

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 653 268**

51 Int. Cl.:

**G01N 33/68** (2006.01)

**G01N 33/92** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **05.03.2013 PCT/EP2013/054332**

87 Fecha y número de publicación internacional: **26.09.2013 WO13139582**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **05.03.2013 E 13707181 (7)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **25.10.2017 EP 2828665**

54 Título: **1-O-alkil-2-acilglicerofosfolina (PC-O) 40:1 como biomarcador para el envejecimiento saludable**

30 Prioridad:

**22.03.2012 EP 12160735**

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

**06.02.2018**

73 Titular/es:

**NESTEC S.A. (100.0%)  
Avenue Nestlé 55  
1800 Vevey, CH**

72 Inventor/es:

**COLLINO, SEBASTIANO;  
MONTOLIU ROURA, IVAN;  
MARTIN, FRANÇOIS-PIERRE;  
GUY, PHILIPPE ALEXANDRE y  
REZZI, SERGE ANDRÉ DOMINIQUE**

74 Agente/Representante:

**ISERN JARA, Jorge**

ES 2 653 268 T3

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

## DESCRIPCIÓN

1-O-alkil-2-acilglicerofosfolina (PC-O) 40:1 como biomarcador para el envejecimiento saludable

5 La presente invención se refiere en general a un estilo de vida saludable y a la prevención de trastornos crónicos relacionados con el envejecimiento. En particular, la presente invención se refiere a biomarcadores y su uso para detectar mejoras en el estilo de vida. Como tal, la presente invención proporciona, por ejemplo, 1-O-alkil-2-acilglicerofosfolina (PC-O) 40:1 como un biomarcador y un método para diagnosticar un estilo de vida que permite retrasar y/o evitar los trastornos inflamatorios crónicos relacionados con el envejecimiento que utiliza el biomarcador  
10 1-O-alkil-2-acilglicerofosfolina (PC-O) 40:1.

El envejecimiento se define como la disminución dependiente del tiempo de la capacidad funcional y la resistencia al estrés, asociada con un mayor riesgo de morbilidad y mortalidad. Además, el fenotipo de envejecimiento en humanos es muy heterogéneo y puede describirse como un mosaico complejo que resulta de la interacción de una  
15 variedad de variables ambientales, estocásticas y genéticas-epigenéticas. Décadas de investigación sobre el envejecimiento han encontrado cientos de genes y muchos procesos biológicos que están asociados al proceso de envejecimiento, pero al mismo tiempo, muchas preguntas fundamentales siguen sin respuesta o son objeto de intenso debate.

20 Estas preguntas con frecuencia no son abordables al examinar un solo gen o una única ruta, pero se abordan mejor a nivel sistémico, capturando el envejecimiento como un proceso complejo multifactorial. Además, el envejecimiento se acompaña de un estado inflamatorio crónico de bajo grado, que resulta de un desequilibrio entre los procesos pro y antiinflamatorios, un trastorno patógeno que se ha revelado crítico en el inicio de las principales enfermedades crónicas relacionadas con la edad, como la aterosclerosis, diabetes tipo 2 y neurodegeneración.

25 Dentro de esta perspectiva, el envejecimiento y la longevidad saludables adquiridos son probablemente el reflejo no solo de una menor propensión a acumular respuestas inflamatorias, sino también de un desarrollo eficaz de una red antiinflamatoria. Además, existe una creciente conciencia de la importancia de la variación en la microbiota intestinal como sus efectos sobre el sistema mamífero huésped, que ha demostrado una influencia directa en la etiología de varias enfermedades como la resistencia a la insulina, enfermedad de Crohn, síndrome del intestino irritable, obesidad y enfermedad cardiovascular.

30 La metabolómica se considera hoy en día un enfoque de sistema bien establecido para caracterizar el fenotipo metabólico, que resulta de una respuesta fisiológica coordinada a diversos parámetros intrínsecos y extrínsecos que incluyen el medio ambiente, los fármacos, los patrones dietéticos, el estilo de vida, la genética y el microbioma. A diferencia de la expresión génica y los datos proteómicos que indican la posibilidad de cambios fisiológicos, los metabolitos y sus cambios cinéticos en la concentración dentro de las células, los tejidos y los órganos, representan los puntos finales reales de los procesos de regulación fisiológica.

40 La metabolómica se ha aplicado con éxito para estudiar la modulación de los procesos de envejecimiento después de las intervenciones nutricionales, que incluyen cambios metabólicos inducidos por restricción calórica en ratones, perros y primates no humanos. Específicamente, en la población canina, los cambios profundos en el metabolismo de la microbiota intestinal se asociaron con el envejecimiento. A pesar de estos hallazgos, aún no se ha informado de un perfil completo de los mecanismos moleculares que afectan el proceso de envejecimiento. Por otra parte, aún  
45 no se ha hallado el fenotipaje metabólico de la longevidad.

En consecuencia, el objetivo de la presente invención era proporcionar a la técnica un biomarcador que se pueda detectar fácilmente y que permita diagnosticar un estilo de vida que probablemente permita diagnosticar un estilo de vida que probablemente permita un envejecimiento saludable.

50 Los presentes inventores se sorprendieron al ver que podían lograr el objetivo de la presente invención mediante el objeto de las reivindicaciones independientes. Las reivindicaciones dependientes desarrollan adicionalmente la idea de la presente invención.

55 Usando un enfoque holístico de espectroscopía de resonancia magnética nuclear  $^1\text{H}$  (RMN) en orina, y espectrometría de masas dirigida (EM) y enfoques lipídicos en suero, los inventores podrían detectar cambios en los perfiles metabólicos de una cohorte de envejecimiento bien definida que compromete a los centenarios, ancianos y adultos jóvenes.

60 El grupo de envejecimiento seleccionado representa una población homogénea de un área geográfica restringida del norte de Italia, que comprende a adultos jóvenes (31 años de edad en promedio), ancianos (70 años) y personas centenarios (100 años de edad). Entre los tres grupos de envejecimiento, los centenarios son un modelo bien aceptado de envejecimiento saludable y longevidad [Sansoni P, et al., *Exp Gerontol.* 2008; 43: 61-65; Franceschi C, et al., *Mech Aging Dev.* 2007; 128: 92-105; Cevenini E, et al., *Expert Opin Biol Ther.* 2008; 8: 1393-1405] y su envejecimiento exitoso adquirido parece estar impulsado por un equilibrio óptimo entre las fuerzas proinflamatorias y  
65 antiinflamatorias [Franceschi C, et al., *Mech Aging Dev.* 2007; 128: 92 - 105].

Los inventores se sorprendieron al encontrar profundas diferencias entre los fenotipos ancianos y centenarios donde la dinámica de la interacción entre la microbiota intestinal y el huésped, y un equilibrio neutral de respuestas inflamatorias son mucho más pronunciados en el fenotipo de longevidad.

5 Los inventores han caracterizado, mediante el uso de un enfoque metabolómico y lipidómico basado en RMN-EM complementario, tanto en orina como en suero, el fenotipo metabólico (metabotipo) del envejecimiento y la longevidad.

10 Los centenarios alcanzan los extremos de la vida humana debido a la capacidad única de posponer la enfermedad y la discapacidad en sus últimos años de vida. Los parámetros clínicos clásicos (tabla 1) muestran que los centenarios tienen una incidencia muy baja de resistencia a la insulina, tienen valores antropométricos (IMC), metabólicos (colesterol, LDL-C, HDL-C, triglicéridos), que son óptimos para su edad. Además, su función cognitiva se midió mediante el Mini-Mental State Examination (MMSE), que muestra una baja incidencia de deterioro cognitivo grave.

15 Específicamente, los centenarios presentan un fenotipo metabólico único. El perfil metabólico de la orina reveló que el fenotipo de longevidad está muy influenciado por el microbioma intestinal como se muestra por una mayor excreción de fenilacetilglutamina (PAG), sulfato de p-cresol (PCS). Los inventores postulan que la microbiota intestinal cataboliza ampliamente proteínas y aminoácidos aromáticos, que incluyen fenilalanina y tirosina, para formar fenilacetilglutamina y sulfato de p-cresol.

20 El análisis metabolómico dirigido completo basado en EM reveló cambios biológicos importantes asociados con la longevidad y el envejecimiento saludable en el suero. Además, entre los tres grupos de edad, los centenarios son un modelo de longevidad atractivo para caracterizar a medida que alcanzan los extremos de la vida humana debido a la capacidad única de posponer la enfermedad y la discapacidad en sus últimos años de vida. Dentro de la progresión de la edad, los inventores observaron una disminución en las lisofosfatidilcolinas (LPC 18:2, LPC 20:4), siendo su concentración más reducida en centenarios. Específicamente, la disminución en LPC 18:0/18.0 parece ser específica para los centenarios. Si bien es imperativo señalar que LPC tiene diferentes especies basadas en la longitud de la cadena de ácido graso y el grado de saturación, con diferentes propiedades físicas y biológicas, los fosfolípidos son generalmente proinflamatorios [Aiyar N, et al., Mol Cell Biochem. 2007; 295: 113-120], con propiedades aterogénicas [Schmitz G, et al., Atherosclerosis. 2010; 208: 10-18], y sus niveles aumentados a menudo se observan en pacientes con diabetes tipo 2 [Rabini RA, et al., Diabetes. 1994; 43: 915 - 919].

35 Respecto a los ancianos centenarios, muestran un cambio equilibrado en la concentración de varias especies de PC de éter de acilo con contenido de tres especies de PC-O, PC-O 34:3, PC-O 36:4, PC-O 40:1 que disminuyeron significativamente y dos especies de PC de éter, PC-O 32:1, PC-O 34:1, siendo significativamente mayores. Si bien el papel fisiológico de los fosfolípidos de éter es menos conocido, los plasmalógenos que contienen un enlace vinil éter que une la cadena alifática sn-1 con la cadena principal del glicerol son los fosfolípidos de éter más abundantes. Aquí, las diferencias en los niveles de especies de acil-éter fosfatidilcolina podrían deberse a diferencias en el manejo del daño oxidativo.

40 Dentro de la progresión de la edad, se observa un aumento en las especies de esfingomielina (SM) con marcado aumento en SM 24:1 y SM16:0 en centenarios. Sin embargo, los inventores encontraron una concentración de disminución específica de SM24:0 y SM-OH 22:1 en centenarios. Las especies SM son importantes constituyentes de la membrana celular que están estrechamente asociados con el colesterol en la construcción, metabolismo y transporte, y que se enriquecen en balsas lipídicas. El papel fisiológico de SM aún no está claro ya que estudios previos han demostrado la relación entre niveles elevados de SM y aterosclerosis [Kummerow FA, et al., J Nutr Biochem. 2001; 12:602-607], mientras que otros mostraron que los niveles de esfingomielina en plasma no se asociaron con un mayor riesgo de eventos CV. Por último, si bien no hay cambios significativos para los niveles de la mayoría de las especies de diacil-fosfatidilcolina (PC-O), los centenarios muestran alteraciones en los niveles individuales de PC-O 36:2.

45 Los cambios en los contenidos de PC y PC-O pueden tener un impacto en la actividad de la síntesis de metabolitos del ácido araquidónico (prostaglandinas, tromboxanos, leucotrienos) que son mediadores clave y reguladores de las reacciones fisiológicas del huésped, implicados en el estrés oxidativo, la apoptosis y modulación de las funciones inmunes e inflamatorias. De hecho, los centenarios muestran también una red equilibrada única de mediadores lipídicos con propiedades tanto antiinflamatorias como proinflamatorias.

50 El documento WO2011063470 describe biomarcadores lipídicos para determinar la presencia o extensión de la enfermedad lipídica. Otro documento, Capiri et al., Experimental Gerontology vol. 34 no 1 (1999) describe estudios sobre la membrana de glóbulos rojos de centenarios.

55 En comparación con los ancianos, se observó una mayor concentración de leucotrininas, LTB-4 y LTE-4. Los centenarios muestran niveles más altos de ácido 15-hidroxi-eicosatetraenoico (15-HETE), un producto principal de la enzima 15-lipoxigenasa (15-LOX). 15-HETE inhibe la formación de 5-lipoxigenasa, disminuye la producción de leucotrieno B4 y 12-HETE y suprime las reacciones inmunes. En comparación con los ancianos, el aumento de la activación de la vía CYP también se observa en los centenarios, con una mayor generación de 8,9-EpETrE y una

disminución de la concentración de 11,12-DiHETrE. EpETrE son componentes importantes de muchas señales intracelulares en tejidos cardíacos y extracardíacos. Los estudios han demostrado que los EpETrE exhiben efectos antiinflamatorios al inhibir la activación de la transcripción génica mediada por el factor nuclear (NF)-κB. Además, exhiben propiedades trombolíticas y angiogénicas dentro de la vasculatura. Los EpETrE pueden ser metabolizados adicionalmente por epóxido hidrolasa soluble (sEH) en ácidos dihidroxi-eicosatrienoicos (DiHETrE).

En general, cuando los EpETrE se metabolizan en DiHETrE por sEH, sus actividades biológicas se vuelven menos pronunciadas, por lo que aquí la disminución de la concentración de 11,12-DHET podría revelar el efecto de disminución de su precursor 11,12-EpETrE. Los centenarios muestran una marcada disminución en 9-HODE, molécula biológica activa y un marcador de peroxidación lipídica, y 9-oxo-HODE, un producto de oxidación estable del ácido linoleico, cuya generación aumenta cuando aumenta el estrés oxidativo.

Los centenarios mostraron una marcada disminución en 9-oxo-HODE, un producto de oxidación estable del ácido linoleico, cuya generación aumenta cuando se incrementa el estrés oxidativo. La mayor parte del ácido linoleico existe en formas esterificadas como PC y linoleato de colesterol, ambos son componentes principales del LDL y están continuamente expuestos a muchos tipos de estrés oxidativo para generar especies hidroxí e hidroperoxi.

