



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 101855554 A

(43) 申请公布日 2010. 10. 06

(21) 申请号 200880112257. 9

(74) 专利代理机构 北京市金杜律师事务所  
11256

(22) 申请日 2008. 09. 05

代理人 陈文平 尚继栋

(30) 优先权数据

60/970, 902 2007. 09. 07 US

(51) Int. Cl.

G01N 33/53(2006. 01)

(85) PCT申请进入国家阶段日

2010. 04. 19

(86) PCT申请的申请数据

PCT/US2008/075385 2008. 09. 05

(87) PCT申请的公布数据

W02009/033011 EN 2009. 03. 12

(71) 申请人 儿童医院医学中心

地址 美国俄亥俄州

申请人 总医院有限公司

国立医学科学与营养研究院

(72) 发明人 A·L·莫劳

G·M·鲁伊斯-帕拉希奥斯

D·S·纽伯格

权利要求书 3 页 说明书 20 页 附图 10 页

(54) 发明名称

分泌者、Lewis 和唾液酸化抗原水平作为疾病  
预测指标的用途

(57) 摘要

通过测定个体生物样品中至少一种分泌者抗原的水平 and 通过将测定的所述至少一种分泌者抗原的水平与预先确定的数值或预先确定的数值范围进行比较来确定具有患坏死性小肠结肠炎及相关疾病的风险的个体。可测定的分泌者抗原有：H-1、H-2、Lewis b 和 Lewis y 抗原及其衍生物（例如 Lewis a、Lewis x、Lewis b、Lewis y 的唾液酸化形式；H-1、H-2、Lewis a、Lewis x、Lewis b 或 Lewis y）。

1. 一种确定存在患坏死性小肠结肠炎的风险的个体的方法,所述方法包括:

(a) 测定个体生物样品中至少一种分泌者抗原的水平,和

(b) 将测定的所述至少一种分泌者抗原的水平与预先确定的数值或预先确定的数值范围进行比较,

其中,如果测定的所述至少一种分泌者抗原的水平不同于预先确定的数值或在预先确定的数值范围之外,则所述个体存在患坏死性小肠结肠炎的风险。

2. 根据权利要求1所述的方法,其中所述个体为婴儿。

3. 根据权利要求2所述的方法,其中所述婴儿为新生儿、低出生体重儿、极低出生体重儿或早产儿。

4. 根据权利要求1所述的方法,其中所述至少一种分泌者抗原包括 $\alpha$ 1,2-连接的岩藻糖抗原和/或 $\alpha$ 2,3唾液酸化的抗原。

5. 根据权利要求4所述的方法,其中所述至少一种分泌者抗原选自H-1、H-2、Lewis<sup>b</sup>和Lewis<sup>y</sup>抗原及其衍生物。

6. 根据权利要求5所述的方法,其中所述衍生物为Lewis a、Lewis x、Lewis b或Lewis y的唾液酸化形式。

7. 根据权利要求5所述的方法,其中所述衍生物为H-1、H-2、Lewis a、Lewis x、Lewis b或Lewis y的硫酸化形式。

8. 根据权利要求1所述的方法,其中所述生物样品为体液或组织。

9. 根据权利要求8所述的方法,其中所述体液包括唾液、血液、血浆、血清、尿液、大便、羊水、粘液、眼泪或淋巴液。

10. 根据权利要求9所述的方法,其中所述体液包括唾液。

11. 根据权利要求1所述的方法,其中所述测定步骤包括免疫测定。

12. 根据权利要求1所述的方法,其中所述至少一种分泌者抗原选自H-1、H-2、Lewis<sup>b</sup>和Lewis<sup>y</sup>及其衍生物,其中如果所述测定的水平低于预先确定的数值或低于预先确定的数值范围,则该个体被确定为存在患坏死性小肠结肠炎的风险。

13. 根据权利要求1所述的方法,其中所述预先确定的数值或预先确定的数值范围代表被确定为分泌者的个体群体中所述至少一种分泌者抗原的平均水平。

14. 根据权利要求1所述的方法,其中当测定的至少一种分泌者抗原的水平比分泌者对照群体中的平均水平低至少10%时,该个体被确定为存在患坏死性小肠结肠炎的风险。

15. 根据前述权利要求中任一项所述的方法,其中所述至少一种分泌者抗原为H-2抗原。

16. 根据权利要求1所述的方法,其中所述至少一种抗原为唾液酸化Lewis a或其衍生物,其中如果测定的水平高于预先确定的数值或高于预先确定的数值范围,则个体被确定为存在患坏死性小肠结肠炎的风险。

17. 根据权利要求16所述的方法,其中所述婴儿为新生儿、低出生体重儿、极低出生体重儿或早产儿。

18. 根据权利要求16所述的方法,其中所述生物样品为体液或组织。

19. 根据权利要求18所述的方法,其中所述体液包括唾液、血液、血浆、血清、尿液、大便、羊水、粘液、眼泪或淋巴液。

20. 根据权利要求 19 所述的方法,其中所述体液包括唾液。
21. 根据权利要求 16 所述的方法,其中所述测定步骤包括免疫测定。
22. 根据权利要求 16 所述的方法,其中所述预先确定的数值或预先确定的数值范围代表被确定为分泌者的个体群体中所述至少一种分泌者抗原的平均水平。
23. 一种确定存在患胃肠道疾病的风险的个体的方法,所述方法包括:
  - (a) 测定个体生物样品中至少一种分泌者抗原的水平,和
  - (b) 将测定的所述至少一种分泌者抗原的水平与预先确定的数值或预先确定的数值范围进行比较,其中,如果测定的所述至少一种分泌者抗原的水平不同于预先确定的数值或在预先确定的数值范围之外,则所述个体存在患胃肠道疾病的风险。
24. 根据权利要求 23 所述的方法,其中所述个体为婴儿。
25. 根据权利要求 23 所述的方法,其中所述婴儿为新生儿、低出生体重儿、极低出生体重儿或早产儿。
26. 根据权利要求 23 所述的方法,其中所述测定的抗原包括  $\alpha$  1,2-连接的岩藻糖抗原和 / 或  $\alpha$  2,3 唾液酸化的抗原。
27. 根据权利要求 26 所述的方法,其中所述分泌者抗原选自 H-1、H-2、Lewis<sup>b</sup> 和 Lewis<sup>y</sup> 抗原及其衍生物。
28. 根据权利要求 27 所述的方法,其中所述衍生物为 Lewis a、Lewis x、Lewis b 或 Lewis y 的唾液酸化形式。
29. 根据权利要求 27 所述的方法,其中所述衍生物为 Lewis a、Lewis x、Lewis b 或 Lewis y 的硫酸化形式。
30. 根据权利要求 22 所述的方法,其中所述生物样品为体液或组织。
31. 根据权利要求 30 所述的方法,其中所述体液包括唾液、血液、血浆、血清、尿液、大便、羊水、粘液、眼泪或淋巴液。
32. 根据权利要求 31 所述的方法,其中所述体液包括唾液。
33. 根据权利要求 22 所述的方法,其中所述测定步骤包括免疫测定。
34. 根据权利要求 22 所述的方法,其中所述至少一种分泌者抗原选自 H-1、H-2、Lewis<sup>b</sup> 和 Lewis<sup>y</sup> 及其衍生物,其中如果所述测定的水平低于预先确定的数值或低于预先确定的数值范围,则该个体被确定为存在患胃肠道疾病的风险。
35. 根据权利要求 22 所述的方法,其中所述预先确定的数值或预先确定的数值范围代表被确定为分泌者的个体群体中所述至少一种分泌者抗原的平均水平。
36. 根据权利要求 22 所述的方法,其中当测定的至少一种分泌者抗原的水平比分泌者对照群体中的平均水平低至少 10% 时,该个体被确定为存在患坏死性小肠结肠炎的风险。
37. 根据权利要求 22 所述的方法,其中所述至少一种抗原为 H-2 抗原。
38. 根据权利要求 22-37 中任一项所述的方法,其中所述胃肠道疾病为胃肠道炎症。
39. 根据权利要求 22-37 中任一项所述的方法,其中所述胃肠道疾病为胃肠道感染。
40. 根据权利要求 22-37 中任一项所述的方法,其中所述疾病为迟发型脓毒症。
41. 根据权利要求 39 所述的方法,其中所述胃肠道感染包括葡萄球菌属的种、金黄色葡萄球菌、大肠杆菌、链球菌属的种、肠杆菌属的种、克雷伯氏菌属的种、芽孢杆菌属的种、

沙雷氏菌属的种、念珠菌属的种、诺瓦克和其它诺瓦克病毒、弯曲杆菌属的种、霍乱弧菌、类杆菌属的种、梭菌科、贾第虫属中的一种或多种的感染。

42. 一种方法,包括:

(a) 测定个体生物样品中至少一种分泌者抗原的水平,和

(b) 将测定的所述至少一种分泌者抗原的水平与预先确定的数值或预先确定的数值范围进行比较,

(c) 如果测定的所述至少一种分泌者抗原的水平不同于预先确定的数值或在预先确定的数值范围之外,则确定所述个体存在患坏死性小肠结肠炎的风险;和

(d) 如果确定所述个体存在患坏死性小肠结肠炎的风险,则采取步骤来治疗坏死性小肠结肠炎或降低患该病的风险。

43. 根据权利要求 42 所述的方法,其中所述步骤 (d) 包括向个体施用  $\alpha$  1,2 岩藻糖基聚糖、益生生物体或益生菌中的一种或多种。

44. 一种确定存在患坏死性小肠结肠炎的风险的个体的方法,所述方法包括:

(a) 测定患者生物样品中 FUT2 蛋白质或编码 FUT2 的 mRNA 的水平;

(b) 将测定的 FUT2 蛋白质或编码 FUT2 的 mRNA 的水平与预先确定的数值或预先确定的数值范围进行比较,

其中,如果所述测定的 FUT2 蛋白质或编码 FUT2 的 mRNA 的水平低于预先确定的数值或预先确定的数值范围,则所述个体存在患坏死性小肠结肠炎的风险。

45. 一种确定存在患坏死性小肠结肠炎的风险的个体的方法,所述方法包括:

(a) 提供来自个体的生物样品;

(b) 确定所述个体是否携带具有降低 FUT2 的表达或活性的遗传改变的 FUT2 基因,

其中,如果所述个体携带具有降低 FUT2 的表达或活性的遗传改变的 FUT2 基因,则所述个体存在患坏死性小肠结肠炎的风险。

46. 一种确定存在死亡风险的个体的方法,所述方法包括:

(a) 测定个体生物样品中至少一种分泌者抗原的水平,和

(b) 将测定的所述至少一种分泌者抗原的水平与预先确定的数值或预先确定的数值范围进行比较,

其中,如果测定的所述至少一种分泌者抗原的水平不同于预先确定的数值或在预先确定的数值范围之外,则所述个体存在患坏死性小肠结肠炎的风险。

47. 根据权利要求 46 所述的方法,其中所述个体为婴儿。

## 分泌者、Lewis 和唾液酸化抗原水平作为疾病预测指标的用途

[0001] 有关联邦资助研究的声明

[0002] 此处所述工作的资金由联邦政府提供,因而其可享有本发明的某些权利。

### 技术领域

[0003] 本发明涉及医学诊断领域,更具体而言,本发明涉及用于评估和治疗婴儿炎性和感染性疾病的材料和方法。

### 背景技术

[0004] 婴儿的炎性和感染性疾病可与严重的发病率和死亡率相关。围产期出现的炎性和感染性疾病(例如坏死性小肠结肠炎(NEC)、脓毒症和绒毛膜羊膜炎)为新生儿死亡率的主要原因。NEC为新生儿中最常见的胃肠道医学和/或手术急症,在7-13%的出生体重极轻的婴儿中发生,其特征为肠损伤和肠坏死。NEC的总死亡率范围为20-40%,据报道早产儿的死亡率已超过50%。大约30%的病例需要手术干预,而据报道手术相关的死亡率高达50%。

[0005] 婴儿炎性和感染性疾病的幸存者可能具有明显的短期和长期病状,包括:代谢并发症、复发性感染、神经发育结果不良和生长结果不良,在有些情况下,可能需要反复的手术干预和延长的住院治疗。

### 发明内容

[0006] 此处描述的方法部分是基于我们对用于评估婴儿是否存在死亡的高风险或可能发展成某种炎性或感染性疾病(例如坏死性小肠结肠炎、脓毒症、胃肠道感染、呼吸道感染和尿道感染)的方法的发现。

[0007] 本文公开了确定存在患坏死性小肠结肠炎的风险的个体的方法,该方法包括:

[0008] (a) 测定个体生物样品中至少一种分泌者抗原(secretor antigen)的水平,和

[0009] (b) 将测定的所述至少一种分泌者抗原的水平与预先确定的数值或预先确定的数值范围进行比较,

[0010] 其中,如果测定的所述至少一种分泌者抗原的水平不同于预先确定的数值或在预先确定的数值范围之外,则所述个体存在患坏死性小肠结肠炎的风险。

[0011] 在不同的实施方案中:个体为婴儿(例如,婴儿为新生儿、低出生体重儿、极低出生体重儿或早产儿);所述至少一种分泌者抗原包括 $\alpha$ 1,2-连接的岩藻糖抗原和/或 $\alpha$ 2,3唾液酸化的抗原;所述至少一种分泌者抗原选自H-1、H-2、Lewis<sup>b</sup>和Lewis<sup>y</sup>抗原及其衍生物;衍生物为Lewis a、Lewis x、Lewis b或Lewis y的唾液酸化形式;衍生物为H-1、H-2、Lewis a、Lewis x、Lewis b或Lewis y的硫酸化形式;生物样品为体液或组织;体液包括唾液、血液、血浆、血清、尿液、大便、羊水、粘液、眼泪或淋巴液;体液包括唾液;测定步骤包括免疫测定;所述至少一种分泌者抗原选自H-1、H-2、Lewis<sup>b</sup>和Lewis<sup>y</sup>及其衍生物,其中如

果所述测定水平低于预先确定的数值或低于预先确定的数值范围,则所述个体被确定为存在患坏死性小肠结肠炎的风险;预先确定的数值或预先确定的数值范围代表被确定为分泌者(secretors)的个体群体中所述至少一种分泌者抗原的平均水平;当测定的至少一种分泌者抗原的水平比分泌者对照群体中的平均水平低至少10%时,该个体被确定为存在患坏死性小肠结肠炎的风险;所述至少一种分泌者抗原为H-2抗原。

[0012] 在一些实施方案中,至少一种抗原为唾液酸化Lewis<sup>a</sup>或其衍生物,如果测定的水平高于预先确定的数值或高于预先确定的数值范围,则所述个体被确定为存在患坏死性小肠结肠炎的风险。在该方法的一些实施方案中:婴儿为新生儿、低出生体重儿、极低出生体重儿或早产儿;生物样品为体液或组织;体液包括唾液、血液、血浆、血清、尿液、大便、羊水、粘液、眼泪或淋巴液;体液包括唾液;测定步骤包括免疫测定;预先确定的数值或预先确定的数值范围代表被确定为分泌者的个体群体中所述至少一种分泌者抗原的平均水平。

[0013] 本发明还公开了确定存在患胃肠道疾病的风险的个体的方法,该方法包括:

[0014] (a) 测定个体生物样品中至少一种分泌者抗原的水平,和

[0015] (b) 将测定的所述至少一种分泌者抗原的水平与预先确定的数值或预先确定的数值范围进行比较,

[0016] 其中,如果测定的所述至少一种分泌者抗原的水平不同于预先确定的数值或在预先确定的数值范围之外,则所述个体存在患胃肠道疾病的风险。

[0017] 在该方法的不同实施方案中:个体为婴儿(例如新生儿、低出生体重儿、极低出生体重儿或早产儿);测定的抗原包括 $\alpha$ 1,2-连接的岩藻糖抗原和/或 $\alpha$ 2,3唾液酸化抗原;分泌者抗原选自H-1、H-2、Lewis<sup>b</sup>和Lewis<sup>y</sup>抗原及其衍生物;衍生物为Lewis<sup>a</sup>、Lewis<sup>x</sup>、Lewis<sup>b</sup>或Lewis<sup>y</sup>的唾液酸化形式;衍生物为Lewis<sup>a</sup>、Lewis<sup>x</sup>、Lewis<sup>b</sup>或Lewis<sup>y</sup>的硫酸化形式;生物样品为体液或组织;体液包括唾液、血液、血浆、血清、尿液、大便、羊水、粘液、眼泪或淋巴液;测定步骤包括免疫测定;至少一种分泌者抗原选自H-1、H-2、Lewis<sup>b</sup>和Lewis<sup>y</sup>及其衍生物,其中如果所述测定水平低于预先确定的数值或低于预先确定的数值范围,则所述个体被确定为存在患胃肠道疾病的风险;预先确定的数值或预先确定的数值范围代表被确定为分泌者的个体群体中所述至少一种分泌者抗原的平均水平;当测定的至少一种分泌者抗原的水平比分泌者对照群体中的平均水平低至少10%时,所述个体被确定为存在患坏死性小肠结肠炎的风险;所述至少一种分泌者抗原为H-2抗原;胃肠道疾病为胃肠道炎症;胃肠道疾病为胃肠道感染;疾病为迟发型脓毒症;胃肠道感染包括葡萄球菌属的种(*Staphylococcus* spp.)、金黄色葡萄球菌(*Staphylococcus aureus*)、大肠杆菌(*Escherichia coli*)、链球菌属的种(*Streptococcus* spp.)、肠杆菌属的种(*Enterobacter* spp.)、克雷伯氏菌属的种(*Klebsiella* spp.)、芽孢杆菌属的种(*Bacillus* spp.)、沙雷氏菌属的种(*Serratia* spp.)、念珠菌属的种(*Candida* spp.)、诺瓦克(Norwalk)和其它诺瓦克病毒(Norovirus)、弯曲杆菌属的种(*Campylobacter* spp.)、霍乱弧菌(*Vibrio cholerae*)、拟杆菌属的种(*Bacteriodes* spp.)、梭菌科(*Clostridia*)、贾第虫属(*Giardia*)中的一种或多种的感染。

