基的读取结果; (iii) 根据其重叠序列合并具有长于 10 bp 的重叠的序列。使用 UPARSE (7.1 版, <http://drive5.com/uparse/>) 对操作分类单位 (OTU) 进行聚类, 相似性截止值为 97%, 并使用 UCHIME 识别和移除嵌合序列。通过 RDP Classifier 算法 (<http://rdp.cme.msu.edu/>) 针对 Silva (SSU123) 16S rRNA 数据库, 使用 70% 的置信度阈值, 分析每个 16S rRNA 基因序列的生物分类。

代谢物样品制备。取出储存在-80°C 的样品并在室温下解冻。将 50 mg 样品用于实验。还加入 400μL 的甲醇-水 (4:1, 体积/体积) 以使用均化器使样品均质化 10 秒。将溶液在冰上超声提取 10 分钟并在-20°C 下保持 30 分钟, 然后在 4°C 以 13000 rpm 离心 15 分钟。200 μL 上清液用于 LC-MS 分析。

LC/MS 分析参数。LC-MS 在 AB Sciex TripleTOF 5600TM 质谱仪系统 (AB SCIEX, USA) 上进行。LC 条件: 柱: Acquity BEH C18 柱 (100 mm×2.1 mm 内直径, 1.7 μm; Waters, Milford, USA)。溶剂: 将柱保持在 40°C 并使用以下梯度实现分离: 5%B-30%B, 0-3 分钟; 30%B-95%B, 3-9 分钟; 95%B-95%B, 9 -13.0 分钟; 95%B-5%B, 13.0-13.1 分钟; 13.1-16 分钟保持在 5%B; 流速为 0.40 mL/min, 其中 B 为 1:1 的乙腈:异丙醇 (0.1% (体积/体积) 甲酸), A 是甲酸水溶液 (0.1% (体积/体积) 甲酸)。注射量为 20 μL。使用 AB Sciex TripleTOF 5600TM 质谱仪系统收集质谱数据, 所述质谱仪系统配备有以正离子或负离子模式操作的电喷雾电离 (ESI) 源, 毛细管电压为 1.0 kV, 样品锥为 40 V, 碰撞能量为 6 eV。源温度设定为 120°C, 去溶剂化气体流量为 45 L/h。从 50 到 1000 m/z 收集质心数据, 分辨率为 30000。

代谢物 QC 样品制备。通过将所有样品的等分试样混合成合并样品来制备 QC 样品，然后使用与分析样品相同的方法进行分析。在整个分析过程中定期（每 10 个样品）注入 QC，以提供可以从其评估重复性的一组数据。

小鼠粪便的上清液诱导的初始 CD4⁺ Th1 和 Th2 的体外分化

使用初始 CD4⁺ T 细胞分离试剂盒（Stem Cell, Cat No. 19765）从 8 月龄的 C57BL/6 雌性小鼠的脾细胞中分离初始 CD4⁺ T 细胞。如过所述制备 7 月龄的小鼠粪便的上清液。将 0.5 mL RPMI-1640 培养基中的总计 0.5×10^6 个细胞/孔接种在 48 孔抗 CD3 和抗 CD38 预涂板中，并向培养基中补充细胞因子和阻断抗体。Th0: 20 ng/mL mIL-2; Th1: 20 ng/mL mIL-2, 10 μ L 上清液, 5000 ng/mL 11B11; Th2: 20 ng/mL mIL-2, 10 μ L 上清液, 5000 ng/mL XMG1.2。将 OM1 加入指定孔中，最终浓度为 100 μ g/mL。在 37°C、5%CO₂ 下培养 5 天后，将细胞在 BD Aria III 细胞计数器上采集，使用 FlowJo 软件分析数据。

免疫组化。对于 3,3'-二氨基联苯胺（DAB）显色染色，根据制造商的 IHC 方案，使用 Leica BOND-RX Autostainer（Leica Microsystems）和 Coverslipper CV5030（Leica Microsystems）对切片进行免疫染色。简而言之，用 Epitope Retrieval solution 2（ER2, AR9640, Leica Biosystems）对切片进行 20 分钟的热诱导表位修复。用 3-4%（体积/体积）过氧化氢（DS9800 的一部分，Leica Biosystems）封闭内源过氧化物酶活性 10 分钟。然后，将切片与封闭缓冲液（在 PBS 中的 10% NGS，具有 0.3% Triton x-100）一起培养 60 分钟。最后，根据制造商的方案使用 Bond Polymer Refine Detection System（DS9800, Leica Biosystems）进行染色。一抗培养时间为 30 分钟。使用兔抗 IBA1 抗体（1:1,000, cat # 019-19741, Wako）针对激活的小胶质细胞来染色切片，使用小鼠抗 Abeta42 抗体（1:1,000; cat # 803003, Biolegend）针对淀粉样蛋白沉积来染色切片，使用小鼠抗 -PHF-Tau & tangles-Thr231 抗体（1:300, cat # MN1040, Thermo Fisher）针对 Tau 磷酸化来染色切片。通过高通量明视野扫描仪（NanoZoomer 2.0HT, Hamamatsu）自动扫描染色的切片，并通过 NDP.scan 3.2 软件（Hamamatsu）获得图像。对于荧光染色，将载玻片在室温下通过封闭缓冲液（在 PBS 中的 10% NGS，具有 0.3% Triton x-100）封闭 1 小时，然后在一抗溶液（Iba-1 1:1,000, Abeta 42 1:1,000, Tau 1:300）中在 4°C

下培养过夜。洗涤后，将载玻片与荧光抗兔或抗小鼠二抗（1:1000，Invitrogen）在室温下培养 60 分钟，并在 PBS 中进一步洗涤 3 次。最后，将载玻片用 DAPI（在 PBS 中 1:10000，Sigma）在室温下复染 5 分钟，洗涤，密封并在 4°C 下储存用于图像采集。使用 Zen 软件（Zeiss），通过直立荧光显微镜 Zmager-m2（Zeiss, Germany）在 10×物镜下获得代表性荧光图像。

神经毒性测试。将 SH-SY5Y 细胞（ATCC, USA）以 5000 个细胞/孔的密度接种到白色聚苯乙烯 96 孔板（Corning Inc., USA）中，并在补充有 10%胎牛血清（FBS），100 单位/mL 青霉素和 100 µg/mL 链霉素的 Dulbecco 改良 Eagle 培养基（DMEM）（Corning Inc., USA）中在加湿培养箱中在 37°C、5%CO₂ 下培养。24 小时后，分别用终浓度为 10 mM，1 mM 和 0.1 mM 的 L-苯丙氨酸或 L-异亮氨酸（Sigma）处理细胞。24 小时后使用 CellTiter-Glo（Promega Inc., USA）检测细胞活力。使用 Cytation5 仪器（BioTek）记录发光信号。

氨基酸检测。制备一组氨基酸标准混合物溶液，浓度范围为 100-2000 µmol/L。将每种标准混合物溶液或血浆样品的 10 µl 部分移液到管的底部，然后加入 70 µl 硼酸钠缓冲液（200 mmol/L，pH8.8）。在加入 20 µl 的 6-氨基喹啉基-N-羟基琥珀酰亚胺基氨基甲酸酯（AQC）（在乙腈中 4 mg/mL）后，封闭管并在 55°C 下加热 10 分钟以形成 AQC-氨基酸。此后，将溶液冷却至室温，并将各个溶液的 2 µl 部分注入 UPLC-ESI-MS 系统用于氨基酸分析，不作进一步纯化。

25 人类受试者

从先导研究（pilot study）收集来自 AD 导致的 MCI 患者和健康对照的血液。AD 导致的 MCI 在针对 AD 导致的 MCI 的 NIA-AA 2011 临床和研究诊断标准中定义。在本研究中，具有 AD 导致的 MCI 的患者必须符合以下标准。首先，关于认知变化的关注。第二，一个或多个认知领域的障碍。第三，保持功能能力的独立性。第四，没有痴呆（针对 AD 导致的 MCI 的 NIA-AA 2011 临床诊断标准）。所有参与者都接受了筛查过程，包括审查他们的病史，身体和神经系统检查，实验室测试，和 MRI 扫描。轻度认知障碍或痴呆的临床评估包括神经心理测试，以及由主治精神病医生进行的行为和精神病学访谈。AD 患者在 Hachinski 缺血量表（Hachinski Ischemia Scale）上记录得分<4，并且没有显示出可能影

- 响大脑功能的显著全身或精神病症或创伤性脑损伤的病史。评估所有参与者的临床痴呆评分（Clinical Dementia Rating, CDR）和蒙特利尔认知评估（Montreal Cognitive Assessment, MoCA）。根据评估结果，发明人保留了 AD 导致的 MCI 受试者，其他被排除，例如在单个非记忆域中有障碍的那些（单个、非记忆域 MCI 亚型）以及在两个或更多个域中有障碍的那些（多域、轻度障碍 MCI 亚型）。正常对照受试者没有认知衰退，神经紊乱，或不受控制的全身性医学紊乱的历史。通过 MRI 流体衰减反转恢复（fluid-attenuated inversion recovery, FLAIR）序列显示，本研究中包括的所有受试者具有不超过两个腔隙缺血（直径<1 cm）。
- 10 第一队列的样本量（图 5h-i）是 9 名 AD 导致的 MCI 患者和 18 名健康受试者。第二队列的样本量（图 5j）是 22 名 AD 导致的 MCI 患者和 22 名健康受试者。MCI 的诊断是基于以下标准，其改编自 Petersen 的 MCI 诊断标准：1）记忆抱怨，优选由配偶或亲属证实；2）客观记忆障碍；3）正常的一般认知功能；4）完整的日常生活活动；5）没有痴呆症。
- 15 上海市精神卫生中心机构审查委员会伦理委员会批准了本研究（编号：2016-22R1）。从受试者和受试者的监护人获得了知情同意书。下面提供了性别、年龄等信息。