Se detectaron previamente niveles incrementados de productos de oxidación de lípidos, tales como 9-oxo ODE en muestras de plasma de pacientes que sufren artritis reumatoide y artrosclerosis.

Además, en comparación con los ancianos, los centenarios exhiben agotamiento en el ácido eicosapentanoico (EPA). Mientras que la EPA se puede sintetizar en humanos a partir del ácido alfa-linoleico o en mayor cantidad directamente a partir de pescado graso o suplementos de aceite de pescado, la EPA puede transformarse en eicosanoides n-3, que tienen diversas funciones. Un agotamiento de la EPA podría mostrar un aumento de la biosíntesis de n-3 eicosanoides.

En consecuencia, la presente invención se refiere en parte a un método para diagnosticar un estilo de vida que permite retrasar y/o evitar trastornos inflamatorios crónicos relacionados con el envejecimiento, que comprende

- obtener una muestra de suero de un sujeto
- determinar el nivel de 1-O-alkil- 2-acilglicerofosfolina (PC-O) 40:1, en la muestra, y
- comparar el PC-O 40:1 del sujeto con un valor de referencia predeterminado,

en el que el valor de referencia predeterminado se basa en un nivel de suero promedio PC-O 40:1 en una población control, y en el que un nivel reducido de PC-O 40:1 en suero en la muestra en comparación con el valor de referencia predeterminado indica una mayor probabilidad de retrasar y/o evitar trastornos inflamatorios crónicos relacionados con el envejecimiento.

Este método tiene, por ejemplo, la ventaja de que la obtención de suero de un sujeto es un procedimiento bien establecido. El método de diagnóstico real se puede llevar a cabo en una muestra de suero fuera del cuerpo.

El nivel de PC-O 40:1 en la muestra puede detectarse y cuantificarse por cualquier medio conocido en la técnica. Por ejemplo, espectroscopia de masas, por ejemplo, UPLC-ESI-EM/EM o espectroscopia de RMN, por ejemplo, se puede usar espectroscopia de <sup>1</sup>H-RMN. También se pueden usar otros métodos, como otros métodos espectroscópicos, métodos cromatográficos, técnicas de etiquetado o métodos químicos cuantitativos.

El valor de referencia predeterminado se basa en un nivel promedio de PC-O 40:1 en una población de control. La población de control puede ser un grupo de al menos 3, preferiblemente al menos 10, más preferido al menos 50 personas con un fondo genético similar, edad y un estado de salud promedio.

La población de control también puede ser la misma persona, de modo que el valor de referencia predeterminado se obtiene previamente del mismo sujeto. Esto permitirá una comparación directa del estilo de vida actual con un estilo de vida previo, por ejemplo, y las mejoras se pueden evaluar directamente.

Los trastornos inflamatorios crónicos relacionados con el envejecimiento típicos son bien conocidos por los expertos en la técnica. Una gran parte del fenotipo de envejecimiento se explica por un desequilibrio entre las redes inflamatorias y antiinflamatorias, que da como resultado un estado proinflamatorio crónico de bajo grado de envejecimiento, "envejecimiento por inflamación" (Candore G., et al., *Biogerontology*. 2010 Oct; 11 (5): 565-73).

Por lo tanto, el método de la presente invención se puede usar para diagnosticar el nivel de envejecimiento inflamatorio.

Los trastornos inflamatorios típicos relacionados con la edad son por ejemplo aterosclerosis, artritis, demencia, diabetes tipo 2, osteoporosis y enfermedades cardiovasculares. Por ejemplo, para estos trastornos, la inflamación se considera una posible base subyacente para las alteraciones moleculares que vinculan el envejecimiento y los

procesos patológicos relacionados con la edad (Chung et al., ANTIOXIDANTS & REDOX SIGNALING, Volumen 8, Números 3 y 4, 2006, 572-581).

PC-O 40:1 se puede usar como el único marcador para el propósito de la presente invención.

Mientras que PC-O 40:1 como marcador único es eficaz como herramienta para el método de diagnóstico de la presente invención, la calidad y/o el poder predictivo de dicho diagnóstico mejorarán si el diagnóstico se basa en algo más que solo un marcador.

Por lo tanto, uno o más marcadores diferentes para la probabilidad de retrasar y/o evitar trastornos inflamatorios crónicos relacionados con el envejecimiento se pueden usar en combinación con PC-O 40:1.

Los inventores se sorprendieron al ver que también se pueden usar otros biomarcadores para detectar la probabilidad de retrasar y/o evitar trastornos inflamatorios crónicos relacionados con el envejecimiento.

Como tales, los inventores han identificado concentraciones de suero incrementadas de 1-O-alkil-2-acilglicerofosfolina (PC-O) 32:1, 1-O-alkil-2-acilglicerofosfolina (PC-O) 34:1, ácido 15-hidroxi-eicosatetraenoico (15-HpETE), leucotrieno E4 (LTE4), leucotrieno B4 (4LTB) y/o 8,9-epoxieicosatrienoico (8,9 EpETre) permiten diagnosticar un estilo de vida que permite retrasar y/o evitar trastornos inflamatorios crónicos relacionados con el envejecimiento mientras se disminuyen las concentraciones séricas de hidroxí- esfingomielina (SM-OH) 22:1, lisofosfatidilcolina (LPC) 18:0 esfingomielina (SM) 24:0, 1-O-alkil-2-acilglicerofosfolina (PC-O) 34:3, 1-O-alkil-2-acilglicerofosfolina (PCO) 36:4, fosfatidilcolina (PC) 36:2, ácido hidroxioctadecadienoico (9-HODE), ácido 9-oxo-octadecadienoico (9-oxo-HODE), y/o el ácido 11,12-epoxieicosatrienoico (11,12-DiHETre) permiten diagnosticar un estilo de vida que permite retrasar y/o evitar los trastornos inflamatorios crónicos relacionados con el envejecimiento.

Las especies de lípidos individuales se anotaron de la siguiente manera:

[clase de lípidos][número total de átomos de carbono]:[número total de dobles enlaces]. Por ejemplo, PC 34:1 refleja una especie de fosfatidilcolina que comprende 34 átomos de carbono y 1 doble enlace.

En consecuencia, en el método de la presente invención, la precisión del diagnóstico puede aumentar al evaluar también si la concentración de uno o más de los siguientes biomarcadores PC-O 32:1, PC-O 34:1, 15- HpETE, LTE4, LTB4, 8,9 EpETre aumenta en suero, y/o si la concentración de uno o más de los siguientes biomarcadores SM-OH 22:1, LPC 18:0, SM 24:0, PC-O 34:3, PC-O 36:4, PC 36:2, 9-HODE, 9-oxo-HODE, 11,12-DiHETre disminuye en el suero, en comparación con un valor de referencia previamente obtenido.

El método de la presente invención puede comprender la evaluación de al menos 2, al menos 3, al menos 4, al menos 5, al menos 6, al menos 7, o al menos 8 biomarcadores.

Por ejemplo, PC-O 40:1 se puede evaluar junto con SM-OH 22:1.

PC-O 40:1 también se puede evaluar junto con SM 24:0.

PC-O 40:1 se puede evaluar junto con LPC 18:0.

PC-O 40:1 se puede evaluar junto con LTE4.

PC-O 40:1 se puede evaluar junto con PC-O 34:1.

PC-O 40:1 se puede evaluar junto con SM-OH 22:1 y SM 24:0.

PC-O 40:1 se puede evaluar junto con SM-OH 22:1, SM 24:0 y PC-O 40:1.

PC-O 40:1 se puede evaluar junto con SM-OH 22:1, SM 24:0, PC-O 40:1 y 9-HODE.

PC-O 40:1 se puede evaluar junto con SM-OH 22:1, SM 24:0, PC-O 40:1, 9-HODE y 9-oxo-HODE.

PC-O 40:1 se puede evaluar junto con SM-OH 22:1, SM 24:0, PC-O 40:1, 9-HODE, 9-oxo-HODE y LPC 18:0.

PC-O 40:1 se puede evaluar junto con SM-OH 22:1, SM 24:0, PC-O 34:1, 9-HODE, 9-oxo-HODE, LPC 18:0 y LTE4 .

La ventaja de evaluar más de un biomarcador es que cuantos más biomarcadores se evalúen, más fiable será el diagnóstico. Si, por ejemplo, más de 1, 2, 3, 4, 5, 6 o 7 biomarcadores exhiben las elevaciones o disminuciones en la concentración como se describió anteriormente, esta es una fuerte indicación de una mayor probabilidad de retrasar y/o evitar trastornos inflamatorios crónicos relacionados con el envejecimiento.

En consecuencia, el método de la presente invención puede comprender además determinar el nivel de al menos uno de SM-OH 22:1, LPC 18:0, SM 24:0, PC-O 34:1, 9-HODE, 9-oxo-HODE, o LTE4 en la muestra, y comparar el nivel del sujeto de al menos uno de SM-OH 22:1, LPC 18:0, SM 24:0, PC-O 34:1, 9-HODE, 9-oxo-HODE, o LTE4 a un valor de referencia predeterminado, en el que el valor de referencia predeterminado se basa en el suero promedio SM-OH 22:1, LPC 18:0, SM 24:0, PC-O 34:1, 9- HODE, 9-oxo-HODE, o nivel de LTE4 en una población de control, y en donde un nivel más bajo de PC-O 40:1 en la muestra y/o un suero inferior SM-OH 22:1, LPC 18:0, SM 24:0, PC-O 34:1, 9-HODE, o 9-oxo-HODE en la muestra en comparación con los valores de referencia predeterminados indican una mayor probabilidad de retrasar y/o evitar trastornos inflamatorios crónicos relacionados con el envejecimiento, y/o en el que un nivel elevado de suero LTE4, PC-O 34:1 en la muestra en comparación con los valores de referencia predeterminados indica una mayor probabilidad de establecer y/o evitar los trastornos inflamatorios crónicos relacionados con el envejecimiento.

La precisión del diagnóstico de la presente invención puede aumentarse adicionalmente evaluando también si uno o más de los siguientes biomarcadores PC-O 32:1, 15-HpETE, LTB4, 8,9 EpETre aumenta en suero, y/o si uno o más de los siguientes biomarcadores PC-O 34:3, PC-O 36:4, PC 36:2, 11,12-DiHETre disminuyen en suero, en comparación con un valor de referencia previamente obtenido.

El método de la presente invención puede usarse adicional o alternativamente para diagnosticar un estilo de vida que permita un envejecimiento saludable y/o más saludable.

Se puede diagnosticar un envejecimiento más sano comparando los niveles reales de PAG y/o PCS de valores de referencia predeterminados, que se obtuvieron previamente del mismo sujeto. Por lo tanto, en este caso, el mismo sujeto actuará como población de control y las mejoras en el estilo de vida se pueden ver directamente, al tiempo que se eliminan las incertidumbres que se originan en condiciones ligeramente diferentes para otras poblaciones de control promedio.

El método de la presente invención también se puede usar para diagnosticar la longevidad; y/o la probabilidad de longevidad. Esto tiene la ventaja de que las consecuencias de un estilo de vida más saludable se pueden detectar directamente, se puede controlar el mantenimiento de un estilo de vida saludable y se puede corregir un estilo de vida poco saludable antes de que aparezcan las primeras manifestaciones clínicas de un estilo de vida poco saludable.

El método de la presente invención se puede usar además de manera alternativa y/o adicional para diagnosticar interacciones de microflora-huésped intestinal más sanas. El microbioma intestinal realiza numerosas funciones bioquímicas importantes para el huésped, y los trastornos del microbioma están asociados con muchos y diversos procesos de enfermedades humanas (Kinross et al., Genome Medicine 2011, 3:14). La interacción intestinal microflora-huésped desfavorable puede tener muchas manifestaciones clínicas, tales como estados de enfermedad sistémica, por ejemplo, obesidad y enfermedad cardiovascular; o condiciones intestinales, por ejemplo, enfermedad inflamatoria intestinal.

Las interacciones intestino-microflora-huésped pueden diagnosticarse en cualquier sujeto, pero puede ser de particular importancia monitorizar las interacciones saludables entre la microflora y el huésped en adultos o en personas mayores.

Por lo tanto, las interacciones intestinal-microflora-huésped más sanas pueden ser diagnosticadas en los ancianos.

Un sujeto se considera "anciano" si ha superado la primera mitad de su esperanza de vida promedio en su país de origen, preferiblemente, si ha superado los primeros dos tercios de la esperanza de vida promedio en su país de origen, más preferiblemente si ha superado los primeros tres cuartos de la esperanza de vida promedio en su país de origen, más preferido si ha superado las primeras cuatro quintas partes de la esperanza de vida promedio en su país de origen.

Por ejemplo, si el sujeto es un ser humano, el método de la presente invención se puede llevar a cabo en adultos de al menos 45 años de edad, al menos 60 años de edad o al menos 75 años de edad.

El sujeto a analizar con el método de la presente invención puede ser un ser humano o un animal, en particular un mamífero, por ejemplo. Los animales típicos pueden ser animales de compañía, como gatos o perros de animales de granja, por ejemplo.

El método de la presente invención puede usarse adicional o alternativamente para detectar las consecuencias de un cambio en el estilo de vida. Aquí puede ser ventajoso si el nivel de PC-O 34: y opcionalmente los niveles de los otros biomarcadores mencionados en este documento se comparan con el nivel de PC-O 34: y opcionalmente los niveles de los otros biomarcadores obtenidos previamente del sujeto, por ejemplo, antes el cambio en el estilo de vida o durante el cambio en el estilo de vida.