[0018] 本文还公开了一种方法,其包括:

[0019] (a) 测定个体生物样品中至少一种分泌者抗原的水平,和

[0020] (b) 将测定的所述至少一种分泌者抗原的水平与预先确定的数值或预先确定的数

值范围进行比较,

[0021] (c) 如果测定的所述至少一种分泌者抗原的水平不同于预先确定的数值或在预先确定的数值范围之外,则可以确定所述个体存在患坏死性小肠结肠炎的风险;和

[0022] (d) 如果个体被确定为存在患坏死性小肠结肠炎的风险,则采取步骤来治疗坏死性小肠结肠炎或降低患该病的风险。

[0023] 在该方法中,(d) 可包括向个体施用  $\alpha$  1,2 岩藻糖基聚糖、益生生物体 (probiotic organisms) 或益生菌 (prebiotics) 中的一种或多种。

[0024] 本文还公开了确定存在患坏死性小肠结肠炎的风险的个体的方法,该方法包括:

[0025] (a) 测定患者生物样品中 FUT2 蛋白质或编码 FUT2 的 mRNA 的水平;

[0026] (b) 将测定的 FUT2 蛋白质或编码 FUT2 的 mRNA 的水平与预先确定的数值或预先确定的数值范围进行比较,

[0027] 其中,如果所述测定的 FUT2 蛋白质或编码 FUT2 的 mRNA 的水平低于预先确定的数值或预先确定的数值范围,则所述个体存在患坏死性小肠结肠炎的风险。

[0028] 本文还公开了确定存在患坏死性小肠结肠炎的风险的个体的方法,所述方法包括:

[0029] (a) 提供来自个体的生物样品;

[0030] (b) 确定所述个体是否携带具有降低 FUT2 的表达或活性的遗传改变的 FUT2 基因,

[0031] 其中,如果所述个体携带具有降低 FUT2 的表达或活性的遗传改变的 FUT2 基因,则所述个体存在患坏死性小肠结肠炎的风险。

[0032] 本文还公开了确定存在死亡风险的个体(例如婴儿)的方法,该方法包括:

[0033] (a) 测定个体生物样品中至少一种分泌者抗原的水平,和

[0034] (b) 将测定的所述至少一种分泌者抗原的水平与预先确定的数值或预先确定的数值范围进行比较,

[0035] 其中,如果测定的所述至少一种分泌者抗原的水平不同于预先确定的数值或在预先确定的数值范围之外,则所述个体存在患坏死性小肠结肠炎的风险。

[0036] 除非特别定义,此处使用的所有技术和科学术语与本发明所属技术领域普通技术人员通常理解的含义相同。尽管与此处所述的相似或等同的方法和材料也可用于实施本发明,但是下面描述了合适的方法和材料。所有在此提及的出版物、专利申请、专利和其它文献的全部内容均通过引用的方式结合入本文中。当不一致时,以包括定义的本说明书为准。此外,材料、方法和实施例仅为示例性的,并非限制性的。

[0037] 本发明的一个或多个实施方案的细节通过下面的附图和描述进行阐述。本发明的其它特征、目的和优势也将会通过说明书、附图和权利要求书而清楚得知。

## 附图说明

[0038] 图 1:小鼠结肠中岩藻糖基转移酶和 Fut2 mRNA 的表达。(A) 在普通 [CONV]、无菌 (GF) 和前无菌 (ex-germ-free) (XGF) 小鼠中的  $\alpha$  1,2/3- 岩藻糖基转移酶;CONV、细菌耗尽 (bacteria-depleted) (BD) 和细菌充足 (bacteria-repleted) (XBD) 小鼠中的 (B)  $\alpha$  1,2/3- 岩藻糖基转移酶的活性和 (C) Fut2 mRNA;(D) 通过 UEA-1 凝集素和相应的 Nomarski 图像检测的  $\alpha$  1,2- 岩藻糖基化聚糖的表达。

[0039] 图 2 : (A) TLR4 的表达对于肠内岩藻糖基化的细菌激活是必需的。 (B) TLR4 配体足以激活细菌耗尽小鼠中的粘膜岩藻糖基化。

[0040] 图 3 : 脆弱拟杆菌 (*B. fragilis*) 的单定植 (Monocolonization) 诱导了肠内的岩藻糖基化。

[0041] 图 4 : 柱状图表明唾液中测定的 H-2、Le<sup>y</sup> 和 sLe<sup>a</sup> 抗原按照光密度 (O. D.) 值的分布, 比较了 24 例 NEC 或死亡病例 (顶行) 和 168 例对照 (底行)。在第 8-14 天 (第二周) 采集样品。表格显示了 NEC 或死亡的发生率、比较通过 CART 分析确认的风险组的相对风险和 p 值。三角符号表示通过 CART 分析确认的各抗原的连续值的截点, 以最优地区分高风险组和低风险组 (节点)。该截点被应用于表格中的各抗原。对于仅 H-2 而言, NEC 和死亡病例与对照的 O. D. 值分布显著不同 ( $P = 0.004$ , Wilcoxon Mann Whitney 检验)。

[0042] 图 5 : CART 分析的示意性描述。

[0043] 图 6 : 对在第二周 (第 8-14 天) 从辛辛那提 NICU 的 192 名 ELBW (< 1000 克) 婴儿中采集的唾液样品进行 EIA 检测, 获得的 H-2 和 sLe<sup>a</sup> 抗原的光密度 (O. D.) 值的散点图; 24 名 (12.5%) 发展为 NEC 或死亡。通过 CART 分析来系统地确认高和低风险组, 以使病例和非病例的误分类减至最小。高风险的 H-2 截点被确定为 O. D. < 0.627 (值的最低 38%, 包括非分泌者婴儿)。在 H-2 高风险组中, 73 名婴儿中出现了 18 个病例 (发病率 = 24.7%), 与之相比, 在 119 名婴儿中出现了 6 个病例 (发病率为 5.0%, 相对风险 [RR] = 4.9, 95% 置信区间 [CI] = 2.0-11.8,  $P < 0.0001$ )。高风险的 sLe<sup>a</sup> 截点被确定为 O. D. > 0.318 (值的最高 76%)。两个高风险组 (根据低 H-2 和高 sLe<sup>a</sup> O. D. 值确定) 中的婴儿建立了如图中所示的高风险组, 在 54 名婴儿中包括 17 个病例 (发病率 = 31.5%), 而其它所有的婴儿合在一起确定了低风险组, 其在 138 名婴儿中包括 7 个病例 (发病率 = 5.1%)。该组合分类导致了高风险和低风险的高度显著性的分离 (RR = 6.2, 95% CI 2.7 至 14.1,  $P < 0.0001$ )。

[0044] 图 7 : 人“分泌者”FUT2mRNA 的序列。

[0045] 图 8 : 人“分泌者”FUT2 多肽的序列。

## 具体实施方式

[0046] ABH 和 Lewis 组织血型抗原为代表聚糖链末端结构的碳水化合物。H 型组织血型抗原 (例如 H 型 1 和 2、Lewis<sup>b</sup> 和 Lewis<sup>y</sup> 抗原) 以  $\alpha$  1,2 键连接的岩藻糖末端为特征。在哺乳动物中, H 型组织血型抗原存在于广泛的组织类型中, 包括与外环境直接接触的器官 (例如上呼吸道、鼻上皮和气管) 以及泌尿生殖道、输尿管和阴道的上皮细胞、以及红细胞、周围神经系统的一些神经元、胸腺上皮和皮肤。在一些人群中, 大约 80% 的个体还在生物流体 (例如唾液、母乳、血清、眼泪、汗液和精液) 中表达可溶形式的 H 型组织血型抗原。在这些人群的其余大约 20% 的个体中, 可溶性 H 型组织血型抗原在生物流体中不存在或以极低水平存在。这两种表型已被分别命名为“分泌者 (secretor)”和“非分泌者 (non-secretor)”, 可溶性 H 型组织血型抗原通常被称为分泌者抗原。在其他的人群中, 作为非分泌者的个体的百分比低于 20%。

[0047] 分泌者和非分泌者亚群之间的表型差异的基础来源于编码岩藻糖基转移酶 2 的 FUT2 基因中的遗传多态性, 岩藻糖基转移酶 2 在本领域中也称为  $\alpha$  (1,2) 岩藻糖基转移

酶 2、EC 2. 4. 1. 69、SE 2、SEC2、岩藻糖基转移酶 -2(分泌者)、GDP-L-岩藻糖:β-D-半乳糖苷 2-α-L-岩藻糖基转移酶 2、半乳糖苷 2-α-L-岩藻糖基转移酶 2、分泌者血型 α-2-岩藻糖基转移酶、分泌者因子和跨膜蛋白 2。FUT2 基因在本领域中还被称为分泌者基因 (Se)。

[0048] FUT2 基因的产物 FUT2 催化由 GDP-β-L-岩藻糖和 β-D-半乳糖基-R 形成 α-L-岩藻糖基-1,2-β-D-半乳糖基-R 结构,其中 R 可为糖蛋白或糖脂。FUT2 在许多通常为内胚层来源的器官(包括肠、咽、肝、呼吸道、膀胱、尿道和内分泌腺)中表达,尽管这些器官的 FUT2 表达也随组织的分化模式(例如角质化与非角质化鳞状上皮、腺组织的管与腺泡)和特定的细胞类型(例如子宫内膜的分泌细胞与纤毛细胞和唾液腺中的粘液细胞与浆液细胞)而不同。分泌者表达功能性 FUT2;非分泌者不能表达功能性 FUT2。因此,可溶性 H 型组织血型抗原不能合成,因此不能分泌到非分泌者的生物流体中。

[0049] 实施例中描述的实验表明:婴儿的唾液酸聚糖表位的分泌者状态和表达与 NEC 和死亡的风险相关。更具体地说,与其唾液中表达中等或高水平 H-抗原的婴儿或表达很少或不表达唾液酸化 Lewis a 抗原的婴儿相比,其唾液中仅表达很少或不表达 H-2 抗原的极低出生体重儿 (ELBW) 或早产儿以及其唾液中表达的唾液酸化 Lewis a 抗原水平升高的婴儿显著地更可能发生不利的临床结果,例如 NEC、迟发型脓毒症和死亡。

[0050] 本文公开了与确定存在患炎性或感染性疾病(例如 NEC、胃肠道感染或迟发型脓毒症)风险的个体有关的材料和方法。更具体地说,可通过评估婴儿的分泌者状态来确定婴儿存在患炎性或感染性疾病(例如 NEC、胃肠道感染或迟发型脓毒症)的风险。在一些实施方案中,不表达或相对于对照样品低水平表达分泌者抗原的婴儿可被分类为存在患 NEC、胃肠道感染或迟发型脓毒症的风险。在其它的实施方案中,相对于对照样品表达升高水平的唾液酸化 Lewis a (sLe<sup>a</sup>) 抗原的婴儿可被分类为存在患 NEC、胃肠道感染或迟发型脓毒症的风险。

[0051] 本文还提供了治疗和控制存在患炎性或感染性疾病(例如 NEC、胃肠道感染或迟发型脓毒症)的风险的个体的方法。在一些实施方案中,根据分泌者状态被确定为存在患 NEC、胃肠道感染或迟发型脓毒症的风险的个体可采用特定的疗法进行治疗,该疗法包括保护剂,例如益生生物体或益生菌制剂,包括 α 1,2 岩藻糖基聚糖。在一些实施方案中,根据分泌者状态被确定为存在患 NEC、胃肠道感染或迟发型脓毒症的风险的个体的疗程可通过评估正向其婴儿提供的母乳中分泌者抗原的水平以及基于食品来源中相对于对照样品中分泌者抗原的水平向婴儿施用包括保护剂(例如 α 1,2 岩藻糖基聚糖、益生生物体或益生菌)的特定疗法来进行评价。

[0052] 分泌者抗原

[0053] 分泌者抗原,即 H 型 1 和 2、Lewis<sup>b</sup> 和 Lewis<sup>y</sup> 抗原,为包含以 α 1,2 连接的岩藻糖末端的聚糖。此处使用的术语聚糖是指不考虑其它的修饰(例如与其它另外的单糖单元、多肽、脂质或其它生物或非生物分子的连接),两个或更多个亚单元单糖单元通过糖苷键连接在一起形成的化合物,该糖苷键即为一个单糖的 α 或 β 构型的异头羟基和第二个单糖的任何合适的羟基之间的共价键。我们可以将包含少数、通常 3 至 35 个或更多组分糖的糖聚合物称为寡糖。此处描述的所有寡糖均表示为:非还原糖的名称或缩写(即 Gal),然后是糖苷键的构型(α 或 β),环键(1 或 2),然后是朝向该分子还原末端的下一个糖的名称或缩写(即 GlcNAc)。标准糖生物学命名的总结参见 *Essentials of Glycobiology*, Varki

等人, eds., 1999, ColdSpring Harbor Laboratory Press。

[0054] 分泌者抗原的特定形式可以改变, 并部分取决于最小二糖前体的结构或由其装配成特定抗原的核心序列。核心序列可为乳糖 I 型结构 - 半乳糖 ( $\beta$  1-3)N- 乙酰葡萄糖胺 -R( 在此缩写为 {Gal ( $\beta$  1-3)GlcNAc} -R) 或乳糖 II 型结构 - 半乳糖 ( $\beta$  1-4)N- 乙酰葡萄糖胺 -R( 在此缩写为 {Gal ( $\beta$  1-4)GlcNAc} -R)。在最小的非偶联的核心序列中, R 可为 H 或其它小分子残基。二糖前体还可与较长的聚糖偶联, 作为寡糖或作为糖脂、肽、蛋白质、粘蛋白或其它大分子的聚糖部分。

[0055] 因此, 例如, H-1 抗原是由 I 型前体如下产生的: 通过 FUT2( 或 FUT1) 催化将岩藻糖残基以  $\alpha$  1, 2 连接添加到 I 型前体的半乳糖部分来产生 { 岩藻糖 ( $\alpha$  1-2) 半乳糖 ( $\beta$  1-3) N- 乙酰葡萄糖胺 } 结构, 其缩写为 {Fuc ( $\alpha$  1-2)Gal ( $\beta$  1-3)GlcNAc}。H-1 抗原为另一分泌者抗原 Lewis<sup>b</sup> 的结构性前体。Lewis<sup>b</sup> 分泌者抗原包括 H-1 结构加上与 GlcNAc 部分非末端  $\alpha$  1, 4 连接的第二个岩藻糖残基, 构型为 { 岩藻糖 ( $\alpha$  1-2) 半乳糖 ( $\beta$  1-3) [ 岩藻糖 ( $\alpha$  1-4) ] N- 乙酰葡萄糖胺 }, 缩写为 {Fuc ( $\alpha$  1-2)Gal ( $\beta$  1-3) [Fuc ( $\alpha$  1-4) ]GlcNAc}。