第一队列：

类型	样品 ID	年龄	性别
健康	HC-01	75	F
健康	HC-02	71	F
健康	HC-04	69	F
健康	HC-05	73	F
健康	HC-08	63	M
健康	HC-09	62	M
健康	HC-10	68	M
健康	HC-11	61	M
健康	HC-12	68	M
健康	HC-13	75	F
健康	HC-14	70	F
健康	HC-15	68	M
健康	HC-16	62	M
健康	HC-17	75	M

健康	HC-18	65	F
健康	HC-19	64	F
健康	HC-20	64	F
健康	HC-22	63	F
AD 导致的 MCI	MCI-02	61	F
AD 导致的 MCI	MCI-03	79	M
AD 导致的 MCI	MCI-04	71	F
AD 导致的 MCI	MCI-05	72	F
AD 导致的 MCI	MCI-06	80	F
AD 导致的 MCI	MCI-07	65	M
AD 导致的 MCI	MCI-09	61	M
AD 导致的 MCI	MCI-10	69	M
AD 导致的 MCI	MCI-14	77	M

第二队列:

类型	样品 ID	年龄	性别
健康	HC-0149	73	M
健康	HC-0150	70	F
健康	HC-0153	63	F
健康	HC-0156	67	M
健康	HC-0158	71	F
健康	HC-0165	61	F
健康	HC-0168	62	F
健康	HC-0172	70	F
健康	HC-0176	71	F
健康	HC-0187	73	F
健康	HC-0191	65	M
健康	HC-0013	70	F
健康	HC-0043	81	M
健康	HC-0050	64	F
健康	HC-0051	66	M
健康	HC-0056	75	M
健康	HC-0068	67	F
健康	HC-0074	57	F

健康	HC-0076	60	F
健康	HC-0081	71	F
健康	HC-0089	57	F
健康	HC-0090	76	F
AD 导致的 MCI	MCI-0169	65	F
AD 导致的 MCI	MCI-0175	61	F
AD 导致的 MCI	MCI-0211	69	M
AD 导致的 MCI	MCI-0229	65	M
AD 导致的 MCI	MCI-0240	59	F
AD 导致的 MCI	MCI-0244	64	F
AD 导致的 MCI	MCI-0257	61	F
AD 导致的 MCI	MCI-0260	60	F
AD 导致的 MCI	MCI-0282	66	F
AD 导致的 MCI	MCI-0284	64	F
AD 导致的 MCI	MCI-0287	75	F
AD 导致的 MCI	MCI-0303	62	F
AD 导致的 MCI	MCI-0319	63	F
AD 导致的 MCI	MCI-0332	67	F
AD 导致的 MCI	MCI-0374	61	M
AD 导致的 MCI	MCI-0385	68	F
AD 导致的 MCI	MCI-0401	57	F
AD 导致的 MCI	MCI-0414	64	F
AD 导致的 MCI	MCI-0001	75	M
AD 导致的 MCI	MCI-0043	55	F
AD 导致的 MCI	MCI-0061	63	F
AD 导致的 MCI	MCI-0091	78	F

- 5 苯丙氨酸和异亮氨酸诱导的体外分化和增殖。使用初始 CD4⁺ T 细胞分离试剂盒 (Stem Cell, Cat No. 19765) 从 8 月龄的 C57BL/6 雌性小鼠的脾细胞中分离初始 CD4⁺ T 细胞, 并用 CellTrace (Thermo, Cat No. C34557) 染色。将在 0.2 mL RPMI-1640 培养基中的总计 1×10^5 个细胞/孔铺板在 96 孔板中, 并向培养基中补充细胞因子和封闭抗体。Th0: 10 ng/mL mIL-2; Th1: 10 ng/mL mIL-2, 5000 ng/mL 11B11。将苯丙氨酸 (终浓度为 2 mmol/L), 异亮氨酸 (终浓度为 2 mmol/L), OM1 (终浓度为

100 $\mu\text{g/mL}$) 分别加入到指定孔中。在 37°C 、 $5\%\text{CO}_2$ 下培养 5 天后, 在 BD Fortessa 细胞计数器上采集细胞, 使用 FlowJo 软件分析数据。

苯丙氨酸的摄取。使用初始 CD4^+ T 细胞分离试剂盒 (Stem Cell, Cat No. 19765) 从 8 月龄的 C57BL/6 雌性小鼠的脾细胞中分离初始 CD4^+ T 细胞。通过 20 ng/mL IL-12 诱导初始 CD4^+ T 细胞分化为 Th1。3 天后, 将 0.5 mL RPMI-1640 培养基中的总计 5×10^5 个细胞/孔的 Th1 细胞和 Th0 细胞分别铺板到 48 孔板中。将 ^{13}C -标记的苯丙氨酸和 5 mm 氨基转运蛋白抑制剂 BCH 加入指定孔中。0.5 小时后, 收集细胞并用冰冷 D-PBS 洗涤两次。加入 50 μL 去离子水, 通过在 -80°C 下冷冻和解冻两次来裂解细胞。将细胞裂解物以 12000 g 离心 10 分钟, 并通过质谱法分析上清液中的 ^{13}C -标记的苯丙氨酸。

抗生素处理。通过向无菌饮用水中加入含有氨苄青霉素 (0.1 mg/mL , 饮用水中的最终浓度), 链霉素 (0.5 mg/mL , 饮用水中的最终浓度) 和粘菌素 (0.1 mg/mL , 饮用水中的最终浓度) (Sigma-Aldrich) 的抗生素溶液 (ATB) 来处理小鼠。溶液和瓶子更换 3 次, 每周分别一次。通过 16S rRNA 基因测序确认抗生素活性。在 Tg 组中删除相对丰度小于 0.01 的细菌类型。根据实验设置, ATB 处理的持续时间略有不同。在粪便微生物移植实验的背景下, 小鼠在下一天通过使用动物饲养针进行口服强饲而进行粪便微生物移植之前接受 3 天 ATB。

粪便微生物区系移植 (FMT) 实验。通过解冻粪便材料进行 FMT。然后, 通过口服强饲将 200 μL 悬浮液转移到每个经 ATB 预处理的受体中。FMT 在 5 天进行了 3 次。首先用饮用水中的抗生素混合物处理 12 月龄的 C57 小鼠 3 天, 然后通过强饲将 40 mg 悬浮在 PBS 中的混合粪便注入每只小鼠中 3 次, 中间间隔 2 天 ($n=8$)。3 天后, 以 4.2 μg A β 1-40 低聚物将 A β 注射液注入海马的两侧。3 天后处死小鼠用于不同的分析。

生物信息学分析。使用 Kyoto Encyclopedia of Gene Genotype (KEGG) 进行途径分析和生物功能富集分析。使用 R 包“DOSE”, “GO.db”, “GSEABase”和“ClusterProfiler”富集数据。仅表现错误发现率 (FDR) 或 p 值 < 0.05 的途径。使用 R 包“ggcorrplot”进行相关性分析。使用 R 包“igraph”生成相关性马戏团图。使用 R 包“ggalluvial”和 “networkD3”进行细菌流图和 Sankey 图。使用 R 包“Mfuzz”进行趋势的聚

类分析。使用 Majorbio I-Sanger Cloud (www.i-sanger.com) 的在线平台进行其他生物信息学分析。使用 MetaboAnalyst 4.0 进行 ROC 生物标志物分析和随机森林分类。