Por lo tanto, el método de la presente invención puede ser para diagnosticar un estilo de vida más saludable, en el que los valores de referencia predeterminados se basan en el nivel de PC-O 40:1 en suero y opcionalmente los niveles de los otros biomarcadores obtenidos del sujeto antes de un cambio en el estilo de vida

5 El cambio en el estilo de vida puede ser cualquier cambio, como un trabajo diferente, más horas de sueño, menos alcohol, más desafíos, menos estrés, menos tabaquismo, más deportes, un ambiente laboral y/o de vida diferente, por ejemplo.

El cambio de estilo de vida también puede ser un cambio en la dieta.

10 El cambio en la dieta puede ser, por ejemplo, el uso de al menos un producto nutricional que previamente no se consumía o consumía en diferentes cantidades.

15 Como tal, el método de la presente invención se puede usar para probar la eficacia de un nuevo régimen nutricional, de productos nutricionales y/o de medicamentos.

Los productos nutricionales pueden ser, por ejemplo, productos que pretenden tener un efecto sobre el envejecimiento saludable y/o evitar trastornos inflamatorios crónicos relacionados con el envejecimiento.

20 Típicamente, los productos nutricionales pueden ser productos alimenticios, bebidas, productos alimenticios para mascotas, complementos alimenticios, nutracéuticos, aditivos alimentarios o fórmulas nutricionales.

25 El nivel de los biomarcadores, tal como el nivel de PC-O 40:1 y opcionalmente los niveles de los otros biomarcadores en la muestra se pueden detectar y cuantificar por cualquier medio conocido en la técnica. Por ejemplo, espectroscopía de masas, por ejemplo, UPLCESI-EM/EM, o espectroscopía de RMN, por ejemplo espectroscopía de <sup>1</sup>H-RMN.

30 También se pueden usar otros métodos, tales como otros métodos espectroscópicos, métodos cromatográficos, técnicas de marcado o métodos químicos cuantitativos.

El método de la presente invención comprende comparar niveles de PC-O 40:1 y opcionalmente los otros biomarcadores de un sujeto de prueba con valores de referencia predeterminados que pueden derivarse del nivel de PC-O 40:1 en suero y opcionalmente el niveles de otros biomarcadores de sujetos de control comparables.

35 El alcance de la diferencia entre el PC-O 40:1 del sujeto y, opcionalmente, los niveles de los otros biomarcadores y los valores de control correspondientes también es útil para caracterizar el alcance del riesgo y, por lo tanto, determinar qué sujetos se beneficiarían más de ciertas terapias.

40 El valor de referencia para PC-O 40:1 y opcionalmente para los otros biomarcadores se mide preferiblemente usando las mismas unidades usadas para caracterizar el nivel de PC-O 40:1 y opcionalmente los otros biomarcadores obtenidos del sujeto de prueba. Por lo tanto, si el nivel de PC-O 40:1 y opcionalmente los otros biomarcadores es un valor absoluto como las unidades de PC-O 40:1 en  $\mu\text{mol/l}$  ( $\mu\text{M}$ ), el valor de referencia también se basa en las unidades de PC-O 34:1 en  $\mu\text{mol/l}$  ( $\mu\text{M}$ ) en individuos de la población general o en una población control seleccionada de sujetos.

45 Además, el valor de referencia puede ser un único valor de corte, tal como una mediana o media. Los valores de referencia de PC-O 40:1 y opcionalmente los otros biomarcadores en las muestras de suero obtenidas, tales como niveles medios, niveles medios o niveles "de corte", se pueden establecer analizando una muestra grande de individuos en la población general o el seleccionado población y utilizando un modelo estadístico como el método de valor predictivo para seleccionar un criterio de positividad o curva característica del operador receptor que define la especificidad óptima (tasa negativa verdadera más alta) y la sensibilidad (tasa positiva verdadera más alta) como se describe en Knapp, RG y Miller. MC (1992). Clinical Epidemiology and Biostatistics. William y Wilkins, Harual Publishing Co. Malvern, Pa.

55 Los expertos en la técnica sabrán cómo asignar valores de referencia correctos, ya que variarán según el sexo, la raza, la herencia genética, el estado de salud o la edad, por ejemplo.

Por ejemplo, los valores medios de referencia predeterminados pueden ser

60 - 2  $\mu\text{M}$  para 1-O-alkil-2-acilglicerofosfolina (PC-O) 32:1,  
 - 7,80  $\mu\text{M}$  para 1-O-alkil-2-acilglicerofosfolina (PC -O) 34:1,  
 - 1,25  $\mu\text{g}/100$  ml de suero para el ácido 15-hidroxi-eicosatetraenoico (15-HpETE),  
 - 0,013  $\mu\text{g}/100$  ml de suero para leucotrieno E4 (LTE4),  
 - 0,020  $\mu\text{g}/100$  ml de suero para leucotrieno B4 (4LTB), y/o  
 65 - 0,070  $\mu\text{g}/100$  ml de suero para 8,9-epoxieicosatrienoico (8,9 EpETre)

- 16,07  $\mu\text{M}$  para hidroxiesfingomielina (SM-OH) 22:1,
- 52,00  $\mu\text{M}$  para lisofosfatidilcolinas (LPC) ) 18:0,
- 25,00  $\mu\text{M}$  para esfingomielina (SM) 24:0,
- 5,07  $\mu\text{M}$  para 1-O-alkil-2-acilglicerofosfocolina (PC-O) 34:3,
- 5 - 14,30  $\mu\text{M}$  para 1-O-alkil-2- acilglicerofosfocolina (PC-O) 36:4,
- 1,41  $\mu\text{M}$  para 1-O-alkil-2- acilglicerofosfocolina (PC-O) 40:1,
- 10,00  $\mu\text{M}$  para fosfatidilcolina (PC) 36:2,
- 0,34  $\mu\text{g}/100$  ml de suero para ácido hidroxioctadecadienoico (9-HODE),
- 0,043  $\mu\text{g}/100$  ml de suero para ácido 9-oxo-octadecadienoico (9-oxo-HODE), y/o
- 10 - 0,017  $\mu\text{g}/100$  ml de suero para ácido 11,12-epoxieicosatrienoico (11,12-DiHETre).

Valores más altos o más bajos son indicativos de una mayor probabilidad de retrasar y/o evitar trastornos inflamatorios crónicos relacionados con el envejecimiento, como se detalla anteriormente.

15 Los presentes inventores también se sorprendieron de encontrar otros biomarcadores en la orina para diagnosticar un estilo de vida que permitiera retrasar y/o evitar los trastornos inflamatorios crónicos relacionados con el envejecimiento.

20 Como tales, los inventores han identificado que las concentraciones incrementadas en la orina de fenilacetilglutamina (PAG) y/o sulfato de p-cresol (PCS) permiten diagnosticar un estilo de vida que permite retrasar y/o evitar los trastornos inflamatorios crónicos relacionados con el envejecimiento.

25 La fenilacetilglutamina (PAG) y/o el sulfato de p-cresol (PCS) pueden evaluarse siguiendo el método de la presente invención, con la única diferencia de que se usa una muestra de orina.

Una muestra de orina tiene la ventaja de que puede obtenerse y analizarse de forma no invasiva.

30 Los valores de referencia predeterminados para PAG y PCS pueden determinarse por los expertos en la técnica y el máximo variará dependiendo de las circunstancias. Por ejemplo, los valores de referencia típicos pueden ser 63  $\mu\text{mol}/\text{mmol}$  de creatinina para PCS y 81  $\mu\text{mol}/\text{mmol}$  de creatinina para PAG en orina. Los valores más altos son indicativos de una mayor probabilidad de retrasar y/o evitar los trastornos inflamatorios crónicos relacionados con el envejecimiento.

35 La presente invención también se extiende al descubrimiento de un nuevo biomarcador que puede usarse en el diagnóstico de un estilo de vida que permite retrasar y/o evitar el envejecimiento de los trastornos inflamatorios crónicos.

40 En consecuencia, la presente invención comprende un biomarcador para el diagnóstico de un estilo de vida que permite retrasar y/o evitar el envejecimiento de los trastornos inflamatorios crónicos, en el que el biomarcador es PC-O 40:1.

Este biomarcador se puede detectar en el suero, lo que tiene la ventaja de que las muestras a analizar pueden obtenerse fácilmente, mientras se analiza el suero para otros fines.

45 Los expertos en la técnica comprenderán que pueden combinar libremente todas las características de la presente invención descrita en este documento, sin apartarse del alcance de la invención como se describe. En particular, las características descritas para el método de la presente invención se pueden aplicar al biomarcador de la presente invención y viceversa.

50 Los expertos en la técnica también comprenderán que, si bien los biomarcadores y su aplicación en un método de diagnóstico se describen en el presente documento como:

- diagnosticar un estilo de vida que permite retrasar y/o evitar los trastornos inflamatorios crónicos relacionados con el envejecimiento,
- 55 -diagnosticar un estilo de vida que permita un envejecimiento saludable,
- diagnosticar la longevidad, y/o
- diagnosticar interacciones intestinales y microflora más saludables, los biomarcadores también se pueden aplicar en un método para
- diagnosticar un estilo de vida que favorezca el desarrollo de trastornos inflamatorios crónicos relacionados con el envejecimiento,
- 60 -diagnosticar un estilo de vida que probablemente evite el envejecimiento saludable,
- diagnosticar un riesgo de acortamiento de la duración de la vida y/o el diagnóstico de interacciones entre la microflora y el huésped, que son menos saludables.

65

En aspectos adicionales, la presente invención proporciona métodos para:

- retrasar, evitar y/o prevenir el desarrollo de trastornos inflamatorios crónicos relacionados con el envejecimiento,
- promover un envejecimiento saludable,
- promover la longevidad,
- reducir el riesgo de una reducción de la esperanza de vida,
- promover interacciones más saludables entre la microflora y el huésped, y/o
- prevenir las interacciones intestinales entre la microflora y el huésped.

Típicamente, tales métodos comprenden una etapa de realizar un método de diagnóstico como se describe aquí en un sujeto; y modificar el estilo de vida del sujeto en función de un resultado del mismo. Por ejemplo, el método puede comprender modificar un estilo de vida del sujeto si el resultado del paso de diagnóstico indica:

- una mayor probabilidad del desarrollo de trastornos inflamatorios crónicos relacionados con el envejecimiento,
- un estilo de vida que pueda prevenir el envejecimiento saludable,
- un riesgo para una reducción en la esperanza de vida, y/o
- interacciones intestinales de microflora-huésped menos saludables;

en el sujeto.

La modificación en el estilo de vida en el sujeto puede ser cualquier cambio como se describe en este documento, por ejemplo, un cambio en la dieta, un trabajo diferente, más horas de sueño, menos alcohol, más desafíos, menos estrés, menos tabaquismo, más deportes, un ambiente laboral y/o de vida diferente.

Preferiblemente, el cambio es el uso de al menos un producto nutricional que previamente no se consumía o consumía en diferentes cantidades, por ejemplo un producto nutricional que tiene un efecto sobre el envejecimiento saludable y/o evita los trastornos inflamatorios crónicos relacionados con el envejecimiento (incluidos los productos alimenticios, bebidas, productos alimenticios para mascotas, complementos alimenticios, nutracéuticos, aditivos alimentarios o fórmulas nutricionales).

La modificación de un estilo de vida del sujeto también incluye indicar la necesidad de que el sujeto cambie su estilo de vida, por ejemplo, prescribir, promover y/o proponer un cambio en el estilo de vida según lo descrito anteriormente al sujeto. Por ejemplo, el método puede comprender una etapa de administración o suministro de al menos un producto nutricional como se describió anteriormente al sujeto.

Las ventajas y características adicionales de la presente invención son evidentes a partir de las siguientes tablas, ejemplos y figuras.

La Tabla 1 muestra las características clínicas demográficas de la cohorte de envejecimiento reclutada. Los valores se presentan como la media ( $\pm$ DE) con el rango entre paréntesis. <sup>1</sup>BMI = índice de masa corporal, <sup>2</sup>Diabetes mellitus: antecedentes de diabetes, plasma de glucosa en ayunas  $\geq$ 126mg/dl, <sup>3</sup>HDL = lipoproteína de alta densidad, <sup>4</sup>LDL = lipoproteína de baja densidad, <sup>5</sup>MMSE = medida de la función cognitiva mediante el Mini-Mental State Examination (MMSE). El puntaje utilizado en el análisis se corrigió por edad y años de educación para personas mayores. El MMSE para el deterioro cognitivo en la tercera edad se calificó como severo (puntaje 0-17), leve (puntaje 18-23) o no presente (puntaje 24-30). MMSE para centenarios  $\geq$  20 ausencia de deterioro cognitivo severo;  $<$ 12 presencia de deterioro cognitivo severo. <sup>6</sup>CRP = proteína C reactiva <sup>7</sup>A-SAA = proteínas de amiloide A séricas (SAA).

La tabla 2 muestra la característica y el resumen del modelo para el modelo discriminante entre los grupos de envejecimiento seleccionados.

La Tabla 3 muestra todos los metabolitos regulados significativamente en la orina para los 3 grupos de edad detectados por <sup>1</sup>H-RMN. Para obtener información semicuantitativa, las áreas de los picos en los espectros originales se integraron para estos tres metabolitos y las diferencias con la significación estadística se confirmaron mediante la prueba de suma de rangos de Wilcoxon y se marcaron como sigue \*p  $<$ 0,05, \*\*p  $<$ 0,01, \*\*\*p  $<$ 0,001.

La Tabla 4 muestra todos los metabolitos regulados significativamente en el suero sanguíneo para los 3 grupos de edad detectados por CL-EM. Los valores se expresan como valores medios  $\pm$ DE, y se marcan de la siguiente manera: \*p  $<$ 0,05, \*\*p  $<$ 0,01, \*\*\*p  $<$ 0,001.