[0056] 相应地, H-2 抗原是由 II 型前体如下产生的: 通过 FUT2( 或 FUT1) 催化将岩藻糖残基以  $\alpha$  1, 2 连接添加到 II 型前体的半乳糖部分来产生 { 岩藻糖 ( $\alpha$  1-2) 半乳糖 ( $\beta$  1-4) N- 乙酰葡萄糖胺 } 结构, 其缩写为 {Fuc ( $\alpha$  1-2)Gal ( $\beta$  1-4)GlcNAc}。H-2 抗原为另一分泌者抗原 Lewis<sup>y</sup> 的结构性前体。Lewis<sup>y</sup> 分泌者抗原包括 H-2 结构加上与 GlcNAc 部分非末端  $\alpha$  1, 3 连接的第二个岩藻糖残基, 构型为 { 岩藻糖 ( $\alpha$  1-2) 半乳糖 ( $\beta$  1-4) [ 岩藻糖 ( $\alpha$  1-3) ] N- 乙酰葡萄糖胺 }, 缩写为 {Fuc ( $\alpha$  1-2)Gal ( $\beta$  1-4) [Fuc ( $\alpha$  1-3) ]GlcNAc}。

[0057] 分泌者抗原可包括单  $\alpha$  1, 2 岩藻糖取代的核心序列, 其中 R 为 H 或其它小基团。可选地, 分泌者抗原可包括一系列重复的取代的核心序列, 其中 R 为另一核心序列。单核心序列或重复核心序列可存在于较大的糖中。因此, 含分泌者抗原的寡糖可为例如三糖、四糖、五糖等。分泌者抗原还可与另一大分子 ( 例如多肽或脂质 ) 共价连接。单取代的核心序列还可直接与多肽或脂质连接, 例如 R 可为蛋白质或脂质, 或可存在于结合到多肽或脂质上的多糖中。分泌者抗原可通过 N 联糖基化 ( 即通过天冬酰胺残基 ) 或通过 O 联糖基化 ( 例如通过丝氨酸、苏氨酸、羟基脯氨酸、酪氨酸或其它含羟基残基 ) 共价连接到多肽上。包括分泌者抗原的糖蛋白包括例如但不限于粘蛋白、胆汁盐刺激的脂肪酶 (BSSL) 和乳粘着蛋白。携带分泌者抗原的脂质的例子包括但不限于 H-1 糖脂、H-2 糖脂、Le<sup>x</sup> 糖脂和 Le<sup>y</sup> 糖脂。

[0058] Lewis 抗原

[0059] Lewis 抗原可作为含 Lewis 表位即含 H-1、H-2、Le<sup>a</sup>、Le<sup>b</sup>、Le<sup>x</sup> 和 / 或 Le<sup>y</sup> 表位的任何聚糖存在, 这些表位为  $\alpha$  1, 3 或  $\alpha$  1, 4- 连接的岩藻糖基化的寡糖部分。这包括游离的寡糖、糖脂、糖蛋白、粘蛋白、糖胺聚糖和糖肽。个体可表达表达 H-1、H-2、Le<sup>a</sup>、Le<sup>b</sup>、Le<sup>x</sup> 和 / 或 Le<sup>y</sup> 表位的聚糖。

[0060] 唾液酸化抗原

[0061] 唾液酸化抗原可作为含唾液酸化的抗原的任何聚糖存在, 包括游离的寡糖、糖脂 ( 例如神经节苷脂 )、糖蛋白、粘蛋白、糖胺聚糖和糖肽。个体可表达唾液酸化表位, 包括神经节苷脂和表达唾液酸化 Lewis<sup>a</sup> (sLe<sup>a</sup>)、sLe<sup>b</sup>、sLe<sup>x</sup> 和 / 或 sLe<sup>y</sup> 表位的其它聚糖。

[0062] 测定分泌者抗原

[0063] 一种或多种分泌者抗原的水平可在任何本领域已知包含分泌者抗原的生物流体

中测定。生物流体的例子包括但不限于唾液、血清、血浆、母乳、羊水、汗液、尿液、眼泪、粘液、淋巴液和大便。生物流体样品可使用本领域已知的保持分泌者抗原结构的任何标准方法从个体中采集。唾液样品可使用棉签、擦拭、抽吸、刮擦或通过润洗个体的嘴和吐到试管或收集器中进行收集。血液样品可通过静脉穿刺技术获得。血清样品可通过使用标准方法（例如离心已凝固的血液样品）从全血制备。血浆样品可通过离心已使用抗凝剂（例如肝素）处理的血液样品获得。母乳可通过手工或机械挤压收集。可在收集之后立即测定生物流体样品的分泌者抗原。可选地或另外地，可使用本领域已知的保持分泌者抗原结构的方法（例如冷冻、干燥或冻干）储存生物流体样品用于后续分析。

[0064] 在确定生物样品中特定的分泌者抗原的水平之后，该水平可与那些标准参照水平相比较。标准参照水平通常代表来自较大个体群体的平均分泌者抗原水平。参照群体可包括与研究个体具有相似的年龄、身体大小、种族背景或一般健康状况的个体。参照群体的 FUT2 基因型可以是已知的，也可以是未知的。因此，患者样品中的分泌者抗原水平可与来自下述个体的数值进行比较：1) 表达野生型 FUT2 且其体液包含分泌者抗原的个体；2) 表达 FUT2 的变异形式且具有中等至低 FUT2 活性且其体液包含低水平的分泌者抗原的个体；或 3) 具有很低或不具有 FUT2 活性且其体液不含分泌者抗原的个体。

[0065] 通常，升高的分泌者抗原水平可以是高于对照样品中的分泌者抗原水平或高于来自作为分泌者的正常健康个体群体的样品中的分泌者抗原平均水平的任何分泌者抗原水平。降低的分泌者抗原水平可以是低于对照样品中的分泌者抗原水平或低于来自作为分泌者的正常健康个体群体的样品中的分泌者抗原平均水平的任何分泌者抗原水平。任何群体大小可用于确定来自作为分泌者的正常健康个体群体的样品中的分泌者抗原平均水平。例如，包含 2 至 250 个例如 2、3、4、5、10、15、20、25、30、40、50、100、150、200、250 个或更多个体的群体可用于确定来自正常健康个体群体的样品中分泌者抗原的平均水平，来自较大样品群体的检测具有更好的精确性。

[0066] 降低的分泌者抗原水平可比对照样品中的水平或比来自正常健康个体群体的样品中的分泌者抗原平均水平低 10、20、30、50、60、70、80、90、100%。在一些情况下，降低的分泌者抗原水平可比对照样品中的水平或比来自正常健康个体群体的样品中的分泌者抗原平均水平低 2、3、4、5、10、20、50 或更多倍。

[0067] 在一些情况下，参照表可用于确定样品中特定分泌者抗原的特定水平是否比对照样品或较大群体低或正常。例如，参照表可包含与研究个体具有相同的年龄、胎龄、种族背景或一般健康状况的健康婴儿中发现的分泌者抗原水平的正常范围。通过使用这一参照表，样品中测定的分泌者抗原的任何水平可被分类为比对照样品或比来自较大群体的平均值低、正常或高。

[0068] 可选地或另外地，生物样品中的分泌者抗原的水平可相对于一种或多种另外的生物标记（例如另一组织血型抗原，例如 P 或唾液酸化抗原）的水平“标准化”，该另外的生物标记的表达独立于个体的分泌者状态。也就是说，另外的标记的水平可与分泌者抗原的水平同时或不同时地平行进行评估。另外的标记可作为样品制备、处理和储存以及天与天之间测定变异性的内对照。分泌者抗原和另外的标记的水平值可表示为比例，该比例可与来自对照样品或群体的相似的比例进行比较。有用的第二标记的例子包括但不限于其表达独立于分泌者 (FUT2) 表达的 Lewis 抗原，即 Lewis a 和 Lewis x。Lewis 抗原通常包括具有

被一个或多个岩藻糖基残基取代的乳糖 I 型结构或乳糖 II 型结构作为核心序列的碳水化合物。因此,例如,有用的第二标记可为 Lewis a { 半乳糖 (β 1-3) [ 岩藻糖 (α 1-4) ]N- 乙酰葡萄糖胺},其缩写为 {Gal (β 1-3)Fuc (α 1-4)GlcNac},或 Lewis x { 半乳糖 (β 1-4) [ 岩藻糖 (α 1-3) ]N- 乙酰葡萄糖胺,其缩写为 {Gal (β 1-4) [Fuc (α 1-3) ]GlcNac},或这些表位的唾液酸化、硫酸化或硫酸 - 唾液酸化形式。还可以使用其它通常表达的非 Lewis 血型抗原,例如 Lua (Lutheran a)、P1 和 P2 (P 血型系统的主要抗原)、M 和 N、Fya 和 Fy b (Duffy 系统的抗原) 等。

[0069] 此外,由于个体基因表达水平的随机变异在生物系统中是常见的,理想的是将分泌者抗原的水平相对于已知其表达独立于个体的分泌者状态的一组两个或多个其它生物标记进行标准化。这一策略可使在确定分泌者抗原的水平时更加精确。

[0070] 一旦计算了个体中相对于对样品中的分泌者抗原的相对水平,就可以评估个体患胃肠炎、坏死性小肠结肠炎、迟发型脓毒症或死亡的相对风险。可以使用本领域已知的用于评估相对风险的任何统计方法。一种合适的方法为分类与回归树 (Classification and Regression Tree, CART) 特征曲线分析。CART 分析属于非参数回归方法家族,该分析是基于递归分配来建立决策树,用于优化地将个体分类为高和低风险组。它可用于基于测试的灵敏性 (即检测到的真实病例数) 和特异性 (即精确性) 之间的平衡来系统地确定使预测值最大化并且使病例和非病例误分类最小化的连续变量中的截点。这两种变量还可被认为是阳性预测值和阴性预测值,并与诊断的精确性相关。由 CART 分析产生的决策树可经接受者操作曲线 (Receiver Operating Curve, ROC) 分析验证,以确定曲线下面积 (AUC),其表明了决策树关系区分病例和非病例的有效性。

[0071] 在一个例子中,CART 分析表明被分类为低或非分泌者 (即处于 H-2 唾液表达的第 38 百分位数或更低 (由 O. D. 值确定)) 的个体患 NEC 和死亡的风险加大。因此,其分泌者抗原的水平处于第 38、33、30、25、20、15、10、5 或更低百分位数的个体患 NEC 或死亡的几率比其分泌者抗原水平高于第 38 百分位数的个体高 4 至 5 倍。在表达很少或不表达分泌者抗原的那些个体中,最高风险组由那些也高度表达唾液酸化 Lewis a 抗原的个体组成。表达很少或不表达分泌者抗原和表达高水平的唾液酸化 Lewis a 抗原的婴儿患 NEC 或死亡的风险比其它所有婴儿高 6 倍多。因此,高风险组可仅由很少或无 H-2 抗原来定义,或者由很少或无 H-2 抗原和中等至高水平唾液酸化 Lewis a 抗原的组合来定义。基于该对比和其它临床指标,临床医生可以预测出患者患 NEC 的几率,并相应调整治疗方案。

[0072] 个体的分泌者状态可通过多种方式进行确定。分泌者抗原的水平可直接在生物流体中进行测定。例如,分泌者抗原水平的测定可以使用基于免疫的测定,例如 ELISA 测定、放射性免疫测定、与免疫检测联合的一维或二维凝胶电泳、或使用基于表面等离子体共振的生物传感器、或使用色谱技术 (例如高效液相色谱 (HPLC) 或气相色谱 (GC)) 或使用光谱法 (例如质谱法)。可选地或另外地,FUT2 的活性可通过使用标准酶学方法在生物样品中测定。此外,FUT2 mRNA 的水平可使用本领域已知的多种方法进行定量 (作为生物样品中 FUT2 活性水平的替代),例如 RT-PCR 或定量 RT-PCR (例如 Kroupis C, Stathopoulou A, Zygalki E, Ferekidou L, Talieri M, Lianidou ES. Clin Biochem. 2005 Jan ;38(1) :50-7, Dyer J, Chisenhall DM, Mores CN. J Virol Methods. 2007 Oct ;145(1) :9-13) 或例如 cDNA 或寡核苷酸阵列的基于杂交的定量技术 (例如 Duggan D. J., Bittner M., Chen Y., Meltzer P. 和

Trent J. M. Nat Genet 21(1 Suppl) :10-4(1999) ;Cheung V. G. , Morley M. , Aguilar F. , Massimi A. , Kucherlapati R. 和 Childs G. Nat Genet 21(1Suppl) :15-9(1999)。

[0073] 人分泌者 FUT2 mRNA 序列示于图 7(GenBank®登录号 NM\_000511.4) 中,人分泌者 FUT2 蛋白质序列示于图 8(GenBank®登录号 NP\_000502.4) 中。

[0074] 最后,个体的 FUT2 基因型可通过单核苷酸多态性分析 (SNP) 或基于 RT-PCR 的技术确定。

[0075] 免疫测定

[0076] 免疫测定方法是本领域技术人员公知的。用于检测特定分泌者 Lewis 抗原 (例如 H-1、H-2、Lewis<sup>b</sup> 和 Lewis<sup>y</sup>) 和其它 Lewis 抗原 (例如 Lewis<sup>a</sup> 和 Lewis<sup>x</sup>) 的抗体试剂可通过使用标准抗体制备方法产生或从商业渠道购买。抗体可为单克隆的或多克隆的或其任意组合。有用的抗体可包括对分泌者或聚糖表位特异性的单克隆和多克隆抗体、单链抗体、嵌合抗体、双功能 / 双特异性抗体、人源化抗体、人抗体和互补决定区 (CDR)- 嫁接的抗体,还包括抗体片段,包括 Fab、Fab'、F(ab')<sub>2</sub>、scFv、Fv、camelbodies 或微抗体。此外,能够特异性地结合和检测特定分泌者抗原的核酸或肽适体试剂可使用公开的标准方法 (例如 The use of aptamers in large arrays for molecular diagnostics, Brody E. N., Willis M. C., Smith J. D., Jayasena S., Zichi D. 和 Gold L. Mol Diagn 4(4) :381-8(1999)) 产生。

[0077] 因此,在一些实施方案中,特定的抗 H-1、抗 H-2、抗 Lewis<sup>b</sup> 或抗 Lewis<sup>y</sup> 单克隆抗体或适体可对 H-1 和 H-2、Lewis<sup>b</sup>、和 Lewis<sup>y</sup> 以外的抗原分别具有小于约  $1 \times 10^5 K_a$  的结合亲和力。在一些实施方案中,抗 H-1、抗 H-2、抗 Lewis<sup>b</sup> 或抗 Lewis<sup>y</sup> 抗体为以至少  $1 \times 10^8 K_a$  的亲和力结合 H-1、H-2、Lewis<sup>b</sup> 和 Lewis<sup>y</sup> 的单克隆抗体。

[0078] H-1 和 H-2、Lewis<sup>b</sup> 和 Lewis<sup>y</sup> 的任何形式可用于分别产生抗 H-1、抗 H-2、抗 Lewis<sup>b</sup> 或抗 Lewis<sup>y</sup> 抗体或适体,其包括最小的三糖或二糖结构或其携带表位的片段,以及含有这些表位的任何聚糖。非常合适的抗 H-1、抗 H-2、抗 Lewis<sup>b</sup> 或抗 Lewis<sup>y</sup> 抗体或适体为具有足以在体内识别和结合它们各自靶标的亲和力和特异性的那些抗体或适体。此处使用的术语表位是指聚糖的抗原决定簇。

[0079] 特定的结合碳水化合物的抗体或适体可为 1) 显示结合活性的阈值水平和 / 或 2) 与已知的相关聚糖分子无显著交叉反应的分子。本领域普通技术人员可以容易地确定抗体或适体的结合亲和力,例如通过 Scatchard 分析 (Scatchard, Ann. NY Acad. Sci. 51 : 660-672, 1949)。在一些实施方案中,抗体或适体可结合到它们的目标表位或模拟诱饵上,其对目标聚糖的亲和力比其对与目标聚糖有一定同源性的其它聚糖的亲和力至少高 1.5 倍、2 倍、5 倍、10 倍、100 倍、 $10^3$  倍、 $10^4$  倍、 $10^5$  倍、 $10^6$  倍或更多。

[0080] 在一些实施方案中,抗体或适体以  $10^{-4}M$  或更低、 $10^{-7}M$  或更低、 $10^{-9}M$  或更低的高亲和力或以亚纳摩尔亲和力 (0.9、0.8、0.7、0.6、0.5、0.4、0.3、0.2、0.1nM 或更低) 与 H-1 或 H-2、Lewis<sup>b</sup> 或 Lewis<sup>y</sup> 相结合。在一些实施方案中,抗体或适体对 H-1 或 H-2、Lewis<sup>b</sup> 或 Lewis<sup>y</sup> 的结合亲和力为至少  $1 \times 10^6 K_a$ 。在一些实施方案中,抗体或适体对 H-1 或 H-2、Lewis<sup>b</sup> 或 Lewis<sup>y</sup> 的结合亲和力为至少  $5 \times 10^6 K_a$ 、至少  $1 \times 10^7 K_a$ 、至少  $2 \times 10^7 K_a$ 、至少  $1 \times 10^8 K_a$  或更大。对于抗体或适体还可在它们对 H-1 和 / 或 H-2、Lewis<sup>a</sup>、Lewis<sup>b</sup>、Lewis<sup>x</sup> 和 / 或 Lewis<sup>y</sup> 的结合亲和力方面进行描述或说明。在一些实施方案中,结合亲和力包括  $K_d$  小于  $5 \times 10^{-2}M$ 、 $5 \times 10^{-5}M$