- 5 **流式细胞仪样品制备和分析。**将小鼠麻醉，将血液样品收集到含 EDTA 的管中，并使用 1×红血液裂解缓冲液除去红细胞。在收集组织之前，用冰冷 PBS 灌注大脑以避免对循环血液免疫细胞进行取样，并且根据成人大脑解离试剂盒 (Miltenyi, Cat No. 130-107-677) 的介绍，使用 gentleMACS 解离器 (Miltenyi Biotec)，将大脑切除、切成碎片并解剖。
- 10 将大脑匀浆过滤经过 70- μ m 细胞过滤器，并在 4°C 下 300 g 离心 5 分钟。将细胞沉淀重悬于冷 PBS 缓冲液中，并在 4°C 下 300 g 再离心 5 分钟。计数所有样品并调节至 $2-3 \times 10^6/100 \mu$ l 的密度，用活/死 (Live/Dead) 试剂盒标记 30 分钟，然后在 4°C 下 500 g 离心 3 分钟。将细胞重悬于 100 μ l PBS 缓冲液中，用抗 CD16/32 (Biolegend, Cat No. 101320) 封闭 10
- 15 分钟，并根据制造商的方案在 4°C 下与抗体一起培养 30 分钟。以下抗体用于 FACS 分析：CD45 (30-F11) -APC-Cy7 (103116, Biolegend)，CD11b (M1/70) -FITC (101205, Biolegend)，CX3CR1 (SA011F11) -PE-Dazzle 594 (149014, Biolegend)，F4/80 (BM8) -BV421 (123132, Biolegend)，CD86 (IT2.2) -PE (305438, Biolegend)，CD206 (15-2)
- 20 -APC (321110, Biolegend)，CD206 (15-2) -BV785 (321142, Biolegend)，CD11c (N418) -PE-Cy7 (117318, Biolegend)，CD8 (53-6.7) -PerCP-Cy5.5 (100734, Biolegend)，Ly-6C (HK1.4) -PE-Dazzle 594 (128044, Biolegend)，Gr-1 (RB6-8C5) -PerCP-Cy5.5 (108428, Biolegend)，B220 (RA3-6B2) -BV421 (103240, Biolegend)，CD19 (6D5) -PE (115508,
- 25 Biolegend)，CD49b (DX5) -PE-Cy7 (108922, Biolegend)，CD4 (GK1.5) -PE-Cy7 (100422, Biolegend)，CD4 (GK1.5) -FITC (100406, Biolegend)，CXCR3 (CXCR3-173) -BV421 (126522, Biolegend)，CCR4 (L291H4) -PE-Cy7 (359410, Biolegend)，CCR6 (29-2L17) -APC (129814, Biolegend)，CD127 (A019D5) -PE (351304, Biolegend)，CD25 (3C7) -PerCP-Cy5.5
- 30 (101912, Biolegend)，Live/Dead (423104, Biolegend)。将细胞加入 500 μ l PBS 缓冲液中，在 4°C 下 500 g 离心 3 分钟，并重悬于 200 μ l 运行缓冲液中。使用相关阴性对照，荧光减一 (Flourescence Minus One, FMO) 对照和各个荧光补偿样品来调节荧光补偿并识别感兴趣的群体。细胞在 BD Aria III 细胞计数器上采集，并使用 FlowJo 软件分析数据。

35

抗体阵列。用包含 200 种蛋白质的基于载玻片的抗体细胞因子阵列 (RayBiotech, GSM-CAA-4000-1) 分析大脑匀浆 (来自 20 mg 组织)。将 100 μ l 样品稀释液加入到每个孔中并在室温下培养 30 分钟。然后, 用另外 100 μ l 样品替换缓冲液, 并在室温下培养 2 小时。弃去样品, 伴随轻轻振摇在室温下用 150 μ l 的 1 $\times$ 洗涤缓冲液 I 洗涤 5 次(每次 5 分钟) 并用 150 μ l 的 1 $\times$ 洗涤缓冲液 II 洗涤 2 次(每次 5 分钟)。向每个孔中加入 80 微升的检测抗体混合物, 并在室温下培养 2 小时。伴随轻轻振摇在室温下将载玻片用 150 μ l 的 1 $\times$ 洗涤缓冲液 I 洗涤 5 次(每次 5 分钟), 然后用 150 μ l 的 1 $\times$ 洗涤缓冲液 II 洗涤 2 次(每次 5 分钟)。向每个孔中加入 80 微升的 Cy3 等价染料-缀合的链霉抗生物素蛋白, 并在室温下培养 1 小时。洗涤 5 次(每次 5 分钟)后, 通过激光扫描仪显现信号。然后通过热图 (www.metaboanalyst.ca) 显现数据。

大脑切片制备。在用戊巴比妥 (100 mg/kg, 腹膜内) 深度麻醉后, 用 0.9% NaCl 经心脏灌注小鼠。快速取出大脑组织, 冷冻并在 -70°C 下储存。使用滑动冷冻切片机 (Leica Microsystems) 产生连续冠状大脑切片 (12 μ m 厚), 固定在载玻片上, 并在室温下空气中干燥过夜。将组织切片储存在 -70°C 或立即使用。

激光显微切割和 Q-PCR 分析。将冷冻的小鼠大脑样品切片并在 PEN 膜载玻片上收集 (Leica, 11600288)。通过激光显微切割显微术 (Leica Microsystems, LMD6) 分离海马。用 RNeasy Micro Kit (Qiagen, 74004) 提取 RNA 并逆转录成 cDNA (Takara, PrimeScript RT Master Mix, RR036A)。使用 ABI 7500 系统通过 SYBR 方法 (Takara, SYBR Premix Ex Taq II) 进行 Q-PCR。使用以下引物: 突触素正向: CAGTTCCGGGTGGTCAAGG ; 突触素反向: ACTCTCCGTCTTGTGTCAC ; 肌动蛋白正向: GCTCTTTTCCAGCCTTCCTT ; 肌动蛋白反向: AGGTCTTTACGGATGTCAACG。

统计分析。在行为测试中, 将动物随机分配到不同的组中。对于两组比较, 采用非配对双尾学生 t 检验。对于超过两组的比较, 进行单因素方差分析或双因素方差分析, 然后进行 Dunnett 检验。所有数据均表示为 mean $\pm$ sem。P<0.05 被认为是统计学显著的。所有数据均在 GraphPad Prism 中分析。对于图像量化, Iba-1 阳性, A β 42 阳性和磷酸化 Tau 阳

性细胞通过使用 ImageJ v1.8.0 分析，具有“area”读出。

行为测试：进行以下行为测试：Morris 水迷宫（Morris water maze, MWM），Y 迷宫和高架十字迷宫（elevated plus maze, EPM）。通过使用摄像机记录所有迹线，并使用软件（Jiliang）计算相关参数。

根据过往发布的方案使用 MWM 测试测量空间学习和记忆。简而言之，小鼠进行 6 天的采集实验，每只小鼠每天进行 3 次试验。将动物在期望的起始位置释放到水中，计时找到平台的潜伏时间。在第 7 天，移除平台，让小鼠游泳 60 秒。使用摄像机记录平台区域穿梭的迹线和次数。

根据文献并进行一些修改，通过 Y 迷宫评估工作记忆。Y 迷宫由三个相同的臂（A, B, C）组成，具有不同的线索。将小鼠置于起始臂（A）中并记录探查的臂的顺序（例如：ABCBA）。使用摄像机记录进臂行为的总次数。Y 迷宫的准确度是正确进臂次数与总进臂次数之间的比率。

EPM 测试广泛用于评估动物的焦虑，由两个张开的臂（30 cm×6 cm），两个闭合的臂（30 cm×6 cm×22 cm）和中心区域（6 cm×6 cm）组成。将每只小鼠置于面向闭合臂的迷宫中心，允许探索迷宫 5 分钟。记录迹线，并计算拜访开放臂的频率，其与小鼠的焦虑呈负相关。

实施例

20

实施例 1. AD 进展与肠道微生物区系改变和免疫细胞浸润相关

为了评估肠道微生物区系改变在 AD 发病机制中的作用，发明人使用 5XFAD 转基因（Tg）小鼠模型，该模型由于发病快，可以很好的模拟 AD 发病的多个病理特征和临床表型而广泛用于 AD 研究，在出生后第 4 个月表现出记忆缺陷，在出生后第 7 个月表现出行为变化，和在出生后第 9 个月表现出神经元丧失。相同品系中且在相同条件下饲养的年龄配对的野生型（WT）小鼠被用作对照。与以前的报道一致，发明人观察到 A β 斑块沉积、Tau 磷酸化、突触素表达和行为等等的变化。具体地，在 Tg 小鼠中，从出生后第 3 个月开始，A β 斑块沉积在皮质和海马中迅速积累（图 7a）。大脑中的 Tau 磷酸化首先在第 5 个月发现，并且随年龄逐渐增加（图 7b）；海马中的突触素表达水平在第 7-9 个月显著下降，指示突触变性（图 1a）。Tg 小鼠中的行为测试显示在 9 月龄时在辨别学习方面显著衰退（图 1b）。注意本发明中 Tg 小鼠的早期（2-3 月）和晚期（7-9 月）与人类临床 AD 的早期和晚期不是相同的概念。Tg 小鼠的晚期在症状上一定程度上相当于人类中 AD 导致的轻度认知障碍（MCI），

因此在本发明中采用具有 AD 导致的 MCI 的患者作为人类研究对象。

在一系列时间点上的进一步 PCA 揭示了 Tg 小鼠中在 AD 进展期间肠道微生物区系模式随时间值得注意的转变，而在 WT 小鼠中几乎没有观察到任何随时间的变化（图 1c；图 7c）。

5 通过研究 OTU 作为 Tg 小鼠中不同细菌门的丰度的动态的跟踪物，发明人在疾病进展期间在 Tg 小鼠中发现两种不同的肠道微生物区系特征（profile）。在 2-3 月龄时，拟杆菌门（*Bacteroidetes*），厚壁菌门（*Firmicutes*）和疣微菌门（*Verrucomicrobia*）是三种最丰富的细菌门（分别为 46.8%，32.3%和 12.6%）。在 7-9 个月阶段，厚壁菌门（*Firmicutes*）
10 变成主要细菌，而拟杆菌门（*Bacteroidetes*）和疣微菌门（*Verrucomicrobia*）的丰度明显降低，指示细菌类型改变（图 1d）。发明人进一步探索了 Tg 小鼠在每个时间点的代表性细菌（图 7d，图 7e）。这些结果表明，Tg 小鼠的肠道微生物区系是高度动态的，与 WT 小鼠的肠道微生物区系形成鲜明对比。类似的结果也在另一个广泛用于 AD 研究的模型：
15 APP/PS1 双转基因小鼠模型中获得（图 7f，图 7g）。