La Tabla 5 muestra los niveles de concentración (ng/100  $\mu$ l) de marcadores inflamatorios en suero para los 3 grupos de edad analizados por UPLC-ESI-EM/EM, y se marcan como sigue: \*p  $<$ 0,05, \*\*p  $<$ 0,01, \*\*\*p  $<$ 0,001

La Figura 1 representa perfiles típicos de 600 Mhz en orina de la cohorte de envejecimiento que muestran picos que surgen de moléculas principales de bajo peso molecular, tales como cuerpos cetónicos, ácidos orgánicos,

aminoácidos, así como metabolitos derivados del metabolismo microbiano tanto en mamíferos como intestinales (PAG Y PCS).

5 La Figura 2 muestra la puntuación OPLS-DA (A) a partir de los espectros de <sup>1</sup>H-RMN urinaria de ancianos y centenarios (B) de adultos jóvenes y centenarios.

La Figura 3 muestra el gráfico de coeficientes derivado de los espectros <sup>1</sup>H-RMN urinarios de ancianos y centenarios.

10 La figura 4 muestra diagramas de caja en información semicuantitativa, derivados de áreas de pico (área bajo la curva) en los espectros originales para PAG y PCS. La significación estadística se confirmó mediante el uso de la prueba de suma de rangos de Wilcoxon y se detalla en la tabla 3.

15 La figura 5a, 5b muestra las diferencias en los perfiles lipídicos (concentraciones medias de lípidos) entre los tres puntos de tiempo de envejecimiento medidos mediante análisis metabolómico dirigido de UPLC-ESI-EM/EM. Los diagramas de caja representan cambios de izquierda a derecha que denotan centenarios, ancianos y personas jóvenes. La concentración está en mM. Los valores medios ±DE de la EM objetivo en los tres grupos de envejecimiento y la significación estadística se confirmaron mediante la prueba de suma de rangos de Wilcoxon y se enumeran en la tabla 4. Solo se muestran diferencias significativas y se evaluaron mediante la prueba U de Mann-Whitney.

20 La Figura 6 muestra las diferencias en los perfiles lipídicos (los resultados se expresan en ng/100 μl y representan las concentraciones medias de lípidos) entre los tres puntos de tiempo de envejecimiento medidos mediante análisis metabolómico dirigido de UPLC-ESI-EM/EM. Los diagramas de caja representan cambios de izquierda a derecha que indican centenarios, personas mayores y jóvenes. Los valores medios ±DE de la EM objetivo en los tres grupos de envejecimiento y la significación estadística se confirma utilizando la prueba de suma de rangos de Wilcoxon y se enumera en la tabla 5. Solo se muestran diferencias significativas y se evaluaron mediante la prueba U de Mann-Whitney.

30 Ejemplos:

Sujetos y grupos de estudio

35 Cada individuo y su familia dieron su consentimiento informado para que el estudio tuviera lugar. En general, se inscribieron 541 sujetos pertenecientes a diferentes grupos de edad para este estudio en el norte de Italia, que incluye Bolonia, Florencia, Parma y Milán. Los centenarios fueron compuestos por 156 individuos (125 mujeres y 31 hombres), el grupo de ancianos estaba compuesto por 363 individuos (205 mujeres y 158 hombres), el grupo de adultos jóvenes estaba compuesto por 22 individuos (10 mujeres y 12 hombres).

40 El protocolo de estudio fue aprobado por el Comité Ético del Hospital Universitario Sant'Orsola-Malpighi (Bologna, Italia). Las muestras biológicas resultantes (suero y orina) se almacenaron a -80 ° C hasta el análisis metabolómico.

Química Clínica

45 Se midieron las concentraciones séricas totales de lipoproteínas de alta densidad de colesterol (HDL) y triglicéridos con los correspondientes kits enzimáticos de Roche Diagnostics usando un autoanalizador (Roche Diagnostics Hitachi 917, Hitachi Ltd, Tokio, Japón). Se calcularon las concentraciones de colesterol de lipoproteínas de baja densidad (LDL) usando la fórmula de Friedewald (Friedewald WT, et al., Clinical Chemistry 18 (6):499-502). Citoquinas, incluyendo interferón gamma de ratón (IFN $\gamma$ ), interleucina 1 beta (IL-1 $\beta$ ), interleucina 6 (IL-6), interleucina 10 (IL-10), interleucina 12 p70 (IL-12 p70), quimiocinas derivadas de queratinocitos (KC) y el factor de necrosis tumoral (TNF) se midieron usando un kit multiplex proinflamatorio de ratón (Meso Scale Discoveries, Gaithersburg, Maryland, EE. UU.). El ensayo se llevó a cabo de acuerdo con el manual del fabricante. Se midió la proteína C reactiva de alta sensibilidad (CRP) usando un ELISA sándwich de doble anticuerpo sensible con CRP antihumano de conejo y CRP antihumano de conejo conjugado con peroxidasa.

55 Preparación de muestra para espectroscopia de <sup>1</sup>H-RMN. Se secó 1 ml de muestra de orina de los tres grupos de envejecimiento en un aparato de liofilización (Freeze-Dryer Fisher Scientific) y se ajustó a pH 6,8 usando 580 μl de una solución tampón de fosfato (KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, concentración final de 0,2 M) que contenía 1 mM de 3-trimetilsililo)-[2,2,3,3-2H<sub>4</sub>]-1-propionato de sodio (TSP), e introducido en tubos de RMN de 5 mm. Los perfiles metabólicos se midieron en un espectrómetro Bruker Avance III 600 MHz equipado con una sonda criogénica inversa de 5 mm a 300 K (Bruker Biospin, Rheinstetten, Alemania). Para cada muestra de orina, se registraron los espectros de <sup>1</sup>H RMN usando secuencias de pulso que incluyen una detección de <sup>1</sup>H estándar con supresión de agua. Los espectros estándar se adquirieron con un retraso de relajación de 4s y un tiempo de mezcla tm de 100 ms. Los espectros de <sup>1</sup>H RMN adquiridos se procesaron usando el paquete de software Topspin (versión 2.1, Bruker Biospin, Rheinstetten, Alemania) y se hizo referencia al estándar (TSP) a  $\delta = 0.0$ . La asignación máxima a metabolitos específicos se logró usando una biblioteca interna de compuestos y la literatura y se confirmó mediante espectroscopia de RMN

bidimensional estándar (JRES, TOCSY, HSQC, HMBC) en muestras seleccionadas. Para el análisis estadístico, todos los espectros de RMN se convirtieron en puntos de datos de 12 K en el intervalo de  $\delta$  0,4 a 10,0 y se importaron en el software MATLAB (versión 7.11.0 (R2010b); The MathWorks Inc., Natick, MA) excluyendo el residuo de agua (agua  $\delta$  = 4,7120-4,84). Los espectros se normalizaron a la suma total de todas las intensidades dentro del rango especificado.

Preparación de muestra para el análisis del kit Biocrates Life Sciences AbsoluteIDQTM. El kit AbsoluteIDQTM de Biocrates Life Sciences se utilizó para muestras de suero de la cohorte de envejecimiento seleccionada según se publicó anteriormente (Römisch-Margl, W., C. Prehn, R. Bogumil, C. Röhring, K. Suhre, J. Adamski, Procedure for tissue sample preparation and metabolite extraction for high-throughput targeted metabolomics. *Metabolomics*, 2011. Online First). La preparación de la placa de pocillos y la aplicación y extracción de la muestra se llevaron a cabo de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Se cargó un volumen final de 10  $\mu$ l de suero en la placa de 96 pocillos provista, que contenía patrones internos marcados isotópicamente. La cromatografía líquida se realizó en un sistema de cromatografía líquida de ultra alta presión (UHPLC) Dionex Ultimate 3000 (Dionex AG, Olten, Suiza) acoplado a un espectrómetro de masas 3200 Q TRAP (AB Sciex; Foster City, CA, EE. UU.) equipado con una fuente de iones TurboV que funciona en modo de ionización por electrospray (ESI). Los extractos de muestra (20  $\mu$ l) se inyectaron dos veces (en modos ESI positivo y negativo) mediante infusión directa usando un caudal de gradiente de 0-2,4 min:30  $\mu$ l/min, 2,4-2,8 min:200  $\mu$ l/min, 2,9-3 min:30  $\mu$ l/min. Los parámetros fuente de EM se establecieron en: temperatura de desolvatación (TEM): 200 °C, alta tensión: -4500 V (ESI-), 5500 V (ESI+), cortina (CUR) y nebulizador (GS1 y GS2) gases: nitrógeno; 20, 40 y 50 psi; respectivamente, presión de gas de colisión de nitrógeno: 5 mTorr. La adquisición de EM/EM se realizó en modo de monitorización de reacción programada (SRM) con valores optimizados de potencial de desclasamiento para los 163 metabolitos seleccionados en el ensayo. Los archivos de datos brutos (software Analyst, versión 1.5.1, AB Sciex, Foster City, CA, EE. UU.) se importaron en el software de análisis proporcionado MetIQ para calcular las concentraciones de metabolitos. La lista de todos los metabolitos detectables está disponible en Biocrates Life Sciences, Austria (<http://biocrates.com>). La preparación de muestras y la cuantificación de los marcadores de inflamación mediante UPLC-ESI-MS/MS utilizando la técnica de dilución de isótopos.

En base al trabajo publicado previamente (Naga, et al., PROG. LIPID RESEARCH, 2001, 40, 199-299) se desarrolló internamente un método para medir un panel de 63 marcadores inflamatorios. Se homogeneizaron 300  $\mu$ l de muestras de suero del material biológico disponible restante de los tres grupos de edad (n = 15 centenarios, n = 30 ancianos, n = 50 adultos jóvenes) con 10  $\mu$ l de tampón BHT (hidroxitolueno butilado, 79,2 mg/ml de PBS) utilizando el sistema FastPrep® 24. Para cada muestra, se mezcló un total de 50  $\mu$ l de suero con 5  $\mu$ l de la solución estándar interna (0,1 ng/ $\mu$ l). La mezcla se acidificó mediante la adición de 15  $\mu$ l de ácido cítrico (1 N). Para precipitar las proteínas, se añadió un volumen de 550  $\mu$ l de metanol/etanol (1:1, v:v) y las muestras se mezclaron durante 15 min a 4 °C antes de centrifugarse (3500 rpm, 10 min, 4 °C). La fase orgánica se evaporó a sequedad bajo un flujo constante de nitrógeno y los residuos se solubilizaron con 80  $\mu$ l de agua, seguido de la adición de 20  $\mu$ l de acetonitrilo, antes de centrifugarse a 3500 rpm durante 1 minuto a 4 °C. El sobrenadante se transfirió a Frascos CL-EM antes del análisis. Los análisis se llevaron a cabo mediante cromatografía líquida acoplada a espectrometría de masas en tándem (CL-EM/EM). La CL se realizó en un sistema de cromatografía líquida de ultrapresión Dionex Ultimate 3000 (UHPLC) (Dionex AG, Olten, Suiza). La detección de EM se realizó en un espectrómetro de masas 5500 Q TRAP (AB Sciex; Foster City, CA, EE. UU.) que funciona en modo ESI. La separación por cromatografía en gradiente se realizó en una columna Acquity BEH C18 (2,1 x 150 mm, 1,7  $\mu$ m, Waters, Milford, EE. UU.). El volumen de inyección fue de 5  $\mu$ l y la columna se mantuvo a 50 °C. La fase móvil consistió en agua que contenía ácido acético al 1% (eluyente A) y acetonitrilo (eluyente B) a un caudal constante ajustado a 450  $\mu$ l/min. La elución de gradiente comenzó desde 20% B con un aumento lineal hasta 50% B a los 6 min, desde 50% a 95% B a los 13 min, se mantuvo durante 3 min a 95% B, antes de volver al 20% B a 16,1 min y reequilibrio de la columna por 11 min adicionales. Los analitos se controlaron en el modo de monitoreo de reacción seleccionado programado (SRM programado) provisto dentro del software Analyst (versión 1.5.1, AB Sciex, Foster City, CA, EE. UU.). Todas las transiciones masivas y los parámetros de fuente de EM se dan en datos suplementarios. El tiempo de ventana de detección de SRM se estableció en 120 segundos con un tiempo de exploración de destino de 0,5 segundos. El nitrógeno se usó como gas de cortina y desolvatación a la presión respectiva de CUR:20, GS1:70, GS2:20 (unidad arbitraria). La temperatura de la fuente del bloque se mantuvo a 600 °C, con los correspondientes voltajes: ISV:-4000 V, EP:-10 V, CXP:-5 V. Se realizó una curva de calibración de 15 puntos antes del análisis de la muestra midiendo diferentes diluciones de la solución estándar (0-10 ng). El procesamiento de datos se realizó utilizando el software Analyst (versión 1.5.1, AB Sciex, Foster City, CA, EE. UU.). Se calculó la relación de área máxima de cada analito frente a su patrón interno correspondiente o marcador sustituto. Vale la pena mencionar que PGJ2, PGF2a, PGE2, PGE1, 15-oxo-HETE, 15-deoxi- $\Delta$ 12,14-PGJ2, 6-ceto PGF1a y 5-oxo-ETE estaban por debajo de su límite de detección en muestras de suero y por lo tanto, no se tuvieron en cuenta para el análisis estadístico.