至  $5 \times 10^{-7} \text{M}$ 、 $5 \times 10^{-8} \text{M}$  至  $5 \times 10^{-10} \text{M}$ 、 $5 \times 10^{-12} \text{M}$  至  $5 \times 10^{-14} \text{M}$  或更低的结合亲和力。

[0081] 抗体或适体可通过本领域普通技术人员已知的色谱方法进行纯化,包括离子交换和凝胶过滤色谱法(例如 Caine 等人, *Protein Expr. Purif.* (1996) 8(2):159-166)。可选地或另外地,抗体或适体可从商业渠道购买,例如 Abcam、Biovendor Laboratory、Calbiochem、Signet Laboratories、Accurate Chemical and Scientific Corporation 和 EMD。

[0082] 分泌者抗原的水平可通过使用本领域普通技术人员已知的任何免疫测定方法在生物样品中测定。例如,在非竞争性免疫测定中,分泌者抗原“夹心”在两个抗体即捕获抗体和检测抗体之间。典型地,捕获抗体共价或非共价地结合在例如管或孔的固相上,而检测抗体在 ELISA 测定中偶联到酶上或者在 RIA 测定中被放射性同位素标记。在 ELISA 分析中,检测抗体可以共价连接到酶上,或者其自身可被通过生物偶联连接到酶上的第二抗体检测到。通过添加在切割后产生可检测的可量化信号的酶底物(例如发色或发荧光的分子)来分析特异性抗体结合。在 RIA 测定中,通过测定结合在支持物上的放射性水平确定特异性抗体结合。

[0083] 在竞争性免疫测定中,样品中的抗原(分析物)与标记抗原(示踪物)竞争有限数量的抗体结合位点。将结合的抗原从过量的不结合抗体的分析物中分离出来。经  $\gamma$  计数器和分光光度计测定,未知样品中分析物的量与标记抗原的量成反比。竞争性免疫测定的例子包括双抗体放射性免疫测定(RIA)、包被管 RIA 和包被孔酶免疫测定(EIA)。可以使用的固相支持物的一些例子包括板、管、聚苯乙烯珠、尼龙、硝化纤维素、醋酸纤维素、玻璃纤维和其它类型的多孔聚合物。合适的标记包括放射性核素、荧光团、化学发光标记、生物发光标记、酶(例如 ELISA 系统中使用的酶)、染料或颗粒(例如胶体金或量子点)。

[0084] 设计用于同时检测一种或多种特定的分泌者和 Lewis 抗原的测定系统和试剂盒也包括在本方法的范围内。试剂盒可以设计为浸棒式(dip-stick)、流通式或迁移式以及本领域普通技术人员已知的其它形式。如果希望的话,该测定可自动化,以确保标准化和获得更高的通量。

[0085] FUT2 活性测定

[0086] 可以使用本领域已知的 FUT2 特定的任何标准方法来测定生物样品中 FUT2 的活性。例如,岩藻糖基转移酶测定可在含  $3 \mu \text{M}$  MGDP- $^{14}\text{C}$  岩藻糖、 $5 \text{mM}$  ATP、 $25 \text{mM}$  磷酸钠 pH 6.0、 $40 \mu \text{g}$  来自细胞提取物的总蛋白质和作为受体底物的苯基  $\beta$ -D-半乳糖苷或脱唾液酸胎球蛋白(asialofetuin)的  $20 \mu \text{l}$  反应体积中进行。反应混合物在  $37^\circ\text{C}$  下温育 2 小时,并通过添加  $1 \text{ml}$  的水来中止反应。通过将反应产物通过  $\text{C}_{18}$  反相柱来纯化疏水的岩藻糖基化苯基  $\beta$ -D-半乳糖苷产物。通过微纤维膜(GF/C; Whatman)过滤来纯化放射性标记的脱唾液酸胎球蛋白产物,并通过使用液体闪烁计数器来测定其放射性。Nanthakumar NN, Dai D, Newburg DS, Walker WA. The role of indigenous microflora in the development of murine intestinal fucosyl- and sialyltransferases. *FASEB J* (2002 年 11 月 15 日) 10: 1096/fj.02-0031fje(summary; *FASEB J* 2003; 17: 44-6)。

[0087] FUT2 基因分型分析

[0088] 可以使用本领域已知的任何标准方法(例如 SNP 分析或 RT-PCR 技术)进行 FUT2 基因分型。确定导致低水平 FUT2 活性的 SNP 包括 TRP143TER(428G-A) 和

ILE129PHE(385A-T)。在一些非分泌者中还发现 FUT2 基因完全缺失。用于确定单核苷酸多态性 (SNP) 的方法是本领域公知的,例如 Ahmadian A., Gharizadeh B., Gustafsson A. C., Sterky F., Nyrén P., Uhlén M. 和 Lundeberg J. *Anal Biochem* 280(1):103-10(2000); Griffin T. J., Hall J. G., Prudent J. R. 和 Smith L. M. *Proc Natl Acad Sci U S A* 96(11):6301-6(1999); Nickerson D. A., Kaiser R., Lappin S., Stewart J., Hood L. 和 Landegren U. *Proc Natl Acad Sci U S A* 87(22):8923-7(1990)。

#### [0089] 其它测定

[0090] 荆豆凝集素 (*Ulex europaeus*) - 一种特异性地与  $\alpha$ -1-岩藻糖反应的植物凝集素 - 可用作检测分泌者抗原特别是 H-2 的基础。当与胶体金偶联的荆豆凝集素在合适的条件下接触含分泌者抗原的样品时,荆豆凝集素 - 胶体金会发生聚集,从而产生可检测的颜色改变。

[0091] 简而言之,在确定稳定胶体金所需的最小量的 UEA1 和最优的 pH 条件之后,荆豆凝集素 (UEA1) (Sigma-Aldrich; St Louis, MO) 与胶体金偶联。将 2  $\mu$ L 未处理的测试唾液添加到硝化纤维素条上,放置干燥 5 分钟;添加 200  $\mu$ L 1.0% 酪蛋白的 TBS 溶液,在室温下温育 3 分钟。除去酪蛋白溶液;以最优的稀释度添加包含于 0.05% 酪蛋白 TBS 溶液中的 150  $\mu$ L 的 UEA1-胶体金偶联物,并温育 10 分钟。可检测的颜色变化表明样品中存在分泌者抗原。对照样品为已知为 H-2 阳性或阴性的唾液样品。

#### [0092] 治疗方法

[0093] 此处公开的方法还可用于治疗存在患感染性和炎性疾病的风险的婴儿。该治疗方法可以完全或部分消除感染性或炎性疾病的一些或全部指征和症状、降低症状的严重性、延缓它们的发作或减轻后续发展的症状的进展或严重性。

[0094] 该治疗方法对感染性和炎性疾病是有用的。该方法可用于足月儿、早产儿或极低出生体重儿。足月儿包括在 37 至 42 周胎龄期间出生的婴儿;早产儿通常为在小于 37 周胎龄出生的婴儿。极低出生体重儿 (ELBW) 通常被定义为出生体重低于 1000g (21b, 3oz) 的婴儿。大多数的 ELBW 婴儿也是最年轻的早产儿,通常在 27 周胎龄或更小时出生。出生体重低 (< 2500g) 的 10 个婴儿中有接近 1 个婴儿为 ELBW 婴儿。

[0095] 可使用此处描述的方法检测的感染性和炎性疾病包括坏死性小肠结肠炎 (NEC)、胃肠道感染、胃肠道炎症和脓毒症。这些疾病可由病患、损伤或未知原因导致,它们也可受个体的基因组成的影响。

[0096] 在 NEC 中,部分的肠发生坏死,即组织死亡。尽管 NEC 能够影响胃肠道,但是在很严重的情况下它才可能具有严重的系统性影响。最初的症状可能是轻微的,可包括以下一种或多种症状:喂养不耐受、胃排空延迟、腹部膨胀和 / 或敏感、肠梗阻 / 肠鸣音降低,以及在晚期出现的腹壁红斑和便血。

[0097] 系统性指征是非特异性的,并可包括呼吸暂停、昏睡、外周灌注降低、休克 (在晚期)、心血管性虚脱和出血素质 (消耗性凝血病) 的任意组合。非特异性的实验室异常可包括下述症状:低钠血、代谢性酸中毒、血小板减少、伴有左移的白细胞减少或白细胞增多、中性白细胞减少、凝血酶原时间延长、激活部分促凝血酶原激酶时间延长、纤维蛋白原减少和血纤蛋白分裂产物升高 (在消耗性凝血病的情况中)。尽管确切的病因学是未知的,但是病因学可能是多因素的并且涉及异常细菌菌群、肠局部缺血和 / 或再灌注损伤以及肠粘膜不

成熟中的任何或所有原因。

[0098] 婴儿的胃肠道感染包括下述症状：腹泻；大便带粘液或血；呕吐；脱水；口渴；情绪低落；粘膜干燥；囟门凹陷；皮肤充盈降低；毛细血管填充时间减少；心动过速；脉搏微弱、血压降低；或皮肤充盈隆起或破损。感染物可以是细菌、真菌、病毒或寄生虫。细菌病原体的例子包括但不限于葡萄球菌属的种、金黄色葡萄球菌、大肠杆菌、链球菌属的种、肠杆菌属的种、克雷伯氏菌属的种、芽孢杆菌属的种、沙雷氏菌属的种、沙门氏菌属的种、志贺氏菌属的种、弯曲杆菌属的种 (*Campylobacter* spp.)、耶尔森氏菌属的种和艰难梭菌 (*Clostridium difficile*)。真菌病原体的例子包括但不限于念珠菌属的种。寄生虫生物的例子包括但不限于隐孢子虫属的种 (*Cryptosporidium* spp.)、贾第虫属的种、溶组织内阿米巴 (*Entamoeba histolytica*)、环孢子虫属的种 (*Cyclospora* spp)。病毒生物的例子包括但不限于轮状病毒、巨细胞病毒、肠腺病毒、星状病毒、腺病毒型 40 或 41、诺瓦克和其它诺瓦克病毒和札如病毒 (*sapovirus*)。新生儿脓毒症的临床指征为非特异性的，并与病原微生物的特征和身体对侵袭的响应相关。新生儿脓毒症可分为早发型或迟发型。85% 的具有早发型感染的新生儿在 24 小时内发病，5% 在 24-48 小时内发病，较少百分比的患者在 48 小时和 6 天之间发病。在早产儿中发作最迅速。婴儿会出现明显休克伴有面白、毛细血管灌注差和水肿。休克的这些指征指示严重的损害，并与死亡率密切相关。脓毒症的指征包括任何或所有的心脏指征，例如早期肺动脉高压、心输出量减少、血氧不足、伴有心博徐缓和系统性低血压的心输出量进行性减少；代谢指征，例如低血糖、高血糖、代谢性酸中毒和黄疸；神经性指征，例如脑膜炎、室炎、蛛网膜炎、脉管炎、静脉炎、血栓形成、脑水肿、梗塞、麻木和应激性、意识损害（即伴有或不伴有应激性的麻木）、昏迷、癫痫发作、前囟门膨出、伸肌僵硬、灶性脑指征、颅神经指征、颈背僵硬、脑脊髓液 (CSF) 中的改变，例如白细胞计数升高、蛋白质水平升高、CSF 葡萄糖浓度降低和阳性培养结果。在患有新生儿脓毒症和脑膜炎的个体中观察到体温的不稳定性，这是由于对细菌性微生物分泌的热原的响应或由于交感神经系统的不稳定性。新生儿最有可能出现体温过低。婴儿还有可能出现音调降低、昏睡和喂养效果差。当出现迟发型脑膜炎时，最有可能出现神经性过兴奋的指征。新生儿脓毒症的其它指征还包括血液学指征，例如血小板减少、白细胞计数 (WBC) 异常、嗜中性粒细胞计数 (PMN 和未成熟形式) 异常、未成熟嗜中性粒细胞计数与总嗜中性粒细胞计数的比例异常、弥散性血管内凝血 (DIC)、凝血酶原时间 (PT) 异常、部分促凝血酶原激酶时间 (PTT) 异常和纤维蛋白原和 D 二聚物水平异常；和胃肠道指征，例如坏死性小肠结肠炎。

[0099] 导致迟发型脓毒症的生物包括凝固酶阴性葡萄球菌、金黄色葡萄球菌、大肠杆菌、克雷伯氏菌属的种、假单胞菌属的种、肠杆菌属的种、B 族链球菌、沙雷氏菌属的种、不动杆菌属的种 (*Acinetobacter* spp.) 和念珠菌属的种。婴儿的皮肤、呼吸道、结膜、胃肠道和脐可能被来自环境的生物定植 (*colonized*)，从而可能由侵袭性微生物导致迟发型脓毒症。用于该定植的载体包括脉管或尿管、其它留置管路或照顾者与细菌定植的接触。

[0100] 基于它们的聚糖表型（分泌者、Lewis 或唾液酸化抗原表达）被确定为存在患感染性和炎性疾病（例如 NEC、胃肠道感染和脓毒症）的风险的婴儿可使用包括一种或多种保护剂的疗法进行治疗。除非特别说明，本文使用的术语“剂”广泛地指以临床有益的方式（例如抑制病原体与宿主细胞表面聚糖的结合）影响胃肠道系统的目标分子或目标区域的任何物质。有用的保护剂包括例如人母乳喂养、益生生物体、益生菌或  $\alpha$  1,2 岩藻糖基聚

糖。

[0101]  $\alpha$  1,2 岩藻糖基聚糖为包含以  $\alpha$  1,2 连接的岩藻糖末端的糖,因此是分泌者抗原的同系物,即它们包括以  $\alpha$  1,2 构型共价连接到岩藻糖残基的最小的二糖前体或核心序列。核心序列可为乳糖 I 型结构 - 半乳糖 ( $\beta$  1-3)N- 乙酰葡萄糖胺 -R,在此缩写为 {Gal ( $\beta$  1-3)GlcNAc} -R,或乳糖 II 型结构 - 半乳糖 ( $\beta$  1-4)N- 乙酰葡萄糖胺 -R,在此缩写为 {Gal ( $\beta$  1-4)GlcNAc-R},其中 R 为 H、小的基团或另一单糖、二糖或多糖或糖蛋白或糖脂。这些糖可为游离的寡糖或偶联为及表达为糖蛋白、糖脂或其它结构。偶联和非偶联形式的寡糖一起被划分为聚糖。因此, $\alpha$  1,2 岩藻糖基聚糖可包括 2、3、4、5、6、7、8、9、10、12、14、16、18、20、24、28、32、36 或更多个糖;一个或多个糖以  $\alpha$  1,2 构型与岩藻糖残基共价连接,因此聚糖可以包括 1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、18 或更多个岩藻糖残基。合适的  $\alpha$  1,2 岩藻糖基聚糖的例子包括但不限于可溶形式或作为益生生物的部分的 2' - 岩藻糖基乳糖 (2' -FL);乳糖 -N- 岩藻戊糖 -I (LNF-I);乳糖 -N- 二岩藻己糖 -I (LDFH I);乳糖二岩藻四糖 (LDFT) 或连接到糖脂、糖肽、糖蛋白、粘蛋白或其它骨架上的这样的岩藻糖基聚糖表位。 $\alpha$  1,2 岩藻糖基聚糖可使用本领域普通技术人员已知的方法从天然来源例如奶、奶制品或植物产物中纯化得到。可选地或另外地,聚糖可根据本领域已知的方法从天然存在的前体或合成的模板经化学合成得到。此外,可通过使用本领域公知的生物合成酶,在体外或者使用特定的工程化微生物(例如细菌或酵母)在体内经酶催化合成聚糖。

[0102] 保护剂还可以是益生生物体,即那些被宿主摄取后可以以有益于宿主的方式改造肠内微生物群体的活微生物。益生生物体可给细菌和细菌产物穿过粘膜的转移提供增强的屏障,可竞争性地排除潜在的病原体,改造宿主对微生物产物的响应并通过抑制病原体(例如肺炎克雷伯氏菌 (*Klebsiella pneumoniae*)、大肠杆菌和白色念珠菌 (*Candida albicans*)) 生长的方式来提高肠的营养。