发明人假设，在 AD 进展期间观察到的肠道微生物区系改变可能与神经炎症相关。为了检测这一假设，发明人评估了 Tg 小鼠的炎症状态。小胶质细胞激活的标志——IBA1——在 AD 小鼠大脑切片中的免疫染色揭示了小胶质细胞激活的两个明显阶段，分别在第 3 个月和第 7-9 个月
20 （图 1e）。鉴于小胶质细胞激活可以被分类为两种相反的类型：促炎型——M1 亚型和神经保护型——M2 亚型，发明人还仔细表征了 M1 和 M2 表型。发现在 2-3 月龄的早期阶段，M1 和 M2 小胶质细胞两者均增加。在接下来的几个月中，M1 亚型继续增加，并在第 7-9 个月达到峰值，而 M2 亚型小胶质细胞从第 3 个月下降至第 5 个月，并且此后保持低水平
25 （图 1f）。可见在 Tg 小鼠的 AD 随时间进展中，大脑中的促炎性 M1 小胶质细胞亚型从与神经保护性 M2 小胶质细胞亚型相当（图 1f，2-3 月），变成在小胶质细胞中占主导（图 1f，5-9 月），而且导致小胶质细胞整体激活增加（图 1e，5-9 月）。

除小胶质细胞激活外，已知 AD 相关神经炎症涉及外周免疫细胞浸润。因此，发明人还分析了 AD 进展期间，大脑中的浸润性外周免疫细胞。观察到大脑中的 CD45^{high} 细胞在 Tg 小鼠中显著高于在 WT 小鼠中，类似于 IBA1 染色（图 1g）。在 AD 进展期间的一系列时间点对 CD45^{high} 细胞亚型进行进一步分析，揭示了 CD4⁺ T 细胞的变化，作为 CD45^{high} 细胞的主要亚型，其变化趋势与 IBA1 很接近（图 1h-i）。在发明人检
30 查的时间段中，CD4⁺细胞的两种主要亚型——Th1 和 Th2 细胞——表现
35

出与 M1 和 M2 小胶质细胞相似的动态（图 1j）。可见在 Tg 小鼠的 AD 随时间进展中，Th1 从与 Th2 相当（图 1j，2-3 月），变成在 CD4⁺ T 细胞中占主导（图 1j，5-9 月），而且导致 CD4⁺ T 整体增加（图 1i，5-9 月）。

5 因此，在发明人看来，随着肠道微生物区系模式发生转变，免疫细胞群体变为 Th1 和 M1 占主导的状态，尤其是这些变化在时间上的相关性是引人注目的（图 1d-j）。类似的结果也分别见于 APP/PS1 小鼠模型（图 8、图 7i、图 7j、图 23）。需要指出的是，APP/PS1 小鼠模型和 5XFAD
10 转基因（Tg）小鼠模型在 AD 时间进展上是不同的，Tg 小鼠在 5 月龄就有明显 A β 沉积（图 7a），而 APP/PS1 小鼠在 5 月龄还没有明显 A β 沉积（图 8a），两者的肠道微生物群随时间变化（图 1d、图 7g）也不完全一致，反映了种内、个体间 AD 进展和肠道微生物群差异，但都表现出随时间肠道微生物模式变化与免疫细胞变化之间的相关性。

发明人还分析了 Tg 小鼠中肠道微生物区系的丰度与大脑免疫细胞
15 之间的关联。注意到早期（2-3 个月）的细菌组成与大脑中的 M2 和 Th2 细胞计数高度相关（图 1k，上图），而在晚期（7-9 个月），细菌模式变化与 M1 和 Th1 细胞高度相关（图 1k，下图）。与免疫细胞显著相关的细菌列于图 1k 的右侧小图中，再次验证了上文中肠道微生物区系模式与免疫细胞尤其是 Th1 和 M1 之间的相关性。

20 总体而言，这些结果表明 AD 进展期间，肠道细菌与外周免疫细胞浸润和神经炎症发生相关，这在下文中作进一步研究。

实施例 2. 肠道微生物区系变化导致大脑中 Th1 细胞过度浸润和 M1 小胶质细胞过度激活

25 为了确定 AD 进展中是否需要肠道微生物区系来驱动外周免疫细胞浸润和进而神经炎症，发明人使用含有氨苄青霉素（0.1 mg/mL）、链霉素（0.5 mg/mL）和粘菌素（0.1 mg/mL）的抗生素混合物施用于晚期（7 月龄）Tg 小鼠以消融肠道微生物区系。抗生素处理在晚期（7 月龄）Tg 小鼠中导致肠道中微生物多样性和丰度两者在属水平上明显降低（图
30 2a）。

伴随这种变化，发明人观察到大脑中浸润的促炎型 Th1 细胞（图 2b）和 M1 细胞的比例（图 2c）减少。这初步证明，通过干预 AD 小鼠的肠道微生物分布，可以改变晚期 AD 小鼠中的 Th1 和 M1 占主导的状态，指示了肠道微生物变化与免疫细胞变化之间的因果关系。

35 这一发现进一步通过共同居住实验得到证实。WT 小鼠与相同年龄

的 Tg 小鼠在出生后共同居住 7 个月。共同居住的 WT 小鼠表现出在辨别学习方面的衰退，与 Tg 小鼠相似（图 9a）。究其原因，对这些 7 月龄小鼠中的肠道微生物区系变化的分析表明，在共同居住的 WT 小鼠与晚期（7 月龄）Tg 小鼠之间的肠道微生物区系组成非常相似，而与分开居住的相同年龄的 WT 小鼠的肠道微生物区系组成显著不同（图 2d），指示 WT 小鼠长期暴露于 Tg 细菌（即 Tg 小鼠的 AD 肠道微生物模式）导致 WT 小鼠的肠道微生物区系组成朝向 Tg 小鼠的方向转变，同时导致认知障碍。这提出了不同于常规方案的构建 AD 模型的策略，即通过调控 WT 模型的肠道微生物模式向 AD 模式转变。

同时，浸润性 Th1 细胞计数在共同居住的 WT 与 Tg 小鼠之间也是相似的，两者都显著高于分开居住的 WT 小鼠的浸润性 Th1 细胞计数（图 2e）。同时，M1 细胞在共同居住的 WT 小鼠中升高（图 2f）。与免疫细胞变化一致，大脑中细胞因子表达在共同居住的 WT 与 Tg 小鼠之间显示出明显的相似性，而不同于 WT 小鼠的大脑中细胞因子表达（图 2g）。

因此，上述内容证实了通过使 WT 小鼠的肠道微生物区系向 Tg 小鼠的肠道微生物区系转变，导致 WT 小鼠的 Th1 和 M1 细胞转变成与 Tg 小鼠类似的状态，进而导致类似的认知障碍，再次验证了肠道微生物变化与免疫细胞变化之间，以及进而与认知之间的因果关系。

进一步地，发明人采用 C57BL/6WT 小鼠构建模型来展示上述路径的治疗价值。发明人使用 C57BL/6WT 小鼠进行粪菌移植（FMT）实验，结果如图 16 第 6 至 10 柱所示。

对 C57BL/6WT 小鼠进行抗生素处理，以为后续粪菌移植提供初始环境，向其海马注射聚集的 A β ，然后口服施用来自 7 至 9 个月的 Tg 小鼠的粪菌（“受体_C57_接收 TG 粪菌”），或者来自 WT 小鼠的粪菌（“受体_C57_接收 WT 粪菌”）作为对照，导致与对照相比大脑中 Th1 细胞明显增加，Th2 细胞明显减少（图 9b），这与上文中 Tg 小鼠的变化一致。证明通过移植 Tg 的粪菌，可导致 WT 小鼠肠道微生物模式转变，导致免疫细胞模式也一并转变。

在另一方面，在相反方向上，向 Tg 小鼠移植来自 WT 小鼠的、含有正常肠道微生物分布模式的粪便，减少了受体 Tg 小鼠中的大脑 Th1 细胞（图 9c）。证明使 Tg 小鼠的肠道微生物模式向 WT 小鼠的肠道微生物模式转变，导致免疫细胞模式也一并转变。

这些结果再次验证了 AD 进展中，肠道微生物区系变化与大脑免疫细胞（特别是 Th1/M1）变化和进而认知之间的因果关系。提出并验证了利用该脑-肠轴来治疗 AD 的策略。

总的来说，这些发现证实，在 AD 进展中，肠道微生物区系变化驱动了外周免疫细胞浸润和神经炎症激活，而通过向肠道微生物分布表现为疾病模式的 Tg 小鼠施用用于调节肠道微生物的相对丰度的试剂，例如所示例的含有正常肠道微生物分布模式的 WT 粪便或者下文示例的 OM1，使 Tg 小鼠的肠道微生物分布朝向早期和正常肠道微生物分布恢复，有效逆转了 Tg 小鼠中 Th1/M1 主导的免疫细胞模式，由此改善认知，治疗 AD。这为进一步在人类 AD 患者中通过恢复肠道微生物分布，例如采用用于调节肠道微生物的相对丰度的试剂，以逆转免疫细胞模式，由此改善认知，治疗 AD 的策略；以及为采用肠道微生物分布和/或免疫细胞状态（例如，Th1 状态（例如在总体中的占比）、M1 状态（例如在总体中的占比））作为 AD 进展的标志物，提供了坚实的基础和确凿的证据。

实施例 3. OM1 通过调节肠道微生物区系而减轻神经炎症

本发明揭示的肠道微生物区系在 AD 进展中的关键角色启示了对肠道微生物区系进行干预的治疗意义。为了再次进行验证，发明人利用了 OM1，其是从褐藻中提取的经过临床验证的抗 AD 药物。OM1 是酸性线性寡糖的混合物，其聚合度范围为二聚体至十聚体，平均分子量为约 1 kDa（图 3a）。