#### Análisis de datos multivariados (MVA)

El MVA se realizó en varios entornos de software. Por lo tanto, los pasos de importación y preprocesamiento de datos para  $^1$ H RMN y datos de EM específicos se realizaron usando rutinas "internas" escritas en MATLAB (versión 7.11.0, The Mathworks Inc., Natick, MA, EE. UU.). En el análisis de datos de RMN, los modelos OPLS-DA se

llevaron a cabo utilizando el software SIMCA-P + (versión 12.0, Umetrics AB, Umeå, Suecia). Los datos de EM dirigidos fueron analizados por Random Forests utilizando el paquete 'randomForest' (A. Liaw y M. Wiener (2002). Clasificación y regresión por randomForest. R News 2 (3), 18--22.) que se ejecuta en el ambiente R (R Development Core Team (2011). R: un lenguaje y entorno para la informática estadística. R Foundation for Statistical Computing, Viena, Austria. ISBN 3-900051-07-0, URL <http://www.R-project.org/>). Finalmente, también se realizaron pruebas de significación univariante para la confirmación en R.

Características clínicas de la cohorte de envejecimiento.

Las características físicas y bioquímicas de la cohorte de envejecimiento se muestran en la Tabla 1. IMC ( $p < 0,001$ ), evaluación del modelo homeostático (HOMA) ( $p < 0,001$ ), colesterol total ( $p = 0,001$ ), triglicéridos ( $p = 0,004$ ), HDL ( $p = 0,001$ ) y LDL ( $p = 0,04$ ) son más bajos en centenarios, mientras que las proteínas séricas de amiloide A (A-SAA) ( $p < 0,001$ ) y proteína C-reactiva (CRP) ( $p < 0,001$ ) son mayores en centenarios, en comparación con los ancianos. Los ancianos muestran un IMC más alto ( $p < 0,001$ ), colesterol total ( $p < 0,001$ ), triglicéridos ( $p < 0,001$ ), LDL ( $p < 0,05$ ) y CRP ( $p < 0,001$ ), en comparación con los individuos jóvenes.

Se usó  $^1\text{H-RMN}$  a 600 MHz en orina a partir de las muestras disponibles de los tres grupos de envejecimiento (92 centenarios, 283 ancianos y 21 adultos jóvenes) para el perfil metabólico. Para explorar la edad, inducir cambios y diferencias metabólicas entre los tres grupos de edad y minimizar cualquier efecto de la variabilidad irrelevante del metabolito, se aplicó análisis quimiométrico supervisado del perfil de RMN en orina en el conjunto de datos de RMN de resolución completa de los tres puntos de tiempo. Se llevó a cabo proyección ortogonal en estructuras latentes-el análisis discriminante (OPLS-DA) en datos de escalas de varianza unitaria (figura 2). El modelo discriminante entre grupos centenarios y adultos jóvenes proporcionó un error de validación del clasificador (expresado como área bajo la curva ROC, AuROC (Fawcett, T., An introduction to ROC analysis, Pattern Recogn. Lett., 2006, 27:861- 874) de 1.0 usando un 13,7% de la varianza espectral ( $R^2X$ ) (Tabla 2). Asimismo, el modelo entre centenarios y grupos mayores generó un modelo con un error de validación AuROC de 0,93 usando nuevamente un 13,7% de la varianza total de X. (Tabla 2). Para determinar las firmas metabólicas asociadas a las diferencias entre grupos de edad, se utilizaron las cargas del primer componente predictivo del modelo OPLS-DA, codificadas por color según el coeficiente de correlación de la variable [30] (Figura 3) En consecuencia, el modelo discriminante de orina entre personas centenarias e individuos de edad avanzada muestra una cantidad relativamente mayor de fenilacetilglutamina (PAG), sulfato de p-cresol (PCS). Para obtener información semicuantitativa, las áreas de los picos en los espectros originales fueron integradas para estos tres metabolitos y las diferencias con la significación estadística se confirmaron mediante el uso de la prueba de suma de rangos de Wilcoxon (figura 4, tabla 3). Juntos, los resultados muestran que el intestino microbiano está muy implicado en el proceso de longevidad. La metabolómica de la CL-EM dirigida y cuantitativa mostró cambios metabólicos asociados al envejecimiento en el suero.

Para determinar las diferencias metabólicas relacionadas con la edad en el suero, se aplicó un enfoque metabolómico CL-EM/EM dirigido sobre las muestras biológicas disponibles de los 3 grupos de envejecimiento (143 centenarios, 90 ancianos y 20 adultos jóvenes). El análisis de datos multivariados se realizó utilizando Random Forests (RF<sup>TM</sup>) (Breiman, L., Random Forests, Machine Learning, 2001, 45:5-32) sobre datos semicuantitativos pretratados sobre 160 metabolitos, incluidos aminoácidos, azúcares, acilcarnitinas, esfingolípidos y glicerofosfolípidos. Usando la característica de importancia variable implementada en RF<sup>TM</sup>, fue posible determinar la firma metabólica que discrimina mejor a los tres grupos de envejecimiento. Para evaluar la capacidad discriminante individual de cada componente de la firma, se realizaron pruebas de suma de rangos de Wilcoxon entre los grupos de edad (todos los metabolitos regulados significativamente se enumeran en la Tabla 4). Mientras que la concentración global de glicerofosfolípidos y esfingolípidos aumenta y disminuye dependiendo de la composición de ácidos grasos, se observan tres tendencias consistentes: conjunto de compuestos que aumentan o disminuyen (estadísticamente válidos) con la edad como disminución de la concentración de lisofospatidilcolinas (LPC 18:2, LPC 20:4), aumenta los niveles de PC 32:0 y aumenta la concentración de esfingomielinas (SM 24:1, SM 16:0); (ii) conjunto de compuestos específicos solo para centenarios, sin cambios estadísticos entre ancianos y jóvenes, como disminución de las esfingomielinas y glicerofosfolípidos específicos (SM-OH 22:1, LPC 18:0, SM 24:0, PC-O 34:3, PC-O 36:4, PC-O 40:1, PC 36:2) y aumento en glicerofosfolípidos específicos (PC-O 32:1, PC-O 34:1).

Además, sobre las muestras de suero disponibles restantes de los 3 grupos de envejecimiento (12 centenarios, 37 ancianos y 18 adultos jóvenes) se empleó un método de CL-EM/EM dirigido para investigar los cambios de concentración en la síntesis de eicosanoides. Aquí, RF<sup>TM</sup> en datos cuantitativos mostró cambios estadísticos relevantes entre los tres grupos de edad (Figura 6). Los significados estadísticos entre los grupos de edad se evaluaron mediante la prueba de suma de rangos de Wilcoxon (todos los metabolitos significativamente regulados se enumeran en la Tabla 5 complementaria). Los centenarios muestran una menor concentración de ácido 11,12-dihidroxi-eicosatrienoico (11,12-DiHETrE), ácido 9-hidroxi-octadecadienoico (9-HODE) y ácido 9-oxo-octadecadienoico (9-oxo-HODE), mientras que a al mismo tiempo, aumenta las concentraciones de ácido 15-hidroxi-eicosatetraenoico (15-HETE) y leucotrieno E4 (LTE4). En comparación con los niveles de ancianos de ácido eicosapentaenoico (EPA) disminuyó en centenarios. Además, el análisis MRC por parejas entre centenarios y ancianos se aplicó para maximizar los cambios en estos dos grupos de edad que muestran un aumento en los niveles de concentración sérica de 8,9-epoxieicosatrienoico (8,9-EET) y leucotrieno B4 (LTB4) en centenarios.

También se describen en este documento otras realizaciones como se describe en los siguientes párrafos numerados:

- 5 1. Un método para diagnosticar un estilo de vida que permite retrasar y/o evitar los trastornos inflamatorios crónicos relacionados con el envejecimiento, que comprende
- obtener una muestra de suero de un sujeto
  - determinar el nivel de 9-Oxo-HODE, en la muestra, y
  - comparar el nivel de 9-Oxo-HODE del sujeto a un valor de referencia predeterminado,
- 10 en el que el valor de referencia predeterminado se basa en un nivel de 9-Oxo-HODE sérico medio en una población de control, y en el que se redujo el nivel sérico de 9-Oxo-HODE en la muestra al valor de referencia predeterminado indica una mayor probabilidad de retrasar y/o evitar trastornos inflamatorios crónicos relacionados con el envejecimiento.
- 15 2. Un método para diagnosticar un estilo de vida que permite retrasar y/o evitar los trastornos inflamatorios crónicos relacionados con el envejecimiento, que comprende
- obtener una muestra de suero de un sujeto
  - determinar el nivel de SM-OH 22:1, en la muestra, y
  - comparar el nivel de SM-OH 22:1 del sujeto a un valor de referencia predeterminado,
- 20 en el que el valor de referencia predeterminado se basa en un nivel de SM-OH 22:1 en una población de control, y en el que un nivel inferior de suero SM-OH 22:1 en la muestra en comparación con el valor de referencia predeterminado indica una mayor probabilidad de retrasar y/o evitar trastornos inflamatorios crónicos relacionados con el envejecimiento.
- 25 3. El método del párrafo 1 o del párrafo 2, que además comprende:
- determinar el nivel de al menos uno de PC-O 40:1, SM-OH 22:1, LPC 18:0, SM 24:0, PC-O 34 :1, 9-HODE, 9-oxo-HODE o LTE4 en la muestra, y
  - comparar el nivel del sujeto de al menos uno de PC-O 40:1, SM-OH 22:1, LPC 18:0, SM 24:0, PC-O 34:1, 9-HODE, 9-oxo-HODE, o LTE4 a un valor de referencia predeterminado,
- 30 en el que el valor de referencia predeterminado se basa en PC-O promedio 40:1, SM-OH 22 :1, LPC 18:0, SM 24:0, PC-O 34:1, 9-HODE, 9-oxo-HODE, o el nivel de LTE4 en una población de control, y en el que una PC-O en suero disminuida 40:1, SM-OH 22:1, LPC 18:0, SM 24:0, PC-O 40:1, 9-HODE, y/o 9-oxo-HODE nivel en la muestra en comparación con los valores de referencia predeterminados indican una mayor probabilidad retrasar y/o evitar trastornos inflamatorios crónicos relacionados con el envejecimiento, y/o
- 35 en el que niveles aumentados de suero LTE4 y/o PC-O 34:1 en la muestra en comparación con los valores de referencia predeterminados indican una mayor probabilidad de retrasar y/o evitar los trastornos inflamatorios crónicos relacionados con el envejecimiento.
- 40 4. El método de uno de los párrafos 1 a 3, en el que la precisión del diagnóstico aumenta al evaluar si uno o más de los siguientes biomarcadores PC-O 32:1, 15-HpETE, LTB4, 8,9 EpETre aumentan en suero, y/o si uno o más de los siguientes biomarcadores PC-O 34:3, PC-O 36:4, PC 36:2, 11,12-DiHETre están disminuidos en el suero, en comparación con un valor de referencia previamente obtenido .
- 45 5. Un método in vitro para diagnosticar un estilo de vida que permite retrasar y/o evitar los trastornos inflamatorios crónicos relacionados con el envejecimiento, que comprende
- obtener una muestra de orina de un sujeto
  - determinar el nivel de sulfato de p-cresol (PCS) en la muestra y
  - comparar el nivel de PCS del sujeto con un valor de referencia predeterminado,
- 50 en el que el valor de referencia predeterminado se basa en un nivel de PCS en orina promedio en una población de control, y en el que un nivel elevado de PCS en orina en comparación con el valor de referencia predeterminado probabilidad de retrasar y/o evitar trastornos inflamatorios crónicos relacionados con el envejecimiento.
- 55 6. El método del párrafo 5, que comprende además:
- determinar el nivel de fenilacetilglutamina (PAG) en la muestra y
  - comparar el nivel de PAG del sujeto con un valor de referencia predeterminado,
- 60 en el que el valor de referencia predeterminado se basa en el nivel de PAG de orina promedio en un población de control, y en la que niveles elevados de PCS en orina y PAG en la muestra en comparación con los valores de
- 65

referencia predeterminados indican una mayor probabilidad de retrasar y/o evitar trastornos inflamatorios crónicos relacionados con el envejecimiento.

5 7. Un método no invasivo de diagnóstico de un estilo de vida que permite retrasar y/o evitar los trastornos inflamatorios crónicos relacionados con el envejecimiento, que comprende

- obtener una muestra de orina de un sujeto
- determinar el nivel de fenilacetilglutamina (PAG) en la muestra y
- comparar el nivel de fenilacetilglutamina (PAG) del sujeto con un valor de referencia predeterminado,

10 en el que el valor de referencia predeterminado se basa en un nivel de PAG de orina promedio en una población de control, y en el que un nivel de PAG de orina elevado en comparación con el valor de referencia predeterminado indica una mayor probabilidad de retrasar y/o evitar los trastornos inflamatorios crónicos relacionados con el envejecimiento.

15 8. El método del párrafo 7, que comprende además:

- determinar el nivel de sulfato de p-cresol (PCS) en la muestra, y
- comparar el nivel de PCS del sujeto con un valor de referencia predeterminado,

20 en el que el valor de referencia predeterminado se basa en PCS de orina promedio. nivel en una población de control, y en el que los niveles elevados de PAG y PCS en la muestra en comparación con los valores de referencia predeterminados indican una mayor probabilidad de retrasar y/o evitar los trastornos inflamatorios crónicos relacionados con el envejecimiento.

25 9. El método de uno de los párrafos 1 a 8 para diagnosticar un estilo de vida que permite un envejecimiento saludable.

30 10. El método de uno de los párrafos 1 a 9 para diagnosticar la longevidad.

11. El método de uno de los párrafos 1 a 10 para diagnosticar interacciones intestinales de microflora-huésped más saludables.

35 12. El método del párrafo 11, en el que se diagnostican las interacciones más saludables entre la microflora y el huésped en personas de edad avanzada.

40 13. El método de uno de los párrafos 1 a 12 para diagnosticar un estilo de vida más saludable, en el que los valores de referencia predeterminados se basan en los niveles de suero u orina obtenidos del sujeto antes de un cambio en el estilo de vida.