[0103] 益生生物体通常包括细菌和酵母。益生生物体的种类可以变化,但是对婴儿合适的种类包括乳杆菌 (*Lactobacilli*),例如鼠李糖乳杆菌 (*Lactobacillus rhamnosus*)GG、嗜酸性乳杆菌 (*L. acidophilus*)、干酪乳杆菌 (*L. casei*)、植物乳杆菌 (*L. plantarum*)、路氏乳杆菌 (*L. reuteri*);和双歧杆菌 (*Bifidobacteria*),例如婴儿双歧杆菌 (*Bifidobacterium infantis*)、双歧双歧杆菌 (*B. bifidum*)、短双歧杆菌 (*B. breve*)、动物双歧杆菌乳酸亚种 (*B. animalis* subsp. *lactis*)、长双歧杆菌 (*B. longum*),以及嗜热链球菌 (*Streptococcus thermophilus*)。有用的酵母种类包括鲍氏酵母 (*Saccharomyces boulardii*) 和乳酸克鲁维酵母 (*Kluyveromyces lactis*)。益生生物体可为天然存在的,或者它们可以是工程化的,即生物体可具有能够使其获得理想的性质(例如但不限于表达分泌者抗原的能力)的基因。益生生物体可以单独或组合施用。市售的益生制剂包括例如包含嗜酸乳杆菌/婴儿双歧杆菌的 Infloran<sup>®</sup> (Istituto Sieroterapico Berna, 科摩,意大利)、包含婴儿双歧杆菌、双歧双歧杆菌和嗜热链球菌的 ABC Dophilus (Solgar, 以色列) 和包含鼠李糖乳杆菌的 Dicoflor (VitisPharma, 华沙,波兰)。保护剂也可以是益生素,即通过选择性地刺激结肠中一种或有限数量的细菌的生长和/或活性能够有利地影响宿主的不可消化的食物成分。与将外源性细菌引入结肠微生物群的益生物质相反,益生素能够刺激一种或有限量的潜在促进健康的原有微生物(例如双歧杆菌或乳杆菌)的生长。益生素的例子包括果糖 - 寡糖,例如菊粉、木寡糖和半乳糖 - 寡

糖。益生菌可从天然来源分离出来,例如菊苣根、大豆、洋姜、菜豆、洋葱、大蒜、燕麦、小麦和大麦。

[0104] 一种有用的益生菌为菊粉,一种类型的果聚糖(果糖的聚合物)。菊粉类型的果聚糖由通过 $\beta$ -2,1键连接的 $\beta$ -D-呋喃果糖组成。该链的第一个单体为 $\beta$ -D-吡喃葡萄糖基或 $\beta$ -D-吡喃果糖基残基。不同形式的菊粉和菊粉片段可从商业渠道获得,例如聚合度(DP)为2-60的菊粉可从菊苣根(Raftiline ;Orafti, Tienen, 比利时)中提取而成;通过菊粉的部分酶促水解生成的寡果糖的DP小于10(Raftilose ;Orafti),且其中小分子量的低聚物已被去除的菊粉被称为高效菊粉(Raftiline HP ;Orafti)。通过在果糖基转移酶催化的反应中使用作为底物的蔗糖和1,2- $\beta$ 果聚糖,可以产生DP小于4的合成低分子量果聚糖(Neosugar 或 Actilight ;Beghin-Meji Industries, 巴黎)。

[0105] 保护剂可以单独或组合地直接施用于患者。通常,保护剂可悬浮在药物可接受的载体(例如生理盐水或缓冲盐水溶液)中以利于它们的递送。将保护剂包封于合适的递送载体(例如聚合物微粒或可植入性装置)中可增加递送效率。可以通过将此处提供的任意保护剂与药学上可接受的载体相组合来制备组合物。这样的载体可包括但不限于无菌水溶液或非水溶液、悬浮液和乳液。非水溶剂的例子包括但不限于矿物油、丙二醇、聚乙二醇、植物油和可注射用有机酯。水性载体包括但不限于水、醇、盐水和缓冲溶液。还可以存在防腐剂、调味剂和其它添加剂,例如如抗微生物剂、抗氧化剂(例如没食子酸丙酯)、螯合剂、惰性气体等。应当理解,将要向哺乳动物施用的在此描述的任何材料都可以包含一种或多种药学上可接受的载体。

[0106] 可选地或此外,保护剂可与婴儿食物源(例如挤出的母乳或市售的婴儿配方食品)组合使用。此处描述的任何组合物可对宿主身体的任何部分施用,然后再递送到胃肠道中。组合物可被递送到例如哺乳动物的口腔、鼻粘膜、血液、肺、肠、肌肉组织、皮肤或腹膜腔。关于递送途径,组合物可经静脉内、颅内、腹膜内、肌肉内、皮下、肌肉内、直肠内、阴道内、气管内、皮内或经皮注射施用、口服或经鼻施用,或随时间逐渐灌注。在另一例子中,组合物的气溶胶制剂可通过吸入给予宿主。

[0107] 保护剂的所需剂量取决于药剂的性质、施用途径、制剂的性质、患者疾病的性质、患者的体积、体重、表面积、年龄和性别、正在施用的其它药物和主治医师的判断。考虑到保护剂的不同以及各种施用途径的效率不同,可以预期所需的剂量也会有很大变化。这些剂量水平的变化可通过使用本领域公知的用于优化的标准经验程序来进行调节。施用可为单次或多次(例如2或3、4、6、8、10次或更多次)。将保护剂包封在合适的递送载体(例如聚合微粒)中可增加递送的效率。

[0108] 使用此处提供的任何组合物的治疗期可以从短至1天至,只要可能在临床上怀疑有增加的风险,例如新生儿特护病房停留期或婴儿期的整个时间。例如,保护剂可每日几次、每日一次或每周一次(例如持续4周至几个月)施用。还应当注意,治疗频率也可以变化。例如,保护剂可每日、每周或每月施用一次(或两次、三次等)。

[0109] 有效量的在此提供的任何组合物均可向存在疾病风险或需要治疗的个体施用。此处使用的术语“有效的”是指在患者中能够诱导理想的响应但不会诱导显著的毒性的任何量。这样的量可通过评估患者在施用已知量的特定组合物后的响应来确定。此外,如果存在的话,毒性水平可通过评估患者在施用已知量的特定组合物之前和之后的临床症状来确

定。应当注意,向患者施用的特定组合物的有效量可根据理想的结果和患者的响应和毒性水平来调节。每个特定患者的显著的毒性可能不同,并且取决于多种因素,包括但不限于患者的疾病状态、年龄和对副作用的耐受。

[0110] 此处提供的保护剂可与其它预防或治疗形式联合向存在患感染性或炎性疾病(例如 NEC、胃肠道感染或脓毒症)的风险的个体施用。保护剂可在使用其它药物或治疗处理之前、同时或之后施用。其它的治疗可包括施用抗生素,例如万古霉素、卡那霉素、庆大霉素、头孢噻肟、克林霉素或甲硝唑,经肠一起施用 IgG 和 IgA、氨基酸补充、使用血小板激活因子(PAF)拮抗剂或施用 PAF-乙酰水解酶、施用多不饱和的脂肪酸、施用表皮生长因子和出生前皮质类固醇。保护剂还可与其它喂养方案一起施用或除其它喂养方案以外施用,其它喂养方案包括合理地施用人母乳喂养、婴儿配方食品、非肠道流体、延迟或缓慢的喂养。

[0111] 本文还提供了对基于分泌者状态被确定为存在患 NEC 或胃肠道感染的风险的婴儿确定疗程的方法。婴儿食品源中分泌者抗原(例如  $\alpha$  1,2 岩藻糖基聚糖)的水平可与对照样品中相同分泌者抗原的水平相比较;食品源中分泌者抗原的水平相对于对照样品中的那些分泌者抗原的水平可分为降低或升高。其分泌者状态表明存在患 NEC 和胃肠道感染的风险且其食物源也包含降低水平的分泌者抗原的那些婴儿可使用  $\alpha$  1,2 岩藻糖基聚糖、益生生物体或益生菌中的一种或多种进行治疗。

[0112] 婴儿的食品来源可为来自婴儿母亲或供体源的母乳,或市售的婴儿配方食品。人乳或配方食品中的一种或多种分泌者抗原的水平可通过使用例如 ELISA、色谱法或其它方法测定,并与上述的对照样品中的水平进行比较。

[0113] 人乳寡糖通常在还原末端包含乳糖部分,在非还原末端包含岩藻糖。以  $\alpha$  1,2 连接将岩藻糖添加到寡糖上主要是通过由分泌者基因 Se (FUT2) 产生的岩藻糖基转移酶催化的;以  $\alpha$  1,3 或  $\alpha$  1,4 连接的方式添加岩藻糖是通过由 Lewis 基因、Le (FUT3) 或该家族的其它  $\alpha$  1,3 转移酶基因 (FUT4、5、6、7 和 9) 产生的岩藻糖基转移酶催化的。2- 和 3/4- 岩藻糖基转移酶的活性的变化可能是由于无活性的或部分活性的遗传多态性。这样的变化可产生特定岩藻糖基寡糖的相对量不同的母乳表型。为非分泌者的女性在其母乳或其它体液中不表达可测定到的 2- 连接的岩藻糖基寡糖。但是,母乳岩藻糖基寡糖的表达甚至在分泌者之间也可能是不同的,1,2- 连接的岩藻糖基寡糖与仅含 1,3- 和 1,4- 连接的岩藻糖的那些岩藻糖基寡糖的比例在哺乳期的第一年中成指数下降。

[0114] 合适的  $\alpha$  1,2 岩藻糖基聚糖的例子包括但不限于与 H-2 同源的 2' - 岩藻糖基乳糖 (2' -FL)、与 H-1 同源的乳糖 -N- 岩藻戊糖 I (LNF-I)、与 Lewis<sup>b</sup> 同源的乳糖 -N- 二岩藻己糖 I (LDFH I)、与 Lewis<sup>y</sup> 同源的乳糖 - 二岩藻四糖 (LDFT) 以及与 Lewis<sup>a</sup> 同源的乳糖 -N- 二岩藻己糖 II (LNF-II) 和与 Lewis<sup>x</sup> 同源的乳糖 -N- 二岩藻己糖 III (LNF-III)。核心类型 1 结构,即乳糖 -N- 四糖 (LNT),为乳糖上的末端 Gal  $\beta$  1,3GlcNAc。乳糖为母乳中最丰富的 2 型结构 (2' -FL、3-FL 和 LDFT) 的核心,而乳糖末端上的乳糖 -N- 新四糖,即 Gal  $\beta$  1,4GlcNAc,为 LNF-III 的核心。在其它组织中,Lewis 结构部分是基于乳糖胺骨架 (Gal-GlcNAc);但是人乳中最普遍的 2 型岩藻糖基寡糖是由乳糖 (Gal-Glc) 合成的,因此被定义为 2 型 Lewis 结构的葡萄糖类似物。也可发现这些结构的表位在母乳的各种糖偶联物中表达,这些糖偶联物可用于预防和 / 或治疗目的。

[0115] 其食品供应包含水平降低的分泌者抗原的婴儿可通过喂养上述的  $\alpha$  1,2 岩藻糖

基聚糖、益生生物体或益生菌经肠补充。

[0116] 实施例

[0117] 实施例 1 :细菌定植诱导肠糖基化的改变。

[0118] 肠中岩藻糖基化和唾液酸化聚糖的表达在发育中发生改变,使人联想到在整个哺乳期在母乳中见到的改变。在小鼠的小肠中, Fut2mRNA 和  $\alpha$  1,2/3- 岩藻糖基转移酶活性在断奶时急剧增加,而唾液酸转移酶活性的表达降低。这两种酶活性的反转与断奶时粘膜聚糖表达的急剧改变和肠微生物群的组成的改变相一致。如下所述检测这些改变的诱导是经过内在的遗传程序还是通过饮食或成人微生物群的外部控制。

[0119] 在断奶时正常发生的岩藻糖基转移酶的向上调节不会在无菌的小鼠中发生。但是,只要断奶后的无菌小鼠被定植,岩藻糖基转移酶和岩藻糖基化就会被诱导。这表明细菌定植诱导了粘膜表面的岩藻糖基化。这在通过饮用抗生素混合物消耗细菌 (BD) 的成熟小鼠中得到了证实。两周后, Fut2mRNA 和岩藻糖基转移酶的活性下降到无菌小鼠的水平,且岩藻糖基聚糖 ( 荆豆凝集素 1[UEA-1] 染色 ) 在结肠中不再表达。停止抗生素治疗和正常微生物群充足 (XBD) 使得 Fut2mRNA 和岩藻糖基转移酶活性恢复到正常定植的成熟肠的水平,并使得在粘膜表面上完全表达岩藻糖基聚糖。这证实了肠的岩藻糖基化受其定植的控制。

[0120] 假定细胞外定植造成细胞内 ERK 和 JNK 途径激活的机理涉及未确定的跨膜受体。已知一个跨膜受体家族 toll 样受体 (TLR) 能够感知在细胞外存在微生物独特的模式识别分子并通过跨细胞信号转导途径将信号传送给核。因此,我们测试了一个 TLR 家族成员是否有可能对细菌与肠粘膜之间导致结肠粘膜中细菌诱导的 Fut2mRNA 和岩藻糖基转移酶活性的通讯负责。如野生型小鼠那样,携带 TLR2 突变的小鼠能够表达正常的岩藻糖基化,而该岩藻糖基化随着定植的丧失而丧失 ( 图 12, 下页 )。相反, TLR4 突变体或其下游介体 MyD88 不表达完全水平的岩藻糖基化,且该岩藻糖基化不受定植丧失的影响。这与细菌诱导的粘膜岩藻糖基化所必需的 TLR4 信号转导途径是一致的。为了测试细菌耗尽小鼠中 TLR4 自身的激活是否足以激活刺激 Fut2 表达的转导途径,将 TLR4 的特异性配体 LPS 添加到饮用水中,施用给细菌耗尽小鼠。当使用超纯的 LPS 处理时, BD 小鼠结肠的岩藻糖基转移酶活性和 Fut2mRNA 恢复到正常成年小鼠的水平。相反,在使用 TLR2 的配体肽聚糖 (PG) 处理的 BD 小鼠中,岩藻糖基转移酶活性和 Fut2mRNA 的水平保持在 BD 小鼠的较低水平上。这些数据强烈提示 :细菌耗尽小鼠中 TLR4 的结合和刺激是关键信号,该信号对成年肠微生物群发出导致肠岩藻糖基化的上皮核事件的信号是必要的且足够的。

[0121] 如果与岩藻糖基化 TLR4 的结合是定植诱导的粘膜岩藻糖基化的关键信号,那么预期与岩藻糖结合的微生物群的亚组能够重现这一现象。使用混合微生物群中利用岩藻糖的种类来验证该假说。脆弱拟杆菌是在典型成熟哺乳动物微生物群中发现的利用岩藻糖的特定细菌。细菌耗尽小鼠中脆弱拟杆菌的单定植诱导的岩藻糖基化与混合微生物群的再定植诱导的程度相同,其由诱导的 Fut2mRNA 介导,并与负责诱导岩藻糖表达的混合微生物群中利用岩藻糖的细菌一致。如果是这样,可以预期不能利用岩藻糖的突变脆弱拟杆菌将失去发出诱导粘膜中岩藻糖基化的信号的能力,如右图所示。因此,在细菌耗尽小鼠中利用岩藻糖的细菌与一组岩藻糖基化表位 ( 似乎是岩藻糖基化 TLR4 ) 结合似乎足以诱导肠粘膜上的岩藻糖基化的表型。

[0122] 实施例 2:住院婴儿唾液中的组织血型抗原(聚糖)

[0123] 在辛辛那提地区新生儿重症监护室(Newborn Intensive Care Units)住院的胎龄(GA)为 24-42 周之间的 36 名婴儿在 2005 年 5 月-12 月之间入组。根据胎龄分成三组:在出生时胎龄为 24-28 周、29-32 周和大于或等于 33 周,每组 12 位受试者。排除被诊断为严重天生异常的婴儿。辛辛那提儿童医院医学中心(Cincinnati Children's Hospital Medical Center)、优秀撒马利亚医院(Good Samaritan Hospital)和大学医院(University Hospital)的研究伦理委员会(Institutional Review Boards)批准了该项研究。并获得了来自父母的书面知情同意。采集的母亲的人口统计学信息包括母亲的年龄、种族、产科史、母亲怀孕期间遇到的并发症和母亲在怀孕期间的用药。受试者入组时记录的临床和人口统计学数据包括种族、性别、胎龄、出生体重、体长和头围。在婴儿住院期间记录的研究婴儿的临床数据包括呼吸支持的需求和持续时间、肠营养的开始和类型(人乳或配方食品)、培养证明的脓毒症的事件、坏死性小肠结肠炎的发生(Be11 2 期或更高)和抗生素使用史。