在用 OM1 治疗 3 个月的 9 月龄至 12 月龄的晚期 AD 模型 APP/PS1 小鼠中，OM1 对认知障碍表现出显著的改善效果，如 APP/PS1 小鼠在 Morris Water Maze (MWZ) 任务中的训练试验（图 3b）和探索试验（图 3c）两者中的增强的空间学习和记忆表现所示。OM1 还显著改善了小鼠在 Y 迷宫中的表现（图 3d）。最近，在中国进行的 36 周多中心、随机、双盲、安慰剂对照的 III 期临床试验（临床实验代号：CTR20140274）中，OM1 已经展示了其在改善人类 AD 患者的认知障碍方面的治疗效果。发明人有兴趣了解 OM1 是否是通过影响 AD 患者的肠道微生物区系而发挥认知改善作用。

有趣的是，在晚期 Tg 小鼠中从 7 月龄开始口服施用一个月 OM1 明显改变了肠道微生物区系组成（图 4a-b；图 10a），明显恢复成向 WT 模式靠拢（图 13-14；图 16）。

与肠道微生物区系变化一致，OM1 治疗在 Tg 小鼠中破坏了大脑淋巴细胞计数与肠道细菌变化之间的相关性（图 4c；图 10b 和 c），减少了 Th1 细胞（图 4d），将小胶质细胞激活降低至与 WT 小鼠相似的水平（图 4e），并且降低了大脑细胞因子水平（图 4f），使得向 WT 模式靠

扰（图 15）。并行地，OM1 治疗显著降低了见于 Tg 小鼠中的 A β 斑块沉积、tau 磷酸化和辨别学习衰退（图 4g-i）。再次验证了通过恢复肠道微生物分布，例如采用用于调节肠道微生物的相对丰度的试剂，以逆转免疫细胞模式，由此改善认知，治疗 AD 的策略。

5 此外，发明人从经 OM1 处理的 Tg 小鼠获得粪便，将其通过粪便微生物区系移植（FTM）而移植至心室内注射聚集的 A β 的受体 C57BL/6 WT 小鼠。与获自未经 OM1 处理的 Tg 小鼠的粪便相比，获自经 OM1 处理的 Tg 小鼠的粪便导致受体小鼠大脑中 Th1 细胞减少（图 10e），可见来自经 OM1 处理的 Tg 小鼠的粪便与实施例 2 中验证的来自 WT 小鼠
10 的粪便起到了类似的恢复肠道微生物分布，减少 Th1 的作用，验证了 OM1 对 Tg 小鼠的肠道微生物的恢复功效。一致地，抗生素治疗削弱了 OM1 对于 APP/PS1 小鼠模型中的 Th1 细胞、IBA1 水平和细胞因子表达的效果（图 10f-j）。所有这些数据表明，OM1 可以通过调节肠道失调来减轻神经炎症和认知衰退。

15 总的来说，在上文的小鼠体内实验中，充分证实了肠道微生物变化及其调控——免疫细胞 Th1/M1 主导趋势及其逆转——认知失调及其改善这样的 AD 脑-肠轴调控通路及其干预治疗，并且这样的调控通路和干预在多种不同小鼠模型（5XFAD 转基因（Tg）小鼠模型、APP/PS1 小鼠模型、C57BL/6 小鼠模型）中一致地展示，尽管在这些小鼠之间在肠道微生物初始状态和过程转变方面存在一定的种内、个体间差异，因而充分证实了这样的调控通路和干预在不同个体中的共性。因此提出了通过
20 调节肠道微生物，使肠道微生物模式向正常、健康模式恢复，从而逆转免疫细胞疾病模式，改善认知，治疗 AD 的策略。

发明人采用人类 AD 患者和健康对照的数据，比较分析了在两者之间
25 之间存在差异的 AD 脑-肠轴相关肠道微生物，在表 1-2 中列出，在图 17-18 中示例，以作为调控对象。在对人类应用前述 AD 脑-肠轴治疗策略时，除了应当充分考虑到本发明中测试的作为啮齿类动物的小鼠与作为灵长类动物的人类之间的种间肠道微生物差异之外，还应当充分考虑到 AD 患者之间的种内、个体间肠道微生物差异。因此在上文实验中具体展示
30 的小鼠肠道微生物类别更多地是指导性的，而不应当僵硬地、机械地套用到人类 AD 患者身上。

实施例 4. OM1 通过调节氨基酸代谢来抑制神经炎症

35 本发明还探究了肠道微生物区系变化与免疫细胞变化之间的中间环节及其干预。

肠道微生物的代谢物与初始 T 细胞向 Th1/Th2 分化之间的因果性，及其干预

5 为了测试肠道微生物的代谢物的可能参与，来自 7 个月大的 Tg 小鼠的体外培养粪便的上清液被添加到初始 CD4⁺ T 细胞培养物，其刺激初始 CD4⁺ T 细胞分化成 Th1 细胞和 Th2 细胞。相比之下，来自经 OM1 处理的小鼠粪便培养物的上清液促进 Th2 细胞分化并抑制 Th1 分化（图 11a），指示肠道微生物代谢物影响初始 T 细胞分化成 Th1 和 Th2 细胞。

10 肠道微生物的代谢物中的氨基酸与初始 T 细胞向 Th1/Th2 分化之间的因果性，及其干预

发明人接下来采用非靶向代谢组学技术来表征粪便代谢组。在来自 WT、Tg 和经 OM1 处理的 Tg 小鼠的粪便样品中鉴定总计 11289 种代谢产物（图 11b-c）。在这些代谢物中，如通过 METLIN 数据库注释的，
15 124 种代谢物的丰度在 Tg 小鼠中相对于 WT 小鼠中显著改变、下调或上调，指示与 AD 相关。引人注目的是，所有这些代谢物的变化在很大程度上可以通过 OM1 处理来逆转（图 11d-f），指示对 AD 的治疗修复了这些 AD 相关代谢物的异常状态。这些改变的代谢物被进一步用人类代谢组数据库（Human Metabolites Database, HMDB）和京都基因和基因组百科全书（Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes, KEGG）注释（图 11g），产生在 WT、Tg 和经 OM1 处理的 Tg 小鼠中有区别地调节的总计 31 种代谢物，其可以与所有三个数据库（HMDB, METLIN, KEGG）匹配。使用 MBROLE 或 MetaboAnalyst 对这些代谢物进行途径富集分析，进一步揭示了氨基酸相关代谢途径和酶的显著变化，特别是苯丙氨酸相关途径（图 5a）。
20 25

因此，发明人选择将重点放在氨基酸上作进一步研究。在 WT 和 Tg 小鼠中筛选总计 36 种氨基酸（表 3）的血浆浓度。使用随机森林算法对这些氨基酸进行分类，部分如图 19 所示排序，列在表 4 中。苯丙氨酸被评为最高命中，然后是异亮氨酸、血清素、组氨酸和乙酰鸟氨酸。这
30 五种氨基酸的多变量探索分析，根据接收者操作特征（ROC）曲线在 WT 和 Tg 小鼠之间出现显著差别（图 5b；图 11h），表示它们与疾病进展密切相关。然后发明人检查了经 OM1 处理或未处理的 Tg 小鼠的粪便和血液样品中，与 WT 小鼠相比，所选氨基酸的丰度。参见图 20 和图 21，发明人发现多种氨基酸被 OM1 影响，从 Tg 模式朝向野生型模式恢复。尤其是，苯丙氨酸和异亮氨酸的浓度在 Tg 小鼠的粪便中显著高于
35

在 WT 小鼠的粪便中，并且 OM1 处理使它们的浓度显著降低至与 WT 小鼠相当的水平（图 5c）。在血液中检测到苯丙氨酸和异亮氨酸的丰度的相似变化模式（图 5d）。注意苯丙氨酸和异亮氨酸是作为肠道微生物代谢物中随疾病进展而变化，又被 OM1 逆转的代表。此外，发明人还发现接受 OM1 后，小鼠的细胞因子具有恢复至野生型模式的趋势（图 22），这与图 2g 所示与 Tg 小鼠共同居住导致 WT 小鼠的细胞因子状态趋向于转变为 Tg 小鼠模式相呼应。

为了测试这些氨基酸的升高是否是因为肠道微生物区系变化，因而允许通过干预肠道微生物区系来干预氨基酸，发明人检测了 FMT 研究中的氨基酸水平。来自 2 月龄的 WT 小鼠的粪便可显著降低 Tg 小鼠中苯丙氨酸和异亮氨酸的水平（图 11i）。类似地，在图 2 描述的共同居住的 WT 小鼠中，血液中的苯丙氨酸和异亮氨酸水平升高，与 Tg 小鼠的水平类似（图 11j）。因此可以确定，WT 小鼠在与 Tg 小鼠共同居住而使其自身的 WT 肠道微生物模式向 Tg 模式转变时，导致苯丙氨酸和异亮氨酸异常产生，水平上升，相反使含正常 WT 肠道微生物区系的 WT 小鼠粪便移植到 Tg 小鼠中导致 Tg 小鼠肠道微生物区系向 WT 模式转变，导致苯丙氨酸和异亮氨酸的异常产生得以恢复，水平降低，证实可以通过恢复 Tg 小鼠的肠道微生物区系而恢复肠道微生物代谢物苯丙氨酸和异亮氨酸的水平。