45 14. El método de acuerdo con el párrafo 13, donde el cambio en el estilo de vida es un cambio en la dieta.

15. El método de acuerdo con el párrafo 14, en donde el cambio en la dieta es el uso de al menos un producto nutricional que previamente no se consumía o consumía en diferentes cantidades.

16. El método de acuerdo con el párrafo 14 o 15 para probar la efectividad de un nuevo régimen nutricional.

50 17. El método de uno de los párrafos 1 a 16 en el que los niveles de los biomarcadores se determinan por <sup>1</sup>H-RMN y/o espectrometría de masas en la muestra y en la referencia.

18. El método de uno de los párrafos 1 a 17 para diagnosticar un estilo de vida más saludable, donde los valores medios de referencia predeterminados son

- 2 μM para 1-O-alkil-2-acilglicerofosfolina (PC-O) 32:1,
- 55 - 7,80 μM para 1-O-alkil-2-acilglicerofosfolina (PC -O) 34:1,
- 1,25 μg/100 ml de suero para el ácido 15-hidroxi-eicosatetraenoico (15-HpETE),
- 0,013 μg/100 ml de suero para leucotrieno E4 (LTE4),
- 0,020 μg/100 ml de suero para leucotrieno B4 (4LTB), y/o
- 0,070 μg/100 ml de suero para 8,9-epoxieicosatrienoico (8,9 EpETre)
- 60 - 16,07 μM para hidroxí-esfingomielina (SM-OH) 22:1,
- 52,00 μM para lisofosfatidilcolinas (LPC) ) 18:0,
- 25,00 μM para esfingomielina (SM) 24:0,
- 5,07 μM para 1-O-alkil-2-acilglicerofosfolina (PC-O) 34:3,
- 14,30 μM para 1-O-alkil-2- acilglicerofosfolina (PC-O) 36:4,
- 65 - 1,41 μM para 1-O-alkil-2- acilglicerofosfolina (PC-O) 40:1,

- 10,00  $\mu$ M para fosfatidilcolina (PC) 36:2,
- 0,34  $\mu$ g/100 ml de suero para ácido hidroxiocadecadienoico (9-HODE),
- 0,043  $\mu$ g/100 ml de suero para ácido 9-oxo-octadecadienoico (9-oxo-HODE), y/o
- 0,017  $\mu$ g/100 ml de suero para ácido 11,12-epoxieicosatrienoico (11,12-DiHETre).

- 5 19. El método de acuerdo con cualquiera de los párrafos 1 a 18, que además comprende:
- obtener una muestra de orina de un sujeto
  - determinar el nivel de fenilacetilglutamina (PAG) y/o sulfato de p-cresol (PCS) en la muestra, y
  - 10 - comparar el nivel de fenilacetilglutamina (PAG) y/o PCS del sujeto a un valor de referencia predeterminado,
- en el que el valor de referencia predeterminado se basa en un nivel promedio de PAG y/o PCS en una población de control, y niveles elevados de PAG y/o PCS en orina la muestra en comparación con los valores de referencia predeterminados indican una mayor probabilidad de retrasar y/o evitar los trastornos inflamatorios crónicos relacionados con el envejecimiento.
- 15 20. Un biomarcador para el diagnóstico de un estilo de vida que permite retrasar y/o evitar trastornos inflamatorios crónicos relacionados con el envejecimiento, en el que el biomarcador es 9-Oxo-HODE.
- 20 21. Un biomarcador para el diagnóstico de un estilo de vida que permite retrasar y/o evitar trastornos inflamatorios crónicos relacionados con el envejecimiento, en el que el biomarcador es SM-OH 22:1.
22. El biomarcador de acuerdo con el párrafo 20 o 21, en el que el biomarcador debe detectarse en suero.
- 25 23. Un biomarcador para el diagnóstico de un estilo de vida que permite retrasar y/o evitar el envejecimiento de los trastornos inflamatorios crónicos, en donde el biomarcador es fenilacetilglutamina (PAG).
24. Un biomarcador para el diagnóstico de un estilo de vida que permite retrasar y/o evitar trastornos inflamatorios crónicos relacionados con el envejecimiento, en el que el biomarcador es el sulfato de p-cresol (PCS).
- 30 25. El biomarcador de acuerdo con el párrafo 23 o 24, en el que el biomarcador ha de detectarse en la orina.
26. Un método para diagnosticar (i) un estilo de vida que favorezca el desarrollo de trastornos inflamatorios crónicos relacionados con el envejecimiento, (ii) un estilo de vida que pueda prevenir un envejecimiento saludable, (iii) un riesgo de reducir la esperanza de vida, y/o (iv) interacciones intestinales de microflora-huésped no saludables, que comprenden
- 35 - obtener una muestra de suero de un sujeto
- determinar el nivel de 9-Oxo-HODE y/o SM-OH 22:1 en la muestra, y
  - 40 - comparar el 9-Oxo-HODE del sujeto y/o nivel SM-OH 22:1 a un valor de referencia predeterminado,
- en el que el valor de referencia predeterminado se basa en un nivel promedio de 9-Oxo-HODE y/o SM-OH 22:1 en una población de control, y en el que un aumento del nivel de suero 9-Oxo-HODE y/o SM-OH 22:1 en la muestra en comparación con el valor de referencia predeterminado indica (i) un estilo de vida que favorece el desarrollo de trastornos inflamatorios crónicos relacionados con el envejecimiento, (ii) un estilo de vida que es probable que evite el envejecimiento saludable, (iii) un mayor riesgo de reducir la esperanza de vida, y/o (iv) interacciones microflora-huésped no saludables.
- 45 27. Un método para diagnosticar (i) un estilo de vida que favorezca el desarrollo de trastornos inflamatorios crónicos relacionados con el envejecimiento, (ii) un estilo de vida que pueda prevenir un envejecimiento saludable, (iii) un riesgo de reducir la esperanza de vida, y/o (iv) interacciones entre la microflora y el huésped menos saludables, que comprenden
- obtener una muestra de orina de un sujeto
  - 50 - determinar el nivel de PAG y/o PCS en la muestra, y
  - 55 - comparar el nivel de PAG y/o PCS del sujeto con un valor de referencia predeterminado,
- en el que el valor de referencia predeterminado se basa en un nivel promedio de PAG y/o PCS en una población de control, y en el que un nivel de PAG y/o PCS de orina inferior en la muestra comparado con el valor de referencia predeterminado indica (i) un estilo de vida que favorece el desarrollo de los trastornos inflamatorios crónicos relacionados con el envejecimiento, (ii) un estilo de vida que probablemente evite el envejecimiento saludable, (iii) un mayor riesgo de reducir la esperanza de vida, y/o (iv) interacciones intestinales entre la microflora y el huésped menos saludables.
- 60 28. Un método para (i) retrasar, evitar y/o prevenir el desarrollo de trastornos inflamatorios crónicos relacionados con el envejecimiento, (ii) promover un envejecimiento saludable, (iii) promover la longevidad, (iv) reducir el riesgo de
- 65

reducir la esperanza de vida, (v) promover interacciones saludables entre la microflora intestinal y el huésped, y/o (vi) prevenir interacciones intestinales no saludables entre la microflora y el huésped, lo que incluye:

- 5 (a) realizar un método de diagnóstico como se describe en el párrafo 26 o 27; y
- (b) modificar un estilo de vida del sujeto si el sujeto tiene (i) una mayor probabilidad del desarrollo de trastornos inflamatorios crónicos relacionados con el envejecimiento, (ii) un estilo de vida que probablemente prevendrá un envejecimiento saludable, (iii) un mayor riesgo de reducir la esperanza de vida, y/o (iv) interacciones intestinales entre la microflora y el huésped menos saludables.
- 10 29. Un método de acuerdo con el párrafo 28, en el que la modificación del estilo de vida en el sujeto comprende un cambio en la dieta.
- 30. Un método de acuerdo con el párrafo 29, en el que el cambio en la dieta comprende administrar al menos un producto nutricional al sujeto que tiene un efecto sobre el envejecimiento saludable y/o evitar los trastornos inflamatorios crónicos relacionados con el envejecimiento.
- 15

Tabla 1:

Factor	Centenarios	Ancianos	Jóvenes
Demografía			
Sexo, masculino/femenino	31/125	158/205	12/10
Edad, años	100,9±2 (99-111)	70,4±6 (55-88)	30,6±5 (25-40)
Clínica			
IMC <sup>1</sup> , kg/m <sup>2</sup>	23,8±3,7 (13,3-34,1)	26,9±4,6 (16,7-54,7)	21,92±2,1 (18,3,23,6)
HOMA	1,90±2,8 (0,20-23)	3,3±3,1 (0,20-28,9)	n/a
Diabetes <sup>2</sup> , n	8	36	n/a
Colesterol, mg/dl	188,2±38,1 (110-318)	201,0±38,8 (5-335)	162,3±28,4 (123-207)
Triglicéridos, mg/dl	119,6±65,4 (50-535)	125,5±63,1 (41-550)	71,1±32,1 (28-143)
HDL <sup>3</sup> , mg/dl	47,4±13,1 (20-99)	55,8 ± 21,1 (20-212)	51,3±8,7 (38-66)
LDL <sup>4</sup> , mg/dl	116,2±36,1 (27-248)	120±41,7 (12-248)	96,8±30,1 (49-144)
MMSE <sup>5</sup>	20,3±6,4 (1,3-30,8)	27,3±1,9 (1,3-31,0)	n/a
CRP <sup>6</sup> , mg/L	5,8±6,1 (0,28-28,2)	2,8±3,7 (0,11-25,7)	0,7±0,4 (0,28-2,03)
Insuficiencia cardíaca, n	44	4	0
Ritmo cardíaco irregular, n	33	46	0
Angina de pecho, n	25	12	0
A-SAA <sup>7</sup> , µg/ml	540±706 (0,01-3859,4)	158,2±21,9,6 (0,01-1861,9)	n/a
Metabólica			
Orina- <sup>1</sup> H-RMN	18/74	128/155	11/10
Sexo, masc/fem, años	100,9±2 (99-111)	70,1±6 (55-88)	30,9±5 (24-40)
Suero objetivo EM	30/113	34/56	11/9
Sexo, masc/fem, años	100,9±2 (99-111)	69,6±6 (56-86)	30,6±5 (24-40)
Lipidómica			
Suero objetivo EM	2/10	21/16	9/9
Sexo, masc/fem, años	101±2 (99-104)	70±6 (59-78)	31,2±5 (25-40)

20

Tabla 2:

Descripción general	R2X (cum)	R2Y (cum)	Q2Y	AuROC	
Centenarios vs, Ancianos	0,14	0,52	0,39	0,96	0,93
Centenarios vs, Jóvenes	0,14	0,86	0,75	1,00	1,00
Jóvenes vs, Ancianos	0,05	0,21	0,09	0,92	0,81

Tabla 3:

Grupo de edad		Centenarios	Ancianos	Jóvenes
		Media ± DE	Media ± DE	Media ± DE
Pico Integral (au)	Cambio químico			
PAG	2,34 (s)	9,93 ± 3,72***	6,62 ± 2,59	5,89 ± 2,35
PCS	7,36 (m)	4,06 ± 1,53***	2,62 ± 1,22	2,32 ± 0,85

25

Tabla 4:

Metabolitos [ $\mu\text{M}/1$ ]	Jóvenes	Ancianos	Centenarios
	Media $\pm$ DE	Media $\pm$ DE	Media $\pm$ DE
PC-O 32:1	2,02 $\pm$ 0,36	2 $\pm$ 0,51	2,35 $\pm$ 0,63*
PC-O 34:1	7,34 $\pm$ 1,07	7,88 $\pm$ 1,71	9,54 $\pm$ 2,19***
PC-O 34:3	5,73 $\pm$ 1,4	5,07 $\pm$ 1,71	3,94 $\pm$ 1,54***
PC-O 36:2	9,54 $\pm$ 1,75	9,58 $\pm$ 2,39	9,29 $\pm$ 2,26*
PC-O 36:4	14,48 $\pm$ 2,83	14,35 $\pm$ 3,55	12,39 $\pm$ 2,56*
PC-O 40:1	1,23 $\pm$ 0,23	1,41 $\pm$ 0,41	1,02 $\pm$ 0,32***
LPC 18:0	52,18 $\pm$ 12,93	52 $\pm$ 13,5	40,4 $\pm$ 12,02**
SM 24:0	23,45 $\pm$ 4,37	25,64 $\pm$ 5,31	19,79 $\pm$ 4,92***
SM-OH 22:1	14,52 $\pm$ 2,94	16,07 $\pm$ 3,37	11,51 $\pm$ 3,04***

Tabla 5:

Metabolitos [( $\mu\text{g}/100$ ml de suero)]	Jóvenes	Ancianos	Centenarios
LTE4	0,015 $\pm$ 0,014	0,013 $\pm$ 0,011	0,035 $\pm$ 0,03 ***
LTB4	0,011 $\pm$ 0,014	0,019 $\pm$ 0,047	0,016 $\pm$ 0,009 *
EPA	0,097 $\pm$ 0,036	0,123 $\pm$ 0,052	0,078 $\pm$ 0,026 **
15-HpETE	1,512 $\pm$ 1,949	1,255 $\pm$ 1,245	3,348 $\pm$ 2,865 ***
11,12-DIHETRE	0,02 $\pm$ 0,006	0,017 $\pm$ 0,004	0,016 $\pm$ 0,006 *
9-oxo-ODE	0,042 $\pm$ 0,028	0,043 $\pm$ 0,039	0,022 $\pm$ 0,013 ***
9-HODE	0,348 $\pm$ 0,223	0,397 $\pm$ 0,677	0,204 $\pm$ 0,211 **
8,9-EpETRE	0,067 $\pm$ 0,101	0,074 $\pm$ 0,186	0,113 $\pm$ 0,107 ***

**REIVINDICACIONES**

1. Un método para diagnosticar un estilo de vida que permita un envejecimiento saludable que comprenda:

- 5 - determinar el nivel de 1-O-alkil-2 acilglicerofosfolina 40:1 (PC-O 40:1), en una muestra de suero aislada de un sujeto, y  
 - comparar el PC-O 40:1 del sujeto a un valor de referencia predeterminado,

10 en el que el valor de referencia predeterminado se basa en un nivel de PC-O 40:1 en suero en una población de control, y en el que un nivel de PC-O 40:1 en suero disminuido en la muestra en comparación con el valor de referencia predeterminado indica una mayor probabilidad de permitir un envejecimiento saludable.