[0124] 标本的采集. 在入组时和受试者住院期间每两周获得唾液标本。每位受试者最多收集 5 个标本。喂养后 1-2 个小时采集唾液标本,先使用软纱布清洗口腔中残余的奶水或配方食品,再插入无菌棉签。一旦观察到棉签沾满唾液,就将棉签转移到标本容器中。标本短暂地保持在 4°C 下,然后转移到 -80°C。总共采集到 107 个唾液标本。让沾满唾液的棉签在 1ml 磷酸缓冲盐水(PBS)中解冻 5 分钟。然后在 10,000X g 下离心标本 10 分钟,并收集上清液。各标本在 100°C 下煮沸 10 分钟,并置于 4°C 下过夜。然后再次在 10,000gx 下离心标本 10 分钟,收集上清液,分为 100ml 的等份,并置于 -80°C。

[0125] 对各抗原检测分析分别确定唾液样品的最佳稀释度。1:50 稀释的唾液标本被用于检测 Le<sup>a</sup>、Le<sup>x</sup>、H-1、H-2、唾液酸化 Le<sup>a</sup> 和唾液酸化 Le<sup>x</sup> 抗原。1:125 稀释的唾液标本被用于 Le<sup>y</sup> 的抗原检测,而 1:250 稀释的唾液标本被用于 Le<sup>b</sup> 的抗原检测。对于来自受试者个体的唾液样品的定量分析,1:50 的稀释度被用于所有的抗原。将样品包被在微量滴定板(Dynex Immunlon)上,在 4°C 下过夜。使用 5%的 Blotto 封闭后,以 1:100 的稀释度使用 Lewis 和 ABH 抗原特异性单克隆抗体(MAb)。下面的人组织血型抗原类型特异性 MAb 被用于确定组织血型表型。MAbs BG-4 抗 -H1 型、BG-5 抗 -Le<sup>a</sup>、BG-6 抗 -Le<sup>b</sup>、BG-7 抗 -Le<sup>x</sup> 和 BG-8 抗 -Le<sup>y</sup> 从 Signet Laboratories 购买。MAb BCR9031 抗 -H 2 型、BCR9010 抗 -A 和 BCRM 11007 抗 -B 从 Accurate Chemical 和 Scientific Corporation 购买。唾液酸化 Le<sup>a</sup> 和 Le<sup>x</sup> 的 MAb 为 EMD 的产品,目录号分别为 565942 和 565953。在 37°C 下温育 1 小时以后,添加辣根过氧化物酶(HRP)偶联的山羊抗小鼠 IgG、IgG3 或 IgM 抗体。每步之后,使用 PBS/Tween 溶液洗板五次。使用 TMB 试剂盒(Kirkegard & Perry Laboratories)来检测比色反应,并使用 EIA 光谱读数器(Tecan)在 450nm 的波长下读数。

[0126] 表 1 示出了在第一周和出院之前的研究中通过 ELISA 获得的平均光密度值(± 标准误差),其对象为在唾液样品中具有可检测水平的抗原的所有婴儿。单独考虑各种抗原。该分析表明:大多数分泌者抗原(Lewis<sup>b</sup>、Lewis<sup>y</sup> 和 H-2)在出生后的早产儿中存在,且分泌者抗原的表达在产后增加。如表 1 所示,在随后的时间点采集的样品中,即在婴儿出院之前采集的那些样品中,分泌者抗原(以黑体字示出)的水平较高。Lewis<sup>b</sup>、Lewis<sup>y</sup> 和 Lewis<sup>b</sup> 和 Lewis<sup>y</sup> 的水平随着时间的推移统计学显著地增加;其它分泌者抗原 H-1 和 H-2 的水平也增加,但是它们增加的速率并未达到统计学显著性。

[0127] 表 1 :早产儿唾液中的聚糖表达

[0128]

抗原	N	产后第 1 周的唾液样品*	出院前的唾液样品*	产后的 p- 值改变**
分泌者				
H-1	20	0.18 (0.08)	0.29 (0.06)	0.13
H-2	30	1.45 (0.20)	1.80 (0.21)	0.41
Lewis <sup>b</sup>	28	1.92 (0.20)	4.02 (0.45)	0.0005
Lewis <sup>y</sup>	31	2.78 (0.24)	3.90 (0.29)	0.024
Lewis(仅)				
Lewis <sup>a</sup>	32	1.22 (0.46)	1.27 (0.54)	0.82
Lewis <sup>x</sup>	26	0.71 (0.19)	0.95 (0.32)	0.40
唾液酸化				
SLe <sup>a</sup>	36	3.63 (0.61)	3.10 (0.89)	0.29
SLe <sup>x</sup>	35	1.85 (0.27)	1.61 (0.36)	0.49

[0129] \* 值表示为平均光密度 ;括号中为标准误差。

[0130] \*\*p- 值是通过使用 Student' s t- 检验确定的。

[0131] 实施例 3 :抗生素的使用和聚糖表达表型

[0132] 通过使用广义估计方程 (Generalized Estimating Equation, GEE) 来分析分泌者抗原表达、产后年龄、胎龄和抗生素使用之间的关系。在产后第一周和“出院之前”从 24 名婴儿中采集唾液样品。根据实施例 1 中描述的方法,通过使用 ELISA 来测定组织血型抗原 Lewis<sup>a</sup>、Lewis<sup>x</sup>、Lewis<sup>b</sup>、Lewis<sup>y</sup>、H-1、H-2、唾液酸化 -Lewis<sup>a</sup> (SLe<sup>a</sup>) 和唾液酸化 -Lewis<sup>x</sup> (SLe<sup>x</sup>) 的水平。根据出生时的胎龄,将婴儿分为 22-28 周、29-34 周和 35-40 周的组。对于 GEE 分析,使用组织血型抗原 O. D. 值作为因变量 (在表 2 的第 1 栏中被称为“模型”),产后的周数、胎龄组和使用抗生素的天数作为自变量。GEE 分析得到的  $\beta$  系数示于表 2 中。GEE 分析表明 :该过程 (被定义为 1-5 天的婴儿的抗生素治疗) 与产后显著降低的分泌者抗原的表达相关。

[0133] 表 2 :广义估计方程 (GEE) 分析获得的  $\beta$  系数 (SE) :对 24 名婴儿的样品测定的组织血型抗原的 O. D. 值 (因变量),在第一周和出院 (出生后 3-7 周) 之前采集两个唾液样品。产后的周数、胎龄组和使用抗生素的天数作为自变量。

[0134]

模型	产后的周数	胎龄组 *	抗生素使用的疗程数
Lewis b 和 y (组合的 O. D. 值)	0.54 (.17) ***	0.005 (.39)	-0.33 (.37)
唾液酸化 Le X	-0.10 (.08)	-0.17 (0.21)	0.52 (.14) ***

[0135] \* 胎龄组 :1 = 出生时 24-28 周, 2 = 出生时 29-32 周 ;3 = 出生时 33-40 周,

[0136] \*\*\*  $p \leq 0.001$

[0137] 实施例 4 :极低出生体重儿 (ELBW) 的结果的研究

[0138] 辛辛那提儿新生儿重症监护室的一组 192 名极低出生体重 (< 1000 克) 儿, 在出生后第一周 (第 1-7 天) 和第二周 (第 8-14 天) 收集唾液样品, 分析其分泌者抗原的表达、临床结果和坏死性小肠结肠炎 (NEC) 之间的关系。这是在辛辛那提地区具有 III 级新生儿重症监护水平的三家医院中进行的前瞻性研究, 其中婴儿分别在 2002-2004 期间加入。排除标准包括存在严重的染色体或先天性异常、诊断为囊性纤维化或由主治新生儿医生判断无法生存超过一周的医学症状。加入后, 同时获得唾液样品和人口统计学和临床数据。随后对婴儿进行每周一次的唾液样品采集。在喂养之前在 5:00am 和 10:00am 之间, 由护理或研究人员将无菌棉签置于婴儿口中并浸满唾液来收集唾液样品。样品冷冻在  $-80^{\circ}\text{C}$ 。通过取下棉签的棉花部分, 置于 1mL 的注射器中, 并使用 250mL 生理盐水洗脱所含物, 来提取唾液。图 6 为结果的散点图。

[0139] 研究群体中的 NEC 的比率为 7.8% ( $n = 15$ ); 迟发型脓毒症的比率为 34.9% ( $n = 67$ ); 死亡的比率为 9.3% ( $n = 18$ )。15 个 NEC 病例中, 病例死亡率为 60%, 在 192 名研究的婴儿中, NEC 引起的死亡率为 4.7% ( $n = 9$ )。

[0140] 根据实施例 1 中描述的方法, 通过使用 ELISA 在采自各婴儿的单个存放 (single banked) 唾液样品中测定组织血型抗原 Lewis<sup>a</sup>、Lewis<sup>x</sup>、Lewis<sup>b</sup>、Lewis<sup>y</sup>、H-1、H-2、唾液酸化 -Lewis<sup>a</sup> (SLe<sup>a</sup>) 和唾液酸化 -Lewis<sup>x</sup> (SLe<sup>x</sup>) 的水平。表达含  $\alpha$  1,2- 连接的岩藻糖的一种或多种抗原的个体被称为分泌者。20% 的 (即 39 名) 婴儿被分类为非分泌者 (无检测到的分泌者抗原); 153 名婴儿 (80%) 被分类为分泌者。

[0141] 通过使用各个体的聚糖 (分泌者抗原、Lewis 抗原和唾液酸化抗原) 值, 利用分类与回归树 (CART) 分析确定 NEC 或死亡的高风险亚组。CART 分析为使用基于树的分配在临床研究 (例如该临床研究) 中确定用于风险的诊断或预测标记的算法而建立的统计学方法。基于递归分配分析的经验统计学技术不需要参数假定, 并涉及通过由进行性二元裂分组成的决策树分离连续或分类数据的不同值。各预测变量的每个值被认为是潜在的裂分, 基于使用“杂质标准”使病例和非病例的误分类最小化来选择最佳裂分, “杂质标准”是与该节点的数据的二元裂分一起出现的残差平方和的减少。使用 CART 分析了所有 7 个抗原, 每次分析一个抗原, 产生各变量的最佳截点。然后再将由该步骤中创建的分类变量 (图 1 中部分显示) 输入第二个 CART 模型。在该步骤中, H-2 作为第一裂分 (参见图 2) 出现, 确定了 73 名婴儿分入高风险组的最低 38% 的值和以下 (O. D. 值 < 0.627)。该组包括 18 个 NEC 或死亡病例 (发生率 24.7%), 而在分入 H-2 低风险组的 119 名婴儿中仅有 6 个 NEC 或死亡病例 (发生率 5.0%,  $P < 0.0001$ )。在根据他们的唾液 H-2 被分入高风险组的 73 名

婴儿（“低分泌者”和非分泌者）中，在 CART 模型中出现第二分裂：19 名被确定为低风险（一个 NEC 或死亡病例，发生率 5.2%），54 名被确定为高风险（17 个 NEC 或死亡病例，发生率 31.5%）。该模型确定了 1 个高风险组（低和非分泌者，31.5% 的风险）和 2 个低风险组（119 名为高分泌者，19 名为非和低分泌者但是同时为低 sLe<sup>a</sup>），这两组具有几乎相同的风险，接近 5%。最后，将这 3 个节点重新输入到最终的 CART 模型中：结果为确定高风险组和所有其它组的二元分裂（图 2 和 3）。接受者操作曲线下面积分析发现，组合 H-2 和 sLe<sup>a</sup> 预测性高风险截点的该单分裂的总体预测值为 77。CART 分析总结在图 5 和 6 中。