20

验证苯丙氨酸和异亮氨酸影响初始 T 细胞向 Th1/Th2 分化，及其干预

为了检查苯丙氨酸或异亮氨酸的细胞影响，将这两种化合物直接添加到初始 CD4⁺ T 细胞培养物中。Th0 细胞分化为 Th1 细胞（图 5e）和 Th1 细胞增殖（图 5f）两者均增加。反过来，OM1 处理可抑制苯丙氨酸和异亮氨酸诱导的 Th1 分化和刺激的 Th1 细胞增殖，指示 OM1 除影响肠道微生物以外，也直接影响其代谢物氨基酸本身。此外，发明人用腹腔内注射苯丙氨酸和异亮氨酸处理 WT 小鼠，发现血液中的 Th1 细胞计数显著增加（图 5g），验证氨基酸体内促进 Th0 分化成 Th1。这些结果表明，苯丙氨酸和异亮氨酸的积累可以增加血液中的 Th1 细胞计数。

30

通过干预初始 T 细胞摄取氨基酸而干预初始 T 细胞分化

氨基酸可通过特定转运体而被免疫细胞摄取。发明人进一步检查了 SLC7A5（苯丙氨酸和异亮氨酸的转运体）在初始 CD4⁺ T 细胞中的表达水平，发现 SLC7A5 在初始 CD4⁺ T 细胞中表达。CD4⁺ T 细胞与 ¹³C 标

35

记的苯丙氨酸一起培养揭示了初始 $CD4^+$ T 细胞对苯丙氨酸的摄取，这可以被药理学 SLC7A5 抑制剂 JPH 203 显著阻断（图 11k），指示可以通过抑制氨基酸转运体而抑制免疫细胞摄取氨基酸。发明人进一步检测了由此导致的 Th1 细胞占比变化，6 月龄的 5XFAD 小鼠，每日以腹腔注射的方式给予 50 mg/kg 的 JPH 203 或溶媒对照。给药 1 个月后，安乐死小鼠，通过流式细胞仪分析对照组与 JPH 203 处理组的小鼠的大脑内促炎性 Th1 细胞的比例，以此为代表，反映脑内的神经炎症情况。结果如图 13 所示，与溶媒对照组相比，一个月的 JPH203 处理明显下调了小鼠脑内促炎性 Th1 细胞的比例，证实通过抑制氨基酸转运体而抑制免疫细胞摄取氨基酸，从而阻止氨基酸对免疫细胞分化的促进，降低了大脑内的神经炎症。

在人类 AD 受试者中验证苯丙氨酸和异亮氨酸的异常水平

最后，发明人在人类中进行验证，探讨了上述发现是否可以在具有 AD 导致的 MCI 的人类受试者中重现（MCI 的定义参见本研究中使用的方法）。确实，来自 AD 导致的 MCI 受试者（n=9）的血液中的苯丙氨酸和异亮氨酸浓度和 Th1 细胞计数高于健康对应体（n=18）（图 5h 和 i）。血液中增加的苯丙氨酸和异亮氨酸水平也在另一个 AD 导致的 MCI 队列中确认（图 5j），从而允许基于此来设计人类诊断和治疗策略。

20

综上所述，发明人发现，肠道微生物代谢物中的若干代谢物参与后续免疫细胞向 Th1 主导状态转变。发明人特别调查了代谢物中的氨基酸，尤其是苯丙氨酸和异亮氨酸，证实了肠道微生物区系组成变化、苯丙氨酸和异亮氨酸的异常产生、以及初始 T 细胞的过度 Th1 分化之间的因果关系。通过施用前文证实使 Tg 小鼠的异常肠道微生物区系向正常 WT 肠道微生物区系恢复的 WT 粪菌和 OM1，苯丙氨酸和异亮氨酸的异常高水平得以降低，向正常水平恢复，进而 Th0 细胞向 Th1 细胞分化被抑制，逆转 Th1 主导的疾病状态，证实肠道微生物代谢物是异常肠道微生物区系组成与异常免疫细胞状态的中间桥梁，是 AD 脑-肠轴关系中的一环。发明人还测试了通过其他干预代谢物的手段，例如通过降低代谢物水平或者阻止免疫细胞摄取代谢物，来干预肠道微生物代谢物导致的下游异常免疫细胞状态，以及进而认知状态。

30

虽然上文已经结合优选实施方式描述了本发明的原理，但应当清楚地理解，该描述仅通过示例的方式进行，而非作为对本发明的范围的限

35

制。

表 1. AD 病人或小鼠改变的菌群列表

5

分类级别	中文名	英文名	matched_name
门	放线菌门	Actinobacteria	p__Actinobacteria
门	拟杆菌门	Bacteroidetes	p__Bacteroidetes
门	厚壁菌门	Firmicutes	p__Firmicutes
门	变形菌门	Proteobacteria	p__Proteobacteria
门	柔膜菌门	Tenericutes	p__Tenericutes
纲	β -变形杆菌纲	Betaproteobacteria	c__Betaproteobacteria
目	伯克氏菌目	Burkholderiales	o__Burkholderiales
科	拟杆菌科	Bacteroidaceae	f__Bacteroidaceae
科	双歧杆菌科	Bifidobacteriaceae	f__Bifidobacteriaceae
科	伯克氏菌科	Burkholderiaceae	f__Burkholderiaceae
科	梭菌科	Clostridiaceae	f__Clostridiaceae
科	脱硫弧菌科	Desulfovibrionaceae	f__Desulfovibrionaceae
科	韦荣球菌科	Erysipelotrichaceae	f__Erysipelotrichaceae
科	梭杆菌科	Fusobacteriaceae	f__Fusobacteriaceae
科	兼性双球菌科	Gemellaceae	f__Gemellaceae
科	螺杆菌科	Helicobacteriaceae	f__Helicobacteriaceae
科	毛螺菌科	Lachnospiraceae	f__Lachnospiraceae
科	艰难杆菌科	Mogibacteriaceae	f__Mogibacteriaceae
科	拟杆菌 S24_7 科	norank_Bacteroidales_S24-7_group	f__Bacteroidales_S24-7_group
科	消化链球菌科	Peptostreptococcaceae	f__Peptostreptococcaceae
科	普雷沃菌科	Prevotellaceae	f__Prevotellaceae
科	理研菌科	Rikenellaceae	f__Rikenellaceae
科	疣微菌科	Ruminococcaceae	f__Ruminococcaceae

科	葡萄球菌科	Staphylococcaceae	f__Staphylococcaceae
科	曲霉菌科	Turicibacteraceae	f__Turicibacteraceae
科	尿杆菌科	Turicibacteriaceae	f__Turicibacteriaceae
属	共生放线菌属	Actinobacillus_actino mycetemcomitans	g__Actinobacillus_actin omycetemcomitans
属	放线菌属	Actinobacteria	g__Actinobacteria
属	NA	Adlercreutzia	g__Adlercreutzia
属	另枝菌属	Alistipes	g__Alistipes
属	链格孢菌属	Alternaria	g__Alternaria
属	拟杆菌属	Bacteroides	g__Bacteroides
属	双歧杆菌属	Bifidobacteria	g__Bifidobacteria
属	双歧杆菌属	Bifidobacterium	g__Bifidobacterium
属	嗜胆菌属	Bilophila	g__Bilophila
属	布劳特氏菌属	Blautia	g__Blautia
属	葡萄孢菌属	Botrytis	g__Botrytis
属	念珠菌属	Candida	g__Candida
属	NA	cc115	g__cc115
属	梭菌属	Clostridium	g__Clostridium
属	小杆菌属	Dialister	g__Dialister
属	大肠杆菌 K99	E_coli_K99	g__E_coli_K99
属	大肠杆菌属	Escherichia	g__Escherichia
属	直肠真细菌	Eubacterium_rectale	g__[Eubacterium]_recta le
属	镰刀菌属	Fusarium	g__Fusarium
属	孪生球菌属	Gemella	g__Gemella
属	乳酸杆菌属	Lactobacilli	g__Lactobacilli
属	马拉色菌属	Malassezia	g__Malassezia
属	NA	Phascolarctobacteriu m	g__Phascolarctobacteriu m
属	志贺氏菌属	Shigella	g__Shigella
属	NA	SMB53	g__SMB53
属	萨特菌属	Sutterella	g__Sutterella
属	NA	Tannerella_forsythia	g__Tannerella_forsythia
属	曲霉菌属	Turicibacter	g__Turicibacter

属	大肠杆菌志贺氏菌属		g__Escherichia-Shigella
---	-----------	--	-------------------------