2. El método de la reivindicación 1, que comprende además:

- 15 - determinar el nivel de al menos uno de SM-OH 22:1, LPC 18:0, SM 24:0, PC-O 34:1, 9-HODE, 9-oxo-HODE, o LTE4 en la muestra, y  
 - comparar el nivel del sujeto de al menos uno de SM-OH 22:1, LPC 18:0, SM 24:0, PC-O 34:1, 9-HODE, 9-oxo-HODE o LTE4 a un valor de referencia predeterminado,

20 en el que el valor de referencia predeterminado se basa en el nivel en suero promedio de SM-OH 22:1, LPC 18:0, SM 24:0, PC-O 34:1, 9-HODE, 9-oxo-HODE o LTE4 en una población de control, y en el que disminuye el nivel sérico de PC-O 40:1 en la muestra y / o un nivel inferior en suero de SM-OH 22:1, LPC 18:0, SM 24:0, PC-O 40:1, 9-HODE, o 9-oxo-HODE en la muestra en comparación con los valores de referencia predeterminados indican una mayor probabilidad de permitir un envejecimiento saludable, y/o

25 en el que el aumento de los niveles en suero de LTE4, PC-O 34:1 en la muestra en comparación con los valores de referencia predeterminados indican una mayor probabilidad de permitir un envejecimiento saludable.

30 3. El método de una de las reivindicaciones precedentes, donde la precisión del diagnóstico aumenta al evaluar si uno o más de los siguientes biomarcadores PC-O 32:1, 15-HpETE, LTB4, 8,9 EpETre aumentan en suero, y/o si uno o más de los siguientes biomarcadores PC-O 34:3, PC-O 36:4, PC 36:2, 11,12-DiHETre disminuyen en suero, en comparación con un valor de referencia previamente obtenido.

4. El método de una de las reivindicaciones precedentes para diagnosticar la longevidad.

35 5. El método de una de las reivindicaciones precedentes para diagnosticar un estilo de vida más saludable, en el que los valores de referencia predeterminados se basan en niveles séricos obtenidos del sujeto antes de un cambio en el estilo de vida.

6. El método de acuerdo con la reivindicación 5, en el que el cambio en el estilo de vida es un cambio en la dieta.

40 7. El método de acuerdo con la reivindicación 6, en el que el cambio en la dieta es el uso de al menos un producto nutricional que anteriormente no se consumía o consumía en diferentes cantidades.

45 8. El método de acuerdo con una de las reivindicaciones 6 o 7 para probar la efectividad de un nuevo régimen nutricional.

9. El método de una de las reivindicaciones precedentes donde los niveles de PC-O 40:1 y opcionalmente los otros biomarcadores se determinan por <sup>1</sup>H-RMN y/o espectrometría de masas en la muestra y en la referencia.

50 10. El método de una de las reivindicaciones precedentes para diagnosticar un estilo de vida más saludable, en el que los valores medios de referencia predeterminados son

- 2 µM para 1-O-alkil-2-acilglicerofosfolina (PC-O) 32:1,  
 - 7,80 µM para 1-O-alkil-2-acilglicerofosfolina (PC -O) 34:1,  
 55 - 1,25 µg/100 ml de suero para el ácido 15-hidroxi-eicosatetraenoico (15-HpETE),  
 - 0,013 µg/100 ml de suero para leucotrieno E4 (LTE4),  
 - 0,020 µg/100 ml de suero para leucotrieno B4 (LTB4), y/o  
 - 0,070 µg/100 ml de suero para 8,9-epoxieicosatrienoico (8,9 EpETre)  
 - 16,07 µM para hidroxí- esfingomielina (SM-OH) 22:1,  
 60 - 52,00 µM para lisofosfatidilcolinas (LPC) ) 18:0,  
 - 25,00 µM para esfingomielina (SM) 24:0,  
 - 5,07 µM para 1-O-alkil-2-acilglicerofosfolina (PC-O) 34:3,  
 - 14,30 µM para 1-O-alkil-2- acilglicerofosfolina (PC-O) 36:4,  
 - 1,41 µM para 1-O-alkil-2- acilglicerofosfolina (PC-O) 40:1,  
 65 - 10,00 µM para fosfatidilcolina (PC) 36:2,

- 0,34 µg/100 ml de suero para ácido hidroxiocadecadienoico (9-HODE),
- 0,043 µg/100 ml de suero para ácido 9-oxo-octadecadienoico (9-oxo-HODE), y/o
- 0,017 µg/100 ml de suero para ácido 11,12-epoxieicosatrienoico (11,12-DiHETre).

5 11. El método de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 10, que comprende además:

- obtener una muestra de orina de un sujeto
- determinar el nivel de fenilacetilglutamina (PAG) y/o sulfato de p-cresol (PCS) en la muestra, y
- comparar el nivel de fenilacetilglutamina (PAG) y/o PCS del sujeto a un valor de referencia predeterminado,

10 en el que el valor de referencia predeterminado se basa en un nivel promedio de PAG y/o PCS en una población de control, y niveles elevados en orina de PAG y/o PCS en la muestra en comparación con los valores de referencia predeterminados indican una mayor probabilidad de permitir un envejecimiento saludable.

15 12. Un método para diagnosticar un estilo de vida que probablemente evite el envejecimiento saludable y/o el riesgo de una reducción en la esperanza de vida, que comprende

- determinar el nivel de PC-O 40:1 en una muestra de suero aislada de un sujeto, y
- comparar el nivel de PC-O 40:1 del sujeto con un valor de referencia predeterminado,

20 en el que el valor de referencia predeterminado se basa en un nivel de PC-O 40:1 en una población de control, y en el que el aumento del nivel sérico de PC-O 40:1 en la muestra en comparación con el valor de referencia predeterminado indica un estilo de vida que probablemente evite el envejecimiento saludable y/o un mayor riesgo de reducción en la esperanza de vida.

25 13. Un método para promover un envejecimiento saludable que promueva la longevidad y/o reduzca el riesgo de una reducción en la esperanza de vida que comprenda:

- (a) realizar un método de diagnóstico como se describe en la reivindicación 12; y
- (b) modificar el estilo de vida del sujeto si el sujeto tiene un estilo de vida que probablemente evite el envejecimiento saludable y/o un mayor riesgo reducción en la esperanza de vida.

30 14. Un método de acuerdo con la reivindicación 13, en el que la modificación del estilo de vida en el sujeto comprende un cambio en la dieta.

35 15. Un método de acuerdo con la reivindicación 14, en el que el cambio en la dieta comprende administrar al menos un producto nutricional al sujeto que tiene un efecto sobre el envejecimiento saludable.