[0142] 已经描述了本发明的一些实施方案。但是，应当理解，还可以做出许多改变，而不会偏离本发明的精神和范围。

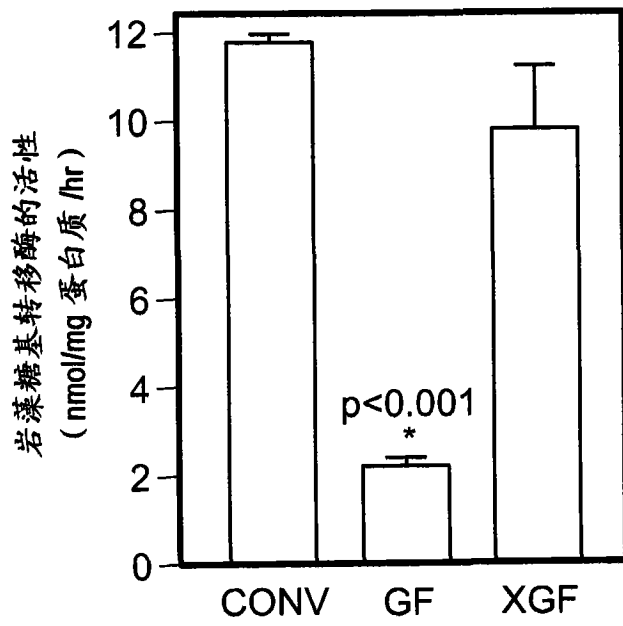


图 1A

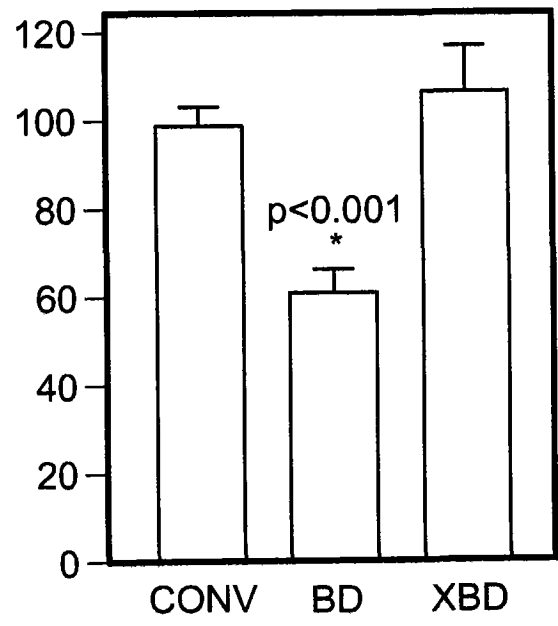


图 1B

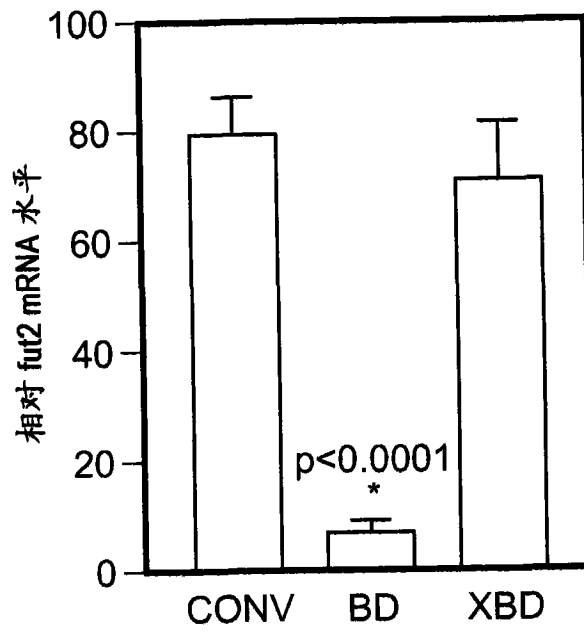


图 1C

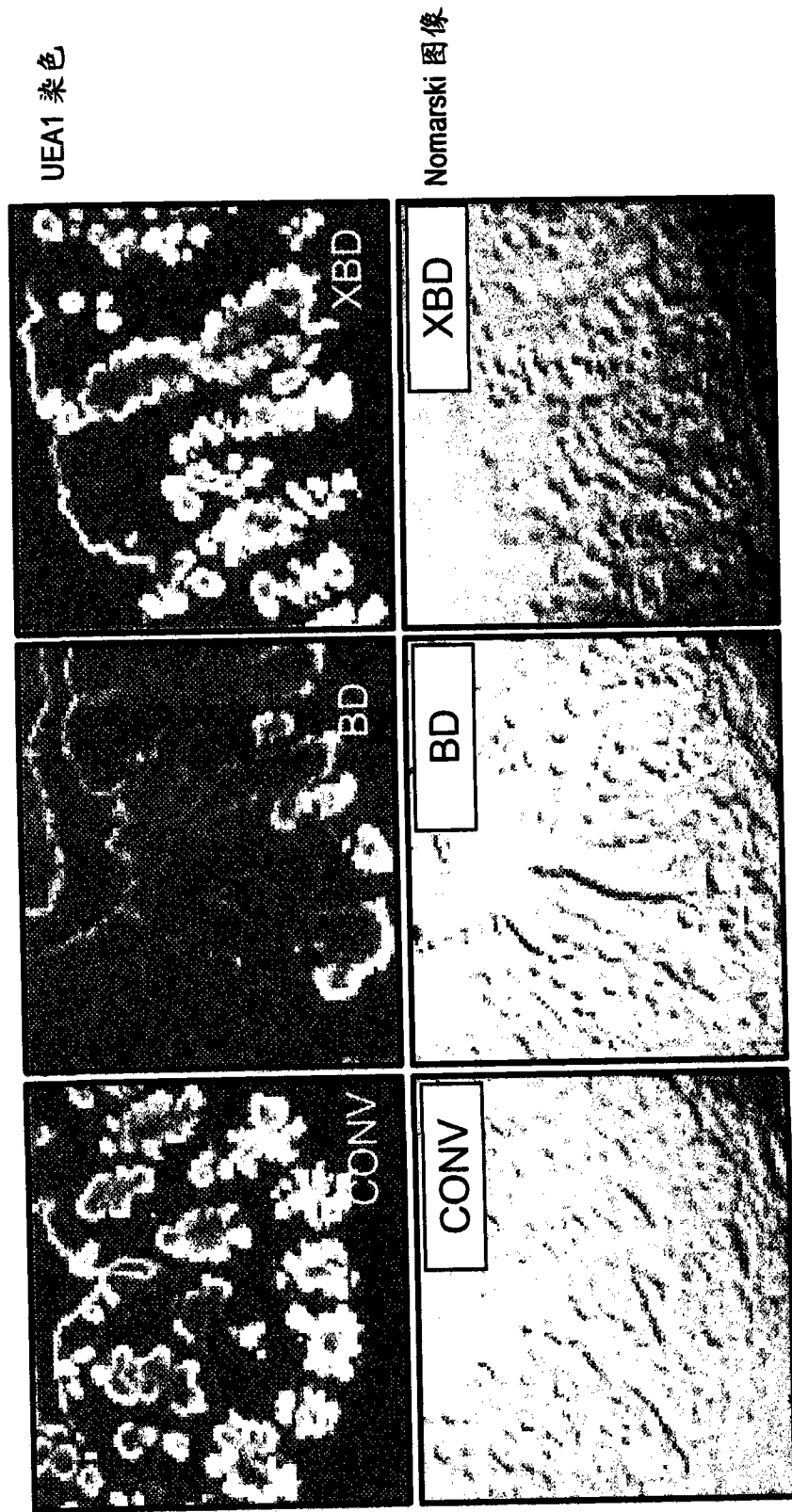


图 1D

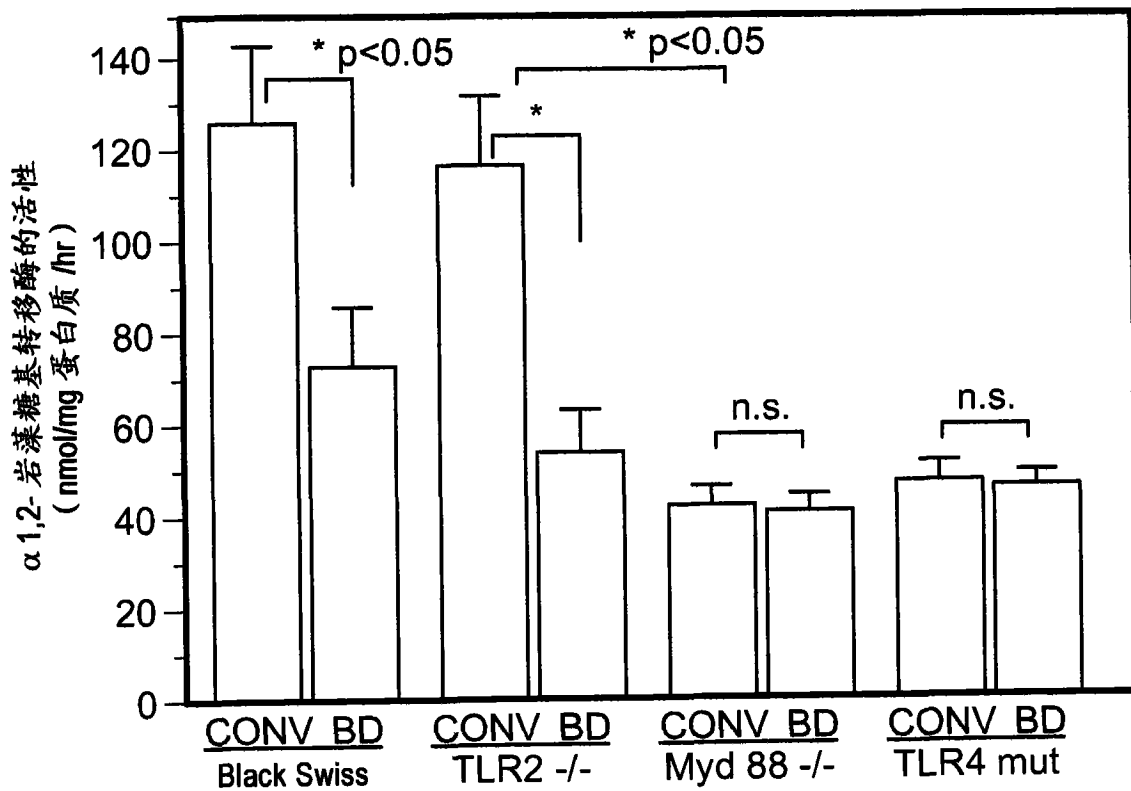


图 2A

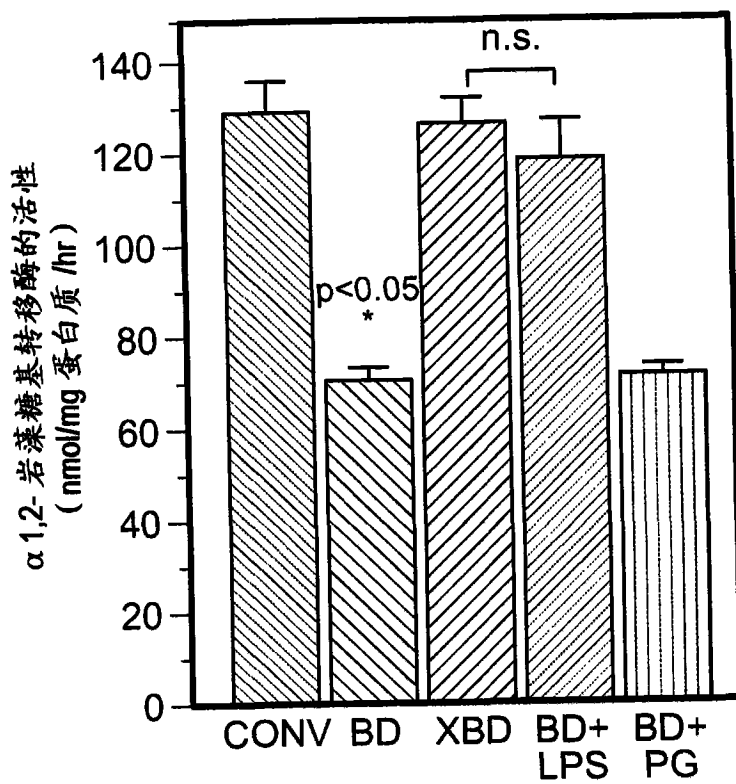


图 2B

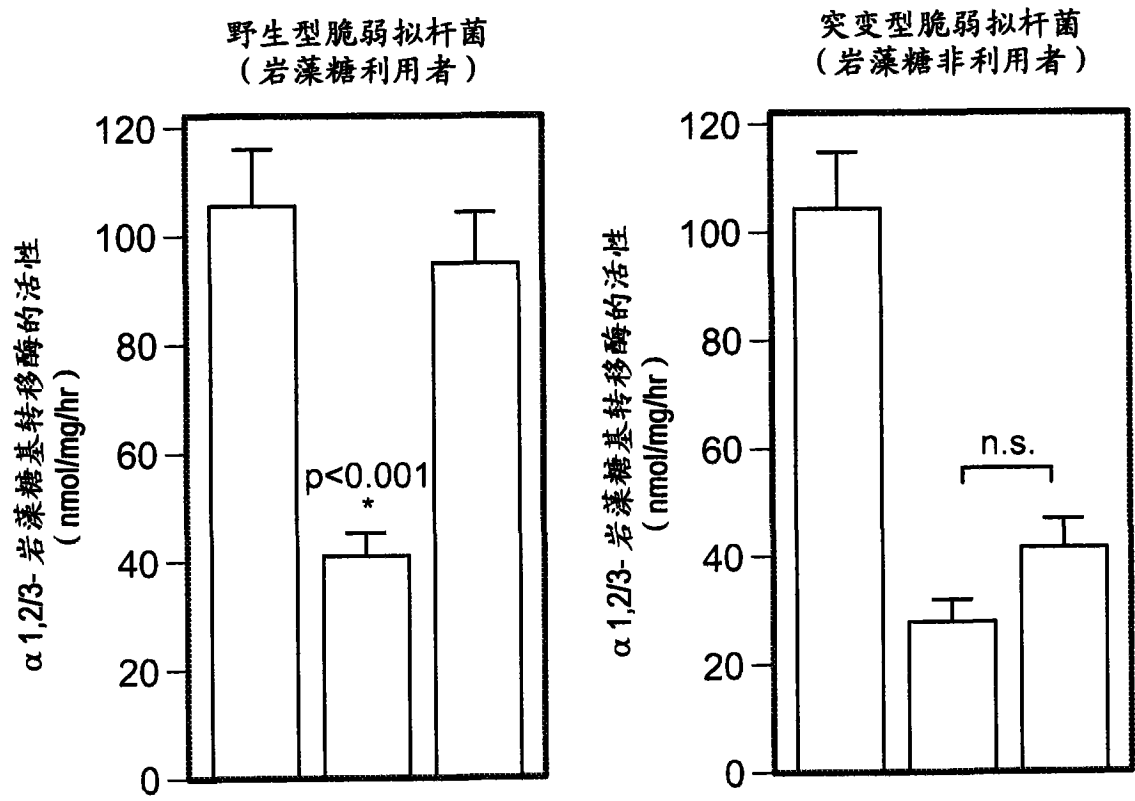


图 3A

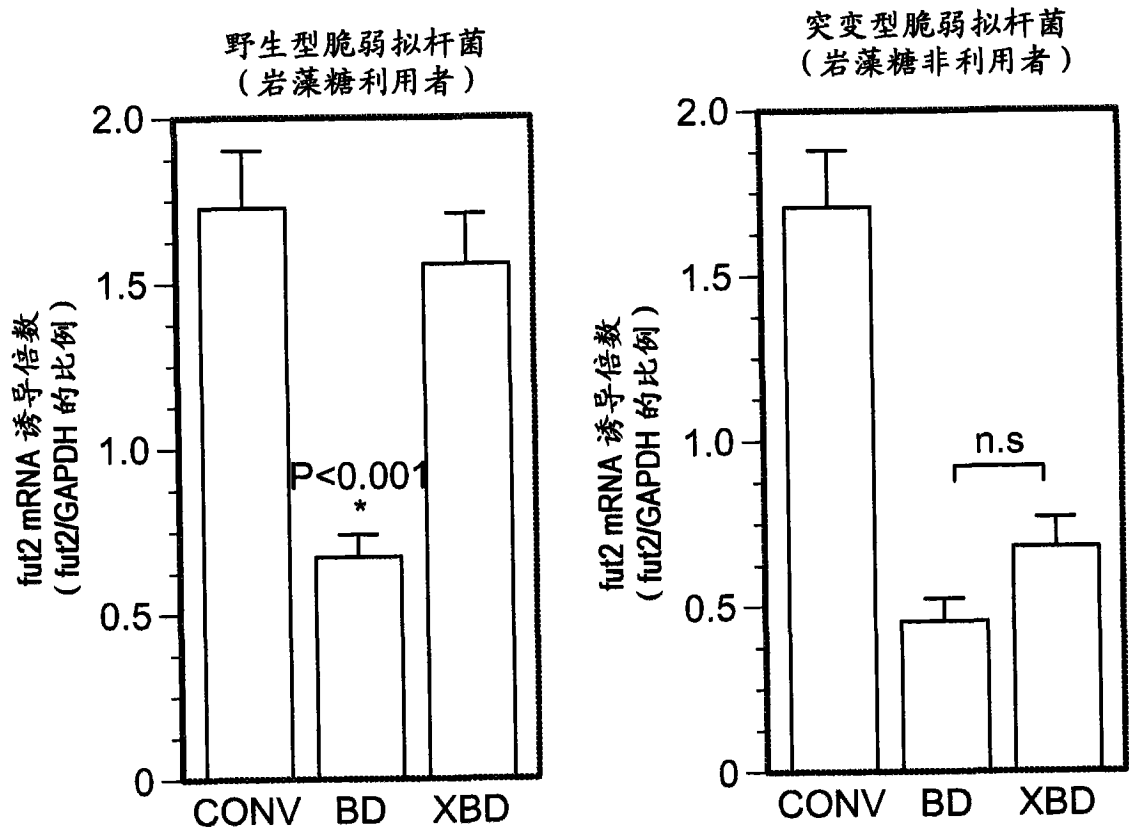
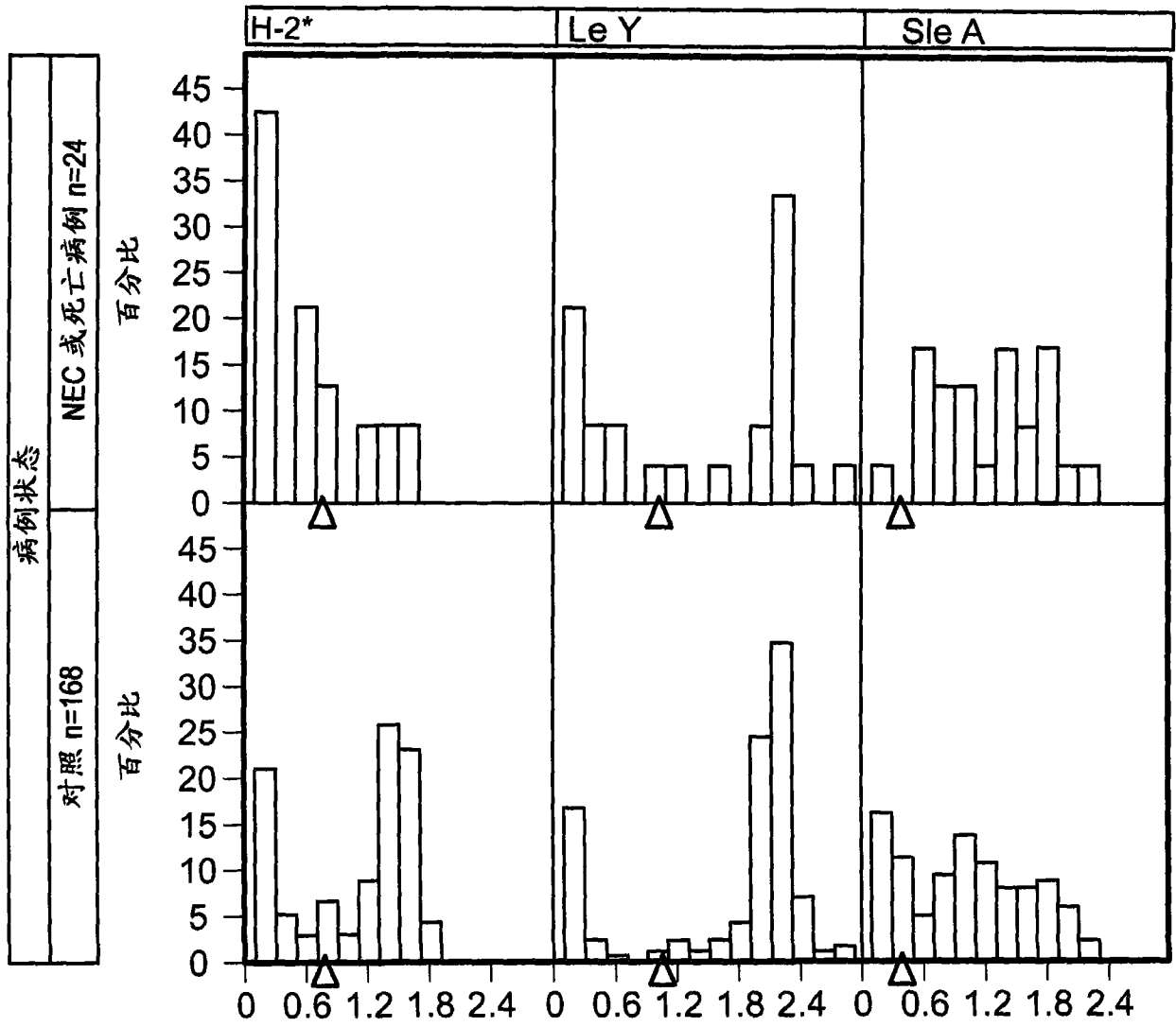