表 2. AD 病人与健康对照 (HC) 肠菌相对丰度显著差异菌群列表

分类级别	物种名称	AD-Mean (%)	HC-Mean (%)	AD 与 HC 相比的倍数变化	AD 与 HC 相比上调或下调
门	p__Firmicutes	39.41	44.07	0.8942591	下调
门	p__Bacteroidetes	38.03	39.9	0.9531328	下调
门	p__Proteobacteria	12.85	8.086	1.5891665	上调
门	p__Actinobacteria	5.065	3.522	1.4381034	上调
门	p__Fusobacteria	2.028	1.001	2.025974	上调
门	p__Cyanobacteria	0.7771	1.227	0.6333333	下调
门	p__Verrucomicrobia	0.2726	0.7585	0.3593935	下调
纲	c__Bacteroidia	37.38	39.51	0.9460896	下调
纲	c__Clostridia	25.5	32.33	0.7887411	下调
纲	c__Gammaproteobacteria	10.19	4.734	2.1525137	上调
纲	c__Bacilli	5.575	6.606	0.8439298	下调
纲	c__Negativicutes	6.319	4.507	1.4020413	上调
纲	c__Actinobacteria	5.791	3.522	1.6442362	上调
纲	c__Fusobacteriia	2.379	1.001	2.3766234	上调
纲	c__Betaproteobacteria	1.298	1.438	0.9026426	下调
纲	c__Alphaproteobacteria	1.104	1.349	0.818384	下调
目	o__Bacteroidales	37.38	39.51	0.9460896	下调
目	o__Clostridiales	25.43	32.24	0.7887717	下调
目	o__Enterobacterial	8.983	3.453	2.6015059	上调

	es				
目	o__Selenomonadales	6.319	4.507	1.4020413	上调
目	o__Lactobacillales	4.803	5.774	0.8318324	下调
目	o__Bifidobacteriales	3.887	1.304	2.9808282	上调
目	o__Fusobacteriales	2.379	1.001	2.3766234	上调
目	o__Burkholderiales	1.012	1.158	0.8739206	下调
目	o__Bacillales	0.7707	0.8287	0.9300109	下调
科	f__Rikenellaceae	0.5028	1.018	0.4939096	下调
科	f__Ktedonobacteraceae	0.000187	0.001769	0.1057094	下调
科	f__Nannocystaceae	0	0.001947	0	下调
属	g__Lachnospiraceae_NK4A136_group	0.5582	1.478	0.3776725	下调
属	g__Alistipes	0.4237	0.9265	0.4573125	下调
属	g__Ruminococcus_1	0.2783	0.9167	0.303589	下调
属	g__Ruminococcaceae_UCG-002	0.4232	0.6621	0.6391784	下调
属	g__Ruminococcaceae_UCG-005	0.2549	0.5889	0.4328409	下调
属	g__Coprococcus_2	0.1136	0.6677	0.1701363	下调
属	g__Tyzzerella_4	0.4165	0.08026	5.1893845	上调
属	g__Lachnospiraceae_UCG-001	0.04241	0.1747	0.242759	下调
属	g__Anaerotruncus	0.08045	0.1342	0.5994784	下调
属	g__Cloacibacterium	0.005284	0.001851	2.8546731	上调
属	g__norank_f__Ktedonobacteraceae	0.000187	0.001769	0.1057094	下调
属	g__Nannocystis	0	0.001947	0	下调
属	g__norank_f__Hydrogenophilaceae	0.001435	0.0002894	4.9585349	上调

种	s__unclassified_g__Subdoligranulum	0.1108	0.7963	0.1391435	下调
种	s__unclassified_g__Alistipes	0.2412	0.6416	0.3759352	下调
种	s__uncultured_organism_g__Parasutterella	0.09518	0.4442	0.2142729	下调
种	s__unclassified_g__Tyzzerella_4	0.4165	0.08026	5.1893845	上调
种	s__uncultured_organism_g__Ruminococcaceae_UCG-005	0.1649	0.1728	0.9542824	下调
种	s__uncultured_organism_g__Anaerotruncus	0.02364	0.05794	0.4080083	下调
种	s__uncultured_Alistipes_sp._g__Alistipes	0.02727	0.04977	0.5479204	下调
种	s__Lachnospiraceae_bacterium_TF01-11	0.009628	0.05391	0.178594	下调
种	s__unclassified_g__Anaerotruncus	0.01064	0.01785	0.5960784	下调
种	s__unclassified_g__norank_o__Mollicutes_RF9	0.003794	0.01637	0.2317654	下调
种	s__uncultured_bacterium_g__Family_XIII_AD3011_group	0.008094	0.007951	1.0179852	上调
种	s__uncultured_bacterium_g__norank_f__Christensenellac	0.007214	0.007841	0.9200357	下调

	eae				
种	s__uncultured_bacterium_g__Cloacibacterium	0.005284	0.001851	2.8546731	上调
种	s__uncultured_organism_g__Peptococcus	0	0.006374	0	下调
种	s__Mycobacterium_celatum_g__Mycobacterium	0.00115	0.005163	0.2227387	下调
种	s__unclassified_g__Oceanobacillus	0.004827	0.001018	4.7416503	上调
种	s__Alistipes_putredinis_DSM_17216	0.000187	0.003568	0.0524103	下调
种	s__Prevotella_loeschii	0.002635	0.0004672	5.6399829	上调
种	s__uncultured_bacterium_g__norank_o__MBA03	0.002428	0.0004532	5.3574581	上调
种	s__Eubacterium_brachy	0.002443	0.0001614	15.136307	上调
种	s__uncultured_bacterium_adhufec108	0	0.002173	0	下调
种	s__uncultured_Clostridiales_bacterium_g__norank_f__Ktedonobacteraceae	0.000187	0.001769	0.1057094	下调
种	s__Nannocystis_pussilla	0	0.001947	0	下调
种	s__bacterium_2013_Ark19i	0.001435	0.0002894	4.9585349	上调
种	s__Auxenochlorella_protothecoides_g	0.001463	0.0001447	10.110574	上调

	__norank				
种	s__uncultured_Bacteroidetes_bacterium_g__Dinghuibacter	0	0.0009268	0	下调

表 3. 下表列出了 WT (2-9 月) 和 Tg (2-9 月) 小鼠的血液中检测到的氨基酸的名称。涉及图 5b。

氨基酸的名称
glycine; 甘氨酸
alanine; 丙氨酸
serine; 丝氨酸
valine; 缬氨酸
4-OH proline; 4-OH 脯氨酸
asparagine; 天冬酰胺
glutamine; 谷氨酰胺
tyrosine; 酪氨酸
hypotaurine; 亚牛磺酸
methionine sulfoxide; 蛋氨酸亚砜
beta-alanine; β -丙氨酸
threonine; 苏氨酸
leucine; 亮氨酸
Ornithine; 鸟氨酸
aspartic acid; 天冬氨酸
Methionine; 蛋氨酸
Histidine; 组氨酸
Phenylalanine; 苯丙氨酸
Arginine; 精氨酸
Proline; 脯氨酸
Taurine; 牛磺酸
Isoleucine; 异亮氨酸
glutamic acid; 谷氨酸
Citrulline; 瓜氨酸

Tryptophan; 色氨酸
Kynurenine; 犬尿氨酸
GABA
Lysine; 赖氨酸
pyroglutamic acid; 焦谷氨酸
Acetylorathine; 乙酰鸟氨酸
asymmetric dimethylarginine; 不对称二甲基精氨酸
alpha-aminoadipic acid; α -氨基己二酸
Carnosine; 肌肽
Creatinine; 肌酐
Putrescine; 腐胺
Serotonin; 血清素

表 4. ROC 分析 WT 小鼠和 Tg 小鼠血液氨基酸中按照选择频率排序的所有氨基酸标志物

氨基酸	氨基酸	Rank Freq.	WT	Tg
苯丙氨酸	phenylalanine	0.42	低	高
异亮氨酸	isoleucine	0.4	低	高
血清素	Serotonin	0.36	低	高
组氨酸	histidine	0.34	低	高
乙酰鸟氨酸	acetylorathine	0.32	高	低
犬尿氨酸	Kynurenine	0.32	低	高
色氨酸	tryptophan	0.28	低	高
亮氨酸	leucine	0.28	低	高
谷氨酸	glutamic acid	0.26	低	高
焦谷氨酸	pyroglutamic acid	0.22	低	高
缬氨酸	valine	0.2	低	高
谷氨酰胺	glutamine	0.2	低	高
β -丙氨酸	beta-alanine	0.2	低	高
亚牛磺酸	hypotaurine	0.18	低	高
酪氨酸	tyrosine	0.12	低	高
不对称二甲基精氨酸	asymmetric dimethylarginine	0.12	高	低

甘氨酸	glycine	0.1	低	高
肌肽	Carnosine	0.08	低	高
4-OH 脯氨酸	4-OH proline	0.08	低	高
天冬氨酸	aspartic acid	0.06	高	低
苏氨酸	threonine	0.06	低	高
α -氨基己二酸	alpha-aminoadipic acid	0.04	低	高
鸟氨酸	ornithine	0.04	低	高
肌酐	Creatinine	0.04	低	高
丙氨酸	alanine	0.04	低	高
GABA	GABA	0.02	低	高
蛋氨酸亚砷	methionine sulfoxide	0.02	低	高
脯氨酸	proline	0.02	低	高