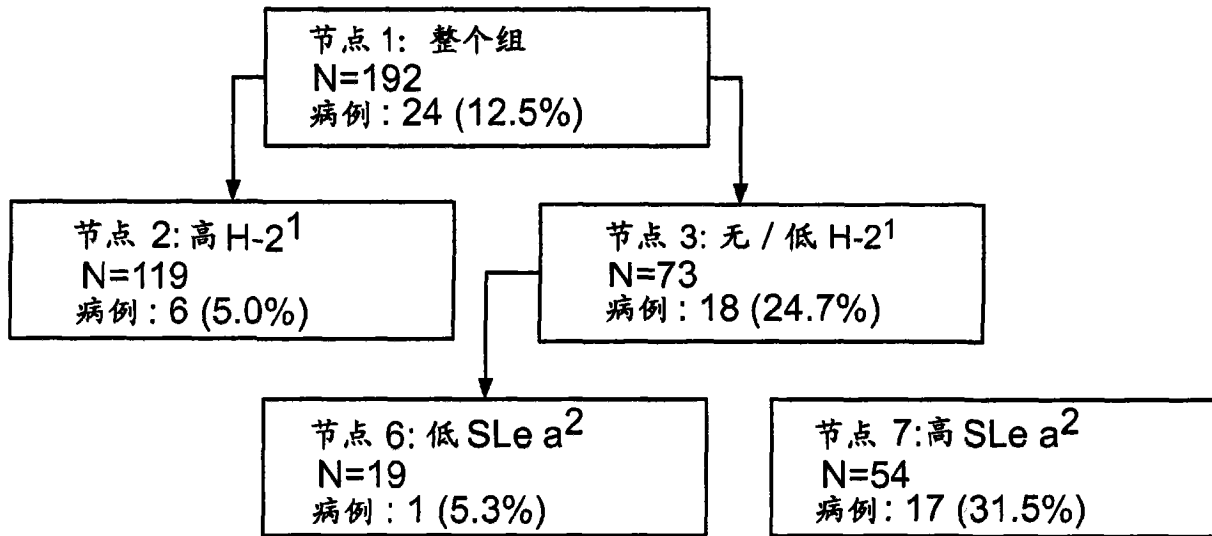
图 3B



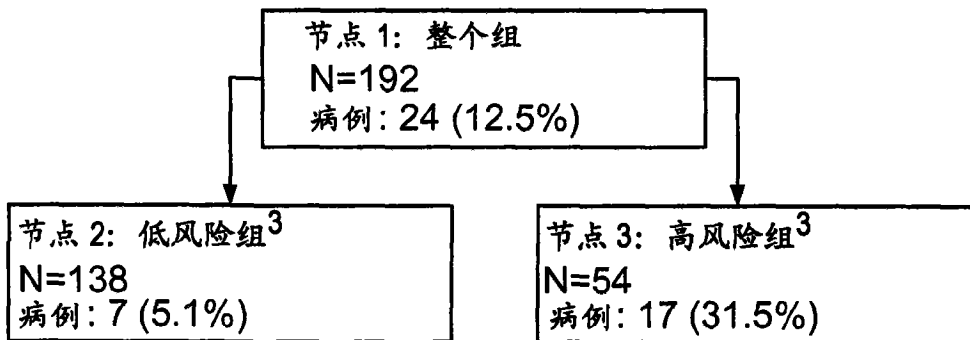
CART 截点 Δ	H-2		Le Y		SLe A	
	n	病例数 (%)	n	病例数 (%)	n	病例数 (%)
高风险组	73	18 (24.7)	47	11 (23.4)	145	23 (15.9)
低风险组	119	6 (5.0)	145	13 (9.0)	47	1 (2.1)
RR (95%CI) P- 值	4.9 (2.0, 11.8) <0.0001		2.6 (1.3, 5.4) 0.009		7.5 (1.03, 53.7) 0.013	

图 4

模型 A: 将所有抗原作为类别变量输入模型中得到的树



模型 B: 将模型 A 的 3 个最终节点输入单模型中得到的树



<sup>1</sup>非分泌者和低 H-2 分泌者 (唾液 H-2 O.D. < 0.627) 形成了一个节点;  
高分泌者 (唾液 H-2 O.D. > 0.627) 形成了其它节点

<sup>2</sup>高 SLe a 唾液表达定义为 O.D. > 0.318; 低定义为 O.D. < 0.318

<sup>3</sup>高风险组: 低到无 H-2(OD < 0.627) 和高风险 SLe a(OD > .318)

图 5

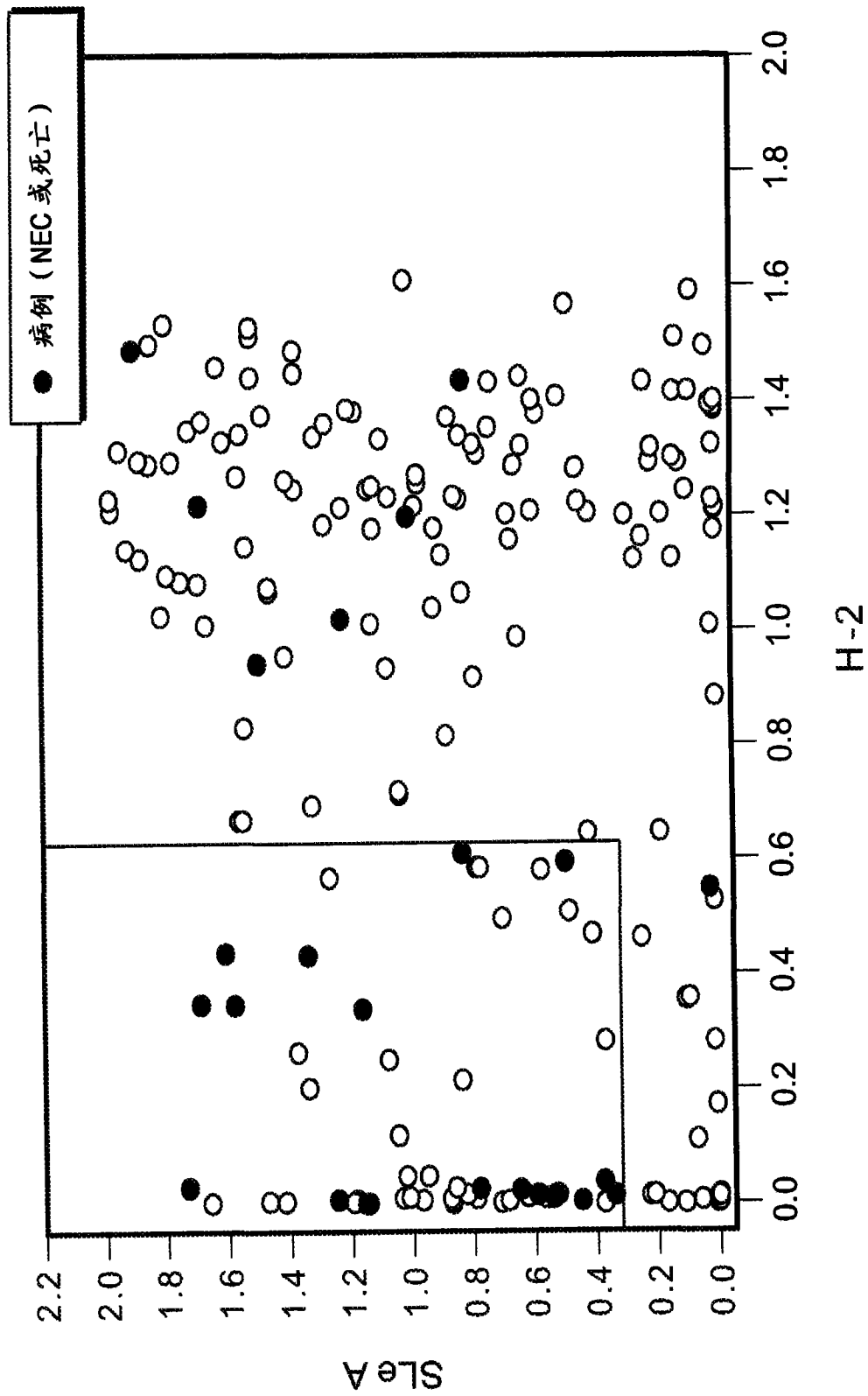


图 6

```

1 agtcaccgat gctggaaggg tttctttggc cctgagtgaa gagagaccca gagggaacac
61 tgaggtgcct gcccaaccac tctgtcccgg tttccttcag caggaccagg tgagagaagc
121 catgctggtc gttcagatgc ctttctcctt tcccatggcc cacttcatcc tctttgtctt
181 tacggtttcc actatatttc acgttcagca gcggctagcg aagattcaag ccatgtggga
241 gttaccggtg cagataccag tgctagcctc aacatcaaag gcactgggac ccagccagct
301 caggggggatg tggacgatca atgcaatagg ccgcctgggg aaccagatgg gcgagtacgc
361 cacactgtac gccctggcca agatgaacgg gcggcccggc ttcaccccgg cccagatgca
421 cagcaccctg gccccatct tcagaatcac cctgcccggg ctgcacagcg ccacggccag
481 caggatcccc tggcagaact accacctgaa cgactggatg gaggaggaat accgccacat
541 cccgggggag tacgtccgct tcaccggcta cccctgctcc tggaccttct accaccacct
601 ccgccaggag atcctccagg agttcacctt gcacgaccac gtgcccggag aggccagaa
661 gttcctgcgg ggcctgcagg tgaacgggag ccggcccggc acctttgtag gggttcatgt
721 tcgccgaggg gactatgtcc atgtcatgcc aaaagtgtgg aagggggtgg tggccgaccg
781 gcgataccta cagcaggccc tggactggtt ccgagctcgc tacagctccc tcacttctgt
841 ggtcaccagt aatggcatgg cctggtgtcg ggagaacatt gacacctccc acggtgatgt
901 ggtgtttctt ggcgatggca ttgagggctc acctgccaaa gatthtctc tactcacaca
961 gtgtaaccac accatcatga ccattgggac gttcgggatc tgggcccgat acctcacggg
1021 cggagacacc atctacctgg ccaattacac cctccccgac tcccccttcc tcaaaatctt
1081 taagccagag gcagccttcc tgcccggagt gacagggatt gccgcagacc tgtccccctt
1141 actcaagcac taatgctggc ccattctttg agaccttttc tcttctctg cctccctcaa
1201 gatgagtgcc cgggcatgag aagcacatgg ttccatgagc aggaccatc tctcttctgt
1261 gaagatgcgt tgggctgcaa gtaacagaaa tctcagtcaa cagtggcctg gcgtggtggc
1321 tcatgcctgt aatgctcgca ctttgtgagg ccagggtggg tggatcactt gaggtcagga
1381 gttcaagact agcctggcca acatggtgaa accccatctc gactaaaaat acaaaaatta
1441 gccaggcgtg gtggtgcaca cctgtaatcc cagctactcg ggaggctgag gcaagagaat
1501 cacttgaacc caggaggcgg aggttgcagt gagccaagat ggtgcccgtg cactccagtc
1561 tgggtgacac agcaagactc catctcaaaa aaaaaaaaaa aaaaaagaaa agaaaaagaa
1621 atgaatgggt tcaaagacca taatcatgca taccacataa gaccagaagt ggcccaggtc
1681 cagggtcagt taatttagcg gctccacaaa gtcacagtc acctgagctc catccatctt
1741 cacatgctgt gctaccattt cttagctgta tcatcccatg gtccccaaag ggctgctaca
1801 catccagcca tcacatgcag ataattcctt tcaaaaacag cagaaagagg ctctgttctg
1861 tcttggtecc ttttgaagaa tgaatgaaac cttcctaagc cttccagcaa tttcccccca
1921 actccgatgg gtaggaattg tcacataccc atgtgacctg ataggaggca aaagaaatga
1981 gacttctggg attagtttag cctcagattc tgcagctgag aagttgatca gccacctctg
2041 aaggacatgc agcttgcaga aaattagggt ggtgttacca aggtgaaaag gggaaatggc

```

图 7A

```

2101 tttagagtag acaacagaga tgccttgagg ggttgtgtag gttgttact gcaggaagtc
2161 ccctgggtaa gaaggcaagt ggggtttaa cagaccaca gtctactcat caaaccaggt
2221 gtccttgga ttgtgtccac ccagagagct cactgttttc tttcttttt cttttctttt
2281 tttttttttt tttgagatgg agtcttgetg catccccag gctggagtgc agtggcatga
2341 tcttggetca ctgcagcctc cgctcccag gttcaagcga ttctcctgcc tcagcctccc
2401 gagtagctag gattacaggt gcgtgccacc acgccagct aatttttata tgtttagtgg
2461 aaatggagtt tcaccatggt ggtcaggctg gtctcaaact cctgacctca tgatccgctt
2521 tcctcggcct cccaaagtgc tgggattaca ggtgttagcc actgcgcccg gccctagagc
2581 tcaactgttt ctagttagtc catctggaag tggagccttt ttccagtttg cacaaatgtg
2641 ccatattggc ttgtagctgg catgcatcca agtccatagg tctgectct tcaatcctgg
2701 ctttctaggg cctgggatga tcattgctag aactgagaga ccagcctggc tcagtgaact
2761 tcagggcggt ccgttcattc tticagtaaa tgttgcagc acatgtgta catgtcaggc
2821 agtgaaacc cccacagcag ccttccctct cagaggatac atttgtaacc attacacagt
2881 catcaaagga ataattttt ttaatcacca gtgtgcatac agtcatggag ttgggtattc
2941 ccagctacca gggaggctga ggtgggagga ttgcttgatg ccaggagtta gggaatatag
3001 tgcaccgtga ttggacttgc gaatagccac tgcactgagg cctggacgac gtagtgatac
3061 cctgactctt ataaataaat aatgaataa acacaattat gactttgagg atggg

```

图 7B

```

1 mlvvqmpfsf pmahfilfvf tvstifhvqq rlakiqamwe lpvqipvlas tskaigpsql
61 rgmwtinaig rlgngmgeya tlyalakmng rpaifipaqmh stlapifrit lpvlhsatas
121 ripwqnyhln dwmeeeyrhi pgeyvrtgy pswtfyhhl rqeilqeftl hdhvreeaqk
181 flrglqvngs rpgtfgvvhv rrgdyvhvmp kwkkgvadr rylqqaldwf rarysslifv
241 vtsngmawcr enidtshgdv vfagdgiegs pakdfalltq cnhtimtigt fgiwaayltg
301 gdtiylanyt lpdspflkif kpeaaflpew tgiaadlsp lkh

```

图 8

专利名称(译)	分泌者、Lewis和唾液酸化抗原水平作为疾病预测指标的用途		
公开(公告)号	<a href="#">CN101855554A</a>	公开(公告)日	2010-10-06
申请号	CN200880112257.9	申请日	2008-09-05
[标]申请(专利权)人(译)	儿童医院医学中心 总医院有限公司		
申请(专利权)人(译)	儿童医院医学中心 总医院有限公司		
当前申请(专利权)人(译)	儿童医院医学中心 总医院有限公司		
[标]发明人	AL莫劳 GM鲁伊斯 帕拉希奥斯 DS纽伯格		
发明人	A·L·莫劳 G·M·鲁伊斯-帕拉希奥斯 D·S·纽伯格		
IPC分类号	G01N33/53 A23L33/00		
CPC分类号	A61K39/00 A23L1/3014 G01N33/6893 G01N2800/067 A23L1/296 G01N33/80 A61K31/702 A61K31/7028 A61K31/715 A61K38/02 A61P1/00 A61P1/04 Y02A50/471 Y02A50/473 Y02A50/491 A61K35/741 A61K35/745 A61K35/747 A61K36/06 A61K45/06		
代理人(译)	陈文平		
优先权	60/970902 2007-09-07 US		
其他公开文献	CN101855554B		
外部链接	<a href="#">Espacenet</a> <a href="#">SIPO</a>		

摘要(译)

通过测定个体生物样品中至少一种分泌者抗原的水平 and 通过将测定的所述至少一种分泌者抗原的水平与预先确定的数值或预先确定的数值范围进行比较来确定具有患坏死性小肠结肠炎及相关疾病的风险的个体。可测定的分泌者抗原包括：H-1、H-2、Lewisb和Lewisy抗原及其衍生物(例如Lewis a、Lewis x、Lewis b、Lewis y的唾液酸化形式；H-1、H-2、Lewis a、Lewis x、Lewis b或Lewis y)。