权利要求书

1. 用于调节哺乳动物外周血中的氨基酸水平的试剂在制备用于在受试者中治疗阿尔茨海默病的药物中的用途。
- 5 2. 一种用于在受试者中治疗阿尔茨海默病的药物组合物，所述药物组合物包含有效量的用于调节哺乳动物外周血中的氨基酸水平的试剂。
 3. 根据权利要求 1 所述的用途或根据权利要求 2 所述的药物组合物，其中所述氨基酸是选自以下中的一种或多种：4-OH 脯氨酸、乙酰鸟氨酸、丙氨酸、 α -氨基己二酸、天冬酰胺、天冬氨酸、不对称二甲基精氨酸、 β -
10 丙氨酸、肌肽、瓜氨酸、肌酐、GABA、谷氨酸、谷氨酰胺、甘氨酸、组氨酸、牛磺酸、异亮氨酸、犬尿氨酸、亮氨酸、赖氨酸、蛋氨酸、蛋氨酸亚砷、鸟氨酸、苯丙氨酸、哌啶酸、脯氨酸、腐胺、焦谷氨酸、丝氨酸、血清素、牛磺酸、苏氨酸、色氨酸、酪氨酸和缬氨酸；优选是选自苯丙氨酸、异亮氨酸、血清素、组氨酸和乙酰鸟氨酸中的一种或多种；更优选是苯丙
15 氨酸和/或异亮氨酸；最优选是苯丙氨酸。
 4. 根据权利要求 1 所述的用途或根据权利要求 2 所述的药物组合物，其中所述试剂包含选自以下中的一种或多种：氨基酸降解通路中的酶，氨基酸合成通路中的酶的抑制剂、氨基酸配体，氨基酸转运体的激动剂或抑制剂，用于调节肠道微生物的相对丰度的试剂、或其组合。
 - 20 5. 根据权利要求 4 所述的用途或药物组合物，其中所述用于调节肠道微生物的相对丰度的试剂选自糖类药物、肠道微生物复合物、或其组合；其中所述糖类药物选自单糖、二糖、寡糖、多糖、或其衍生物、或者其和/或其衍生物的组合；优选寡糖和多糖；更优选甘露糖醛酸寡糖或包含甘露糖醛酸寡糖的组合物；其中所述肠道微生物复合物包含选自厚壁菌门、拟
25 杆菌门、变形菌门、放线菌门、梭杆菌门、蓝藻菌门、疣微菌门或其组合中的一种或多种。
 6. 根据权利要求 5 所述的用途或药物组合物，其中所述氨基酸降解酶选自以下中的一种或多种：苯丙氨酸-4-羟化酶；苯丙氨酸 2-单氧酶；过氧化氢酶-过氧化物酶；苯乙醛合成酶；芳族-L-氨基酸/L-色氨酸脱羧酶；苯丙氨酸脱羧酶；苯丙氨酸 N-酰基转移酶；天冬氨酸氨基转移酶；酪氨酸氨基转移酶；L-氨基酸氧化酶；苯丙氨酸脱氢酶；芳族氨基酸转氨酶；组氨酸磷酸盐氨基转移酶；芳族氨基酸氨基转移酶 II；苯丙氨酸消旋酶；苯丙氨酸
30 氨裂解酶；苯丙氨酸/酪氨酸氨裂解酶；支链氨基酸氨基转移酶；L-氨基酸

氧化酶。

7. 根据权利要求 5 所述的用途或药物组合物，其中所述氨基酸降解酶选自以下中的一种或多种：苯丙氨酸-4-羟化酶；芳族-L-氨基-酸/L-色氨酸脱羧酶；天冬氨酸氨基转移酶；酪氨酸氨基转移酶,TAT；L-氨基酸氧化酶。

5 8. 根据权利要求 5 所述的用途或药物组合物，其中所述氨基酸降解酶是通过载体递送，优选所述载体是能够表达所述氨基酸降解酶的微生物，优选细菌，更优选大肠杆菌。

9. 根据权利要求 1 所述的用途或根据权利要求 2 所述的药物组合物，其中通过检测来自所述受试者的外周血样品，所述试剂使所述氨基酸水平
10 调节约 5、10、15、20、25、30、35、40、45、50、55、60、65、70、75、80、85、90、95、100、105、110、115、120、125、130、135、140、145、150、155、160、165、170、175、180、185、190、195、200、205、210、215、220、225、230、235、240、245、250、255、260、265、270、275、280、285、290、295、300 μM 或更多；和/或使得所述氨基酸水平接近或达
15 到相应正常受试者的相应氨基酸水平。

10. 根据权利要求 1 所述的用途或根据权利要求 2 所述的药物组合物，其中通过检测来自所述受试者的粪便样品，所述试剂使所述氨基酸水平调
节约 100、200、300、400、500、600、700、800、900、1000、1100、1200、1300、1400、1500、1600、1700、1800、1900、2000、2100、2200、2300、
20 2400、2500、2600、2700、2800、2900、3000 $\mu\text{mol/g}$ 或更多；和/或使得所述氨基酸水平接近或达到相应正常受试者的相应氨基酸水平。

11. 根据权利要求 1 所述的用途或根据权利要求 2 所述的药物组合物，其中所述调节哺乳动物外周血中的氨基酸水平是提高哺乳动物外周血中的一种或多种氨基酸的水平
25 的水平；优选降低选自以下中的一种或多种氨基酸的水平：4-OH 脯氨酸、乙酰鸟氨酸、丙氨酸、 α -氨基己二酸、天冬酰胺、天冬氨酸、不对称二甲基精氨酸、 β -丙氨酸、肌肽、瓜氨酸、肌酐、GABA、谷氨酸、谷氨酰胺、甘氨酸、组氨酸、牛磺酸、异亮氨酸、犬尿氨酸、亮氨酸、赖氨酸、蛋氨酸、蛋氨酸亚砷、鸟氨酸、苯丙氨酸、哌啶酸、脯氨酸、腐胺、焦谷氨酸、丝氨酸、血清素、牛磺酸、苏氨酸、色氨酸、酪氨酸和缬氨酸；更优选降低
30 哺乳动物外周血中选自苯丙氨酸、异亮氨酸、血清素、组氨酸和乙酰鸟氨酸中的一种或多种氨基酸的水平；还更优选降低哺乳动物外周血中的苯丙氨酸和/或异亮氨酸的水平；最优选降低哺乳动物外周血中的苯丙氨酸的水平。

35 12. 一种用于筛选可用于治疗阿尔茨海默病的候选药物的方法，其包

括：

a) 向具有一定的外周血中氨基酸水平的哺乳动物模型施用测试试剂，和

5 b) 选择调节所述氨基酸水平的测试试剂作为可用于治疗阿尔茨海默病的候选药物。

13. 根据权利要求 12 所述的方法，其还包括向具有一定的外周血中氨基酸水平的哺乳动物模型施用作为阳性对照的 GV-971，优选选择与所述 GV-971 基本上一致地调节所述氨基酸水平的测试试剂。

14. 根据权利要求 12 或 13 所述的方法，其还包括向具有一定的外周血
10 中氨基酸水平的哺乳动物模型施用所选择的测试试剂以进行验证，其中通过检测来自所述哺乳动物模型的外周血样品，所选择的测试试剂使所述氨基酸水平调节约 5、10、15、20、25、30、35、40、45、50、55、60、65、70、75、80、85、90、95、100、105、110、115、120、125、130、135、140、145、150、155、160、165、170、175、180、185、190、195、200、
15 205、210、215、220、225、230、235、240、245、250、255、260、265、270、275、280、285、290、295、300 μM 或更多；和/或使得所述氨基酸水平接近或达到相应正常哺乳动物模型的相应氨基酸水平。

15. 根据权利要求 12 或 13 所述的方法，其还包括向具有一定的外周血
20 中氨基酸水平的哺乳动物模型施用所选择的测试试剂以进行验证，其中通过检测来自所述哺乳动物模型的粪便样品，所选择的测试试剂使所述氨基酸水平调节约 100、200、300、400、500、600、700、800、900、1000、1100、1200、1300、1400、1500、1600、1700、1800、1900、2000、2100、2200、2300、2400、2500、2600、2700、2800、2900、3000 $\mu\text{mol/g}$ 或更多；和/或使得所述氨基酸水平接近或达到相应正常哺乳动物模型的相应氨基酸水平。
25

16. 根据权利要求 12 至 15 中任一项所述的方法，其中所述氨基酸是选自以下中的一种或多种：4-OH 脯氨酸、乙酰鸟氨酸、丙氨酸、 α -氨基己二酸、天冬酰胺、天冬氨酸、不对称二甲基精氨酸、 β -丙氨酸、肌肽、瓜氨酸、肌酐、GABA、谷氨酸、谷氨酰胺、甘氨酸、组氨酸、牛磺酸、异亮氨酸、
30 犬尿氨酸、亮氨酸、赖氨酸、蛋氨酸、蛋氨酸亚砷、鸟氨酸、苯丙氨酸、哌啶酸、脯氨酸、腐胺、焦谷氨酸、丝氨酸、血清素、牛磺酸、苏氨酸、色氨酸、酪氨酸和缬氨酸；优选是选自苯丙氨酸、异亮氨酸、血清素、组氨酸和乙酰鸟氨酸中的一种或多种；更优选是苯丙氨酸和/或异亮氨酸；最优选是苯丙氨酸。

35 17. 根据权利要求 12 至 16 中任一项所述的方法，其中所述调节氨基酸

水平是提高一种或多种氨基酸的水平和/或降低一种或多种氨基酸的水平；
优选降低哺乳动物外周血中选自苯丙氨酸、异亮氨酸、血清素、组氨酸和
乙酰鸟氨酸中的一种或多种氨基酸的水平；更优选降低哺乳动物外周血中的
5 苯丙氨酸和/或异亮氨酸的水平；最优选降低哺乳动物外周血中的苯丙氨
酸的水平。

18. 一种治疗阿尔茨海默病患者的方法，其包括：

（a）检测所述患者的氨基酸水平并与相应正常群体的相应氨基酸水平
进行比较以选择其水平与所述相应正常群体的相应氨基酸水平不同的氨基
酸；

10 （b）向所述患者施用用于调节哺乳动物外周血中的氨基酸水平的试剂
以调节所选择的氨基酸的水平以使其接近或达到所述相应正常群体的相应
氨基酸水平。