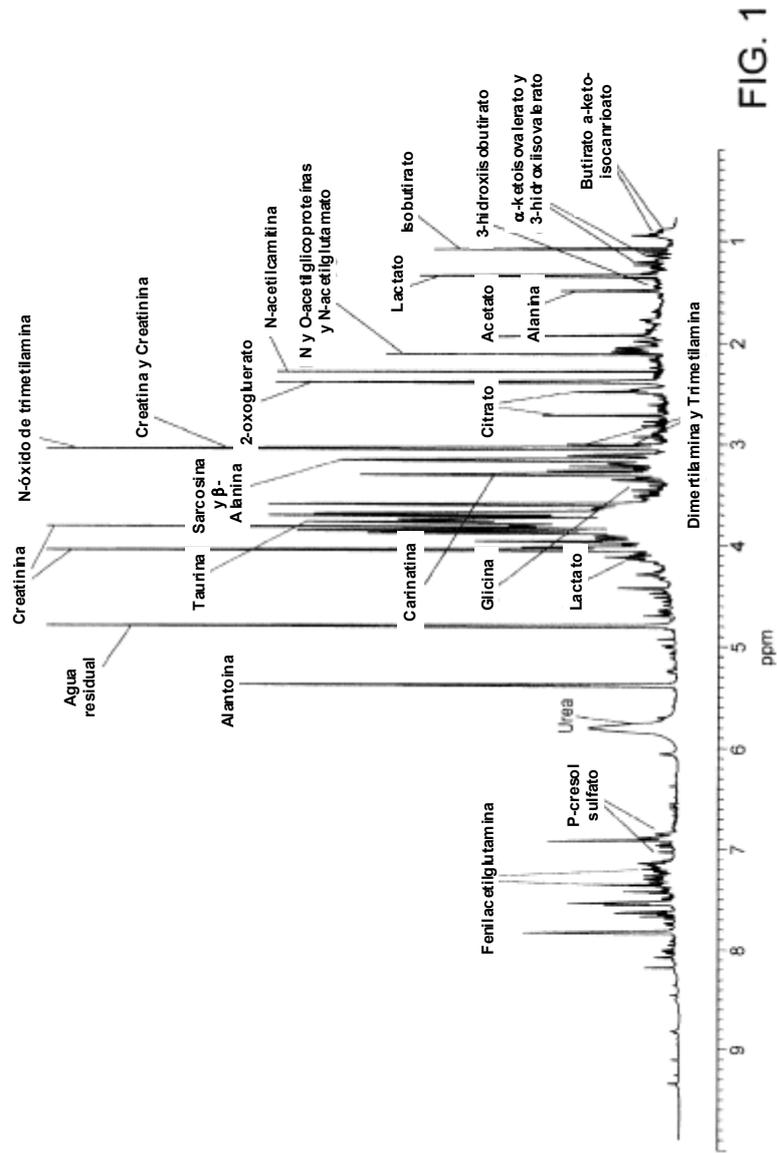


FIG. 1

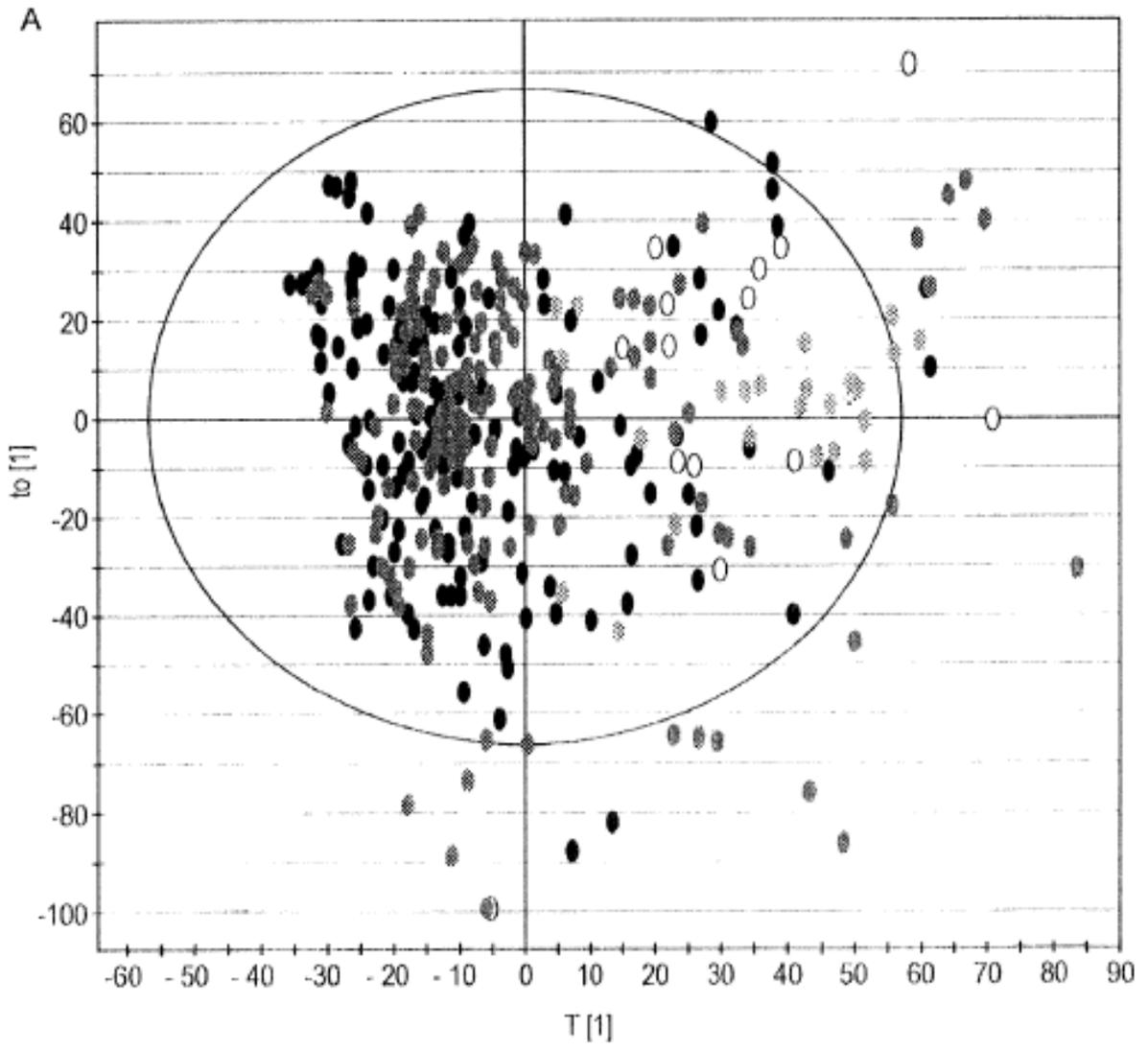
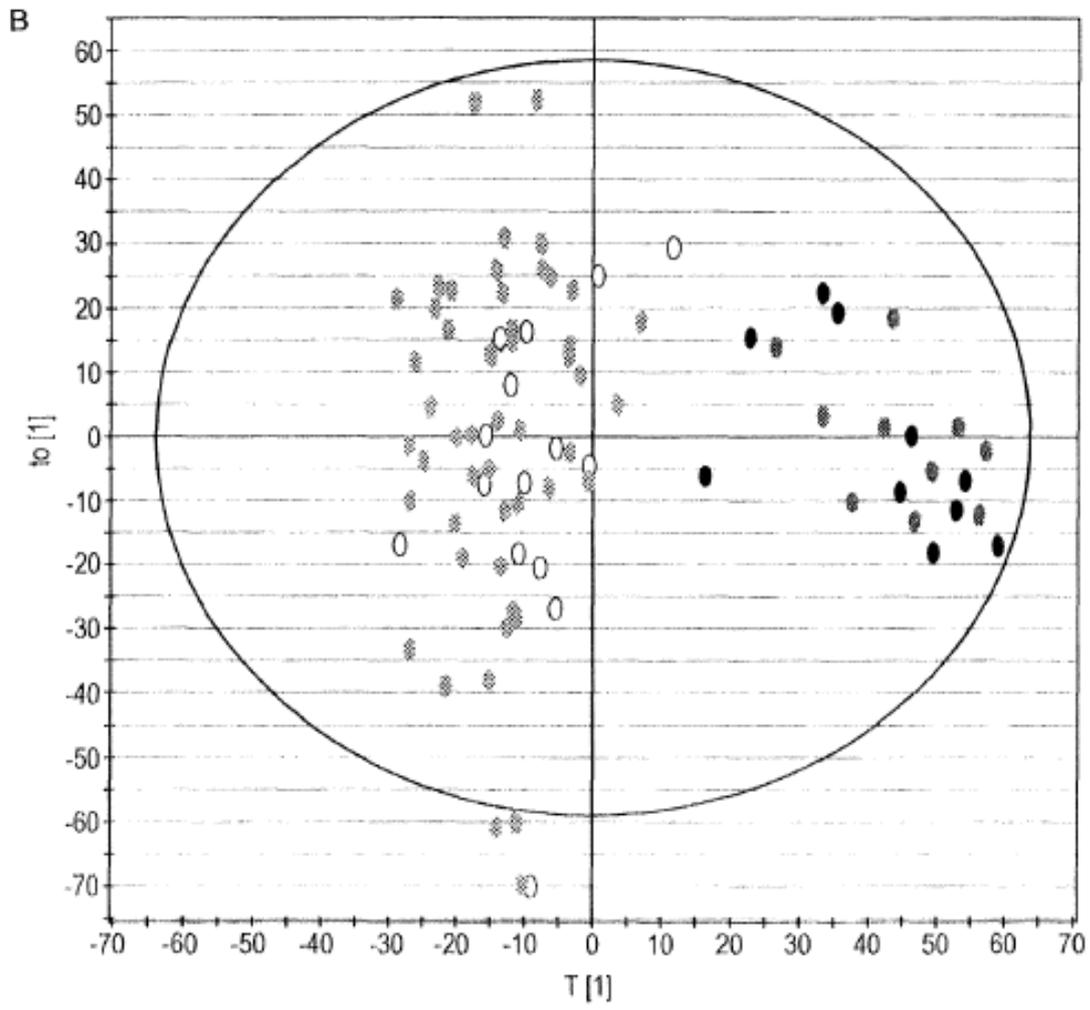


FIG. 2



**FIG. 2** Continuación

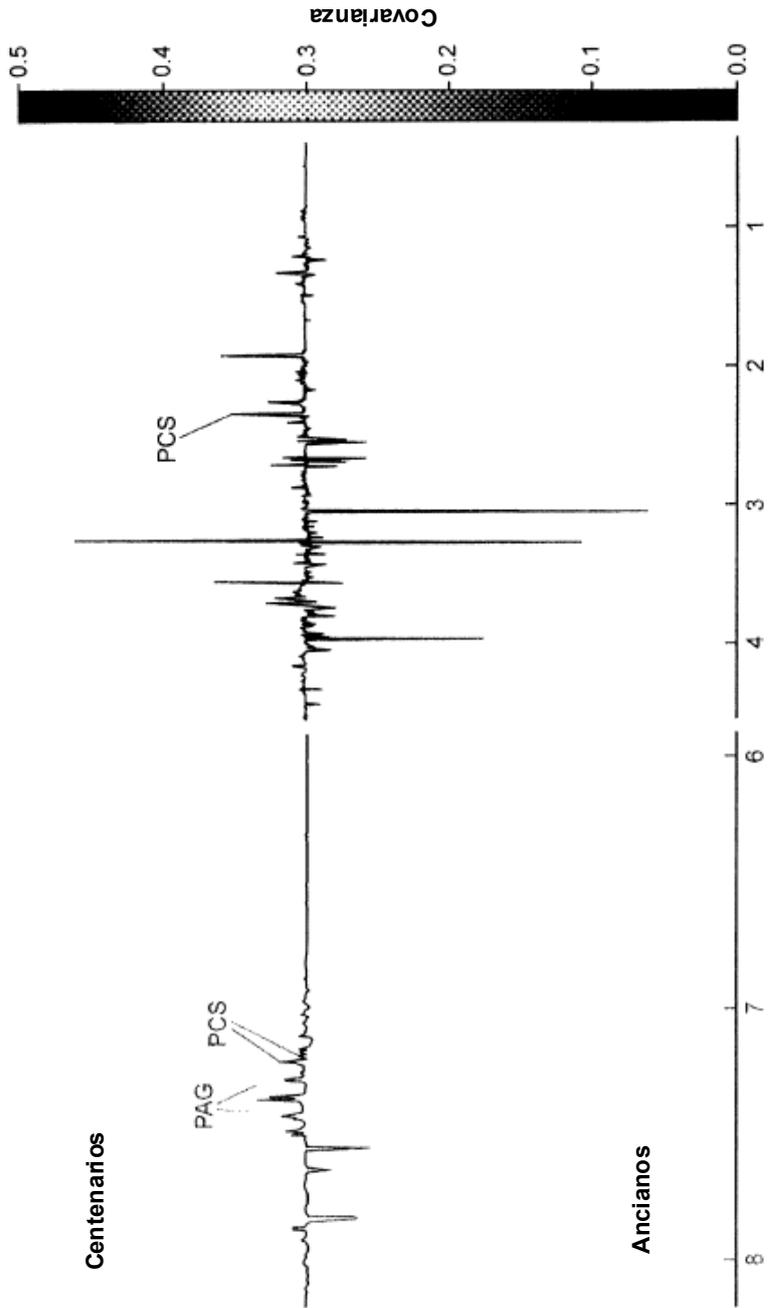


FIG. 3

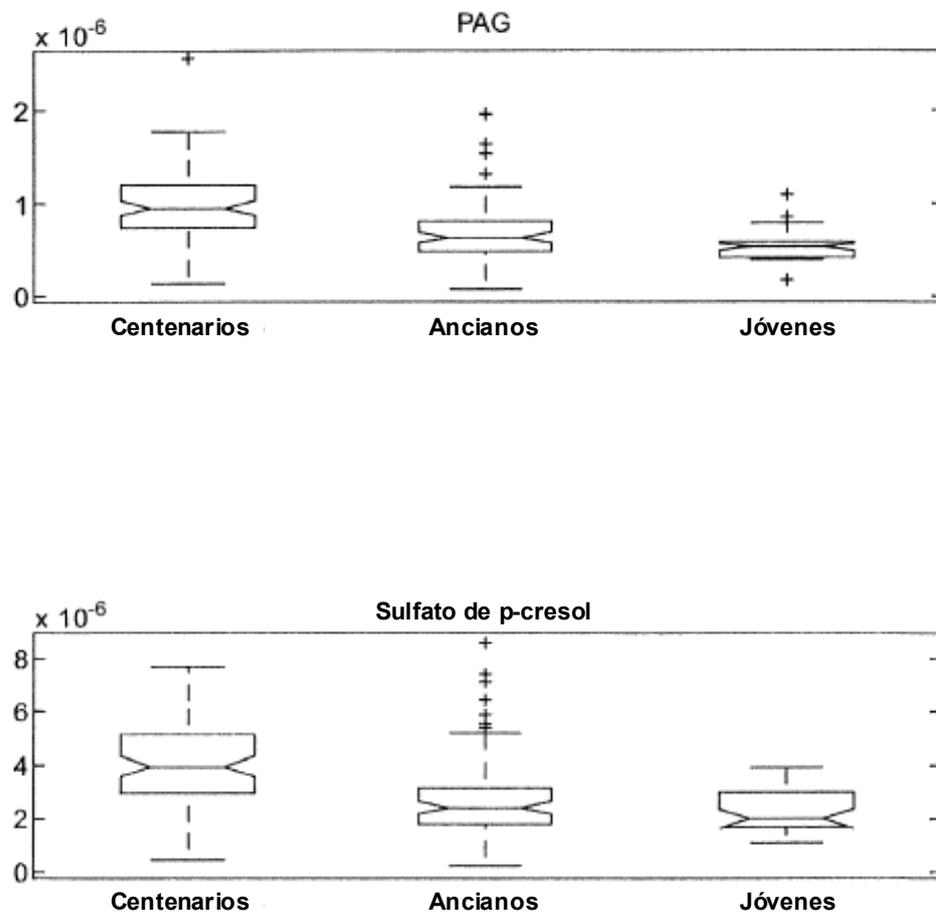


FIG. 4

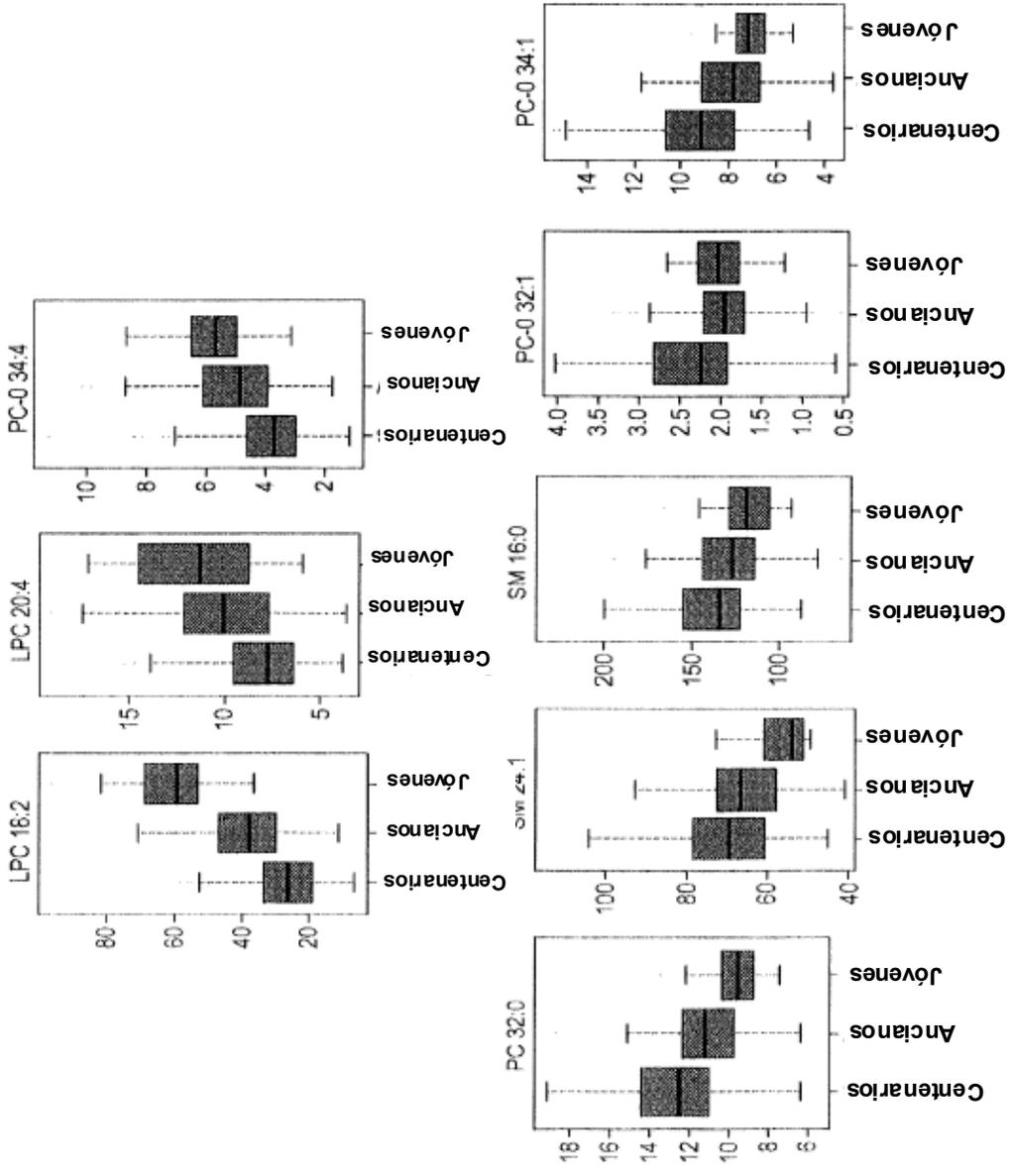


FIG. 5a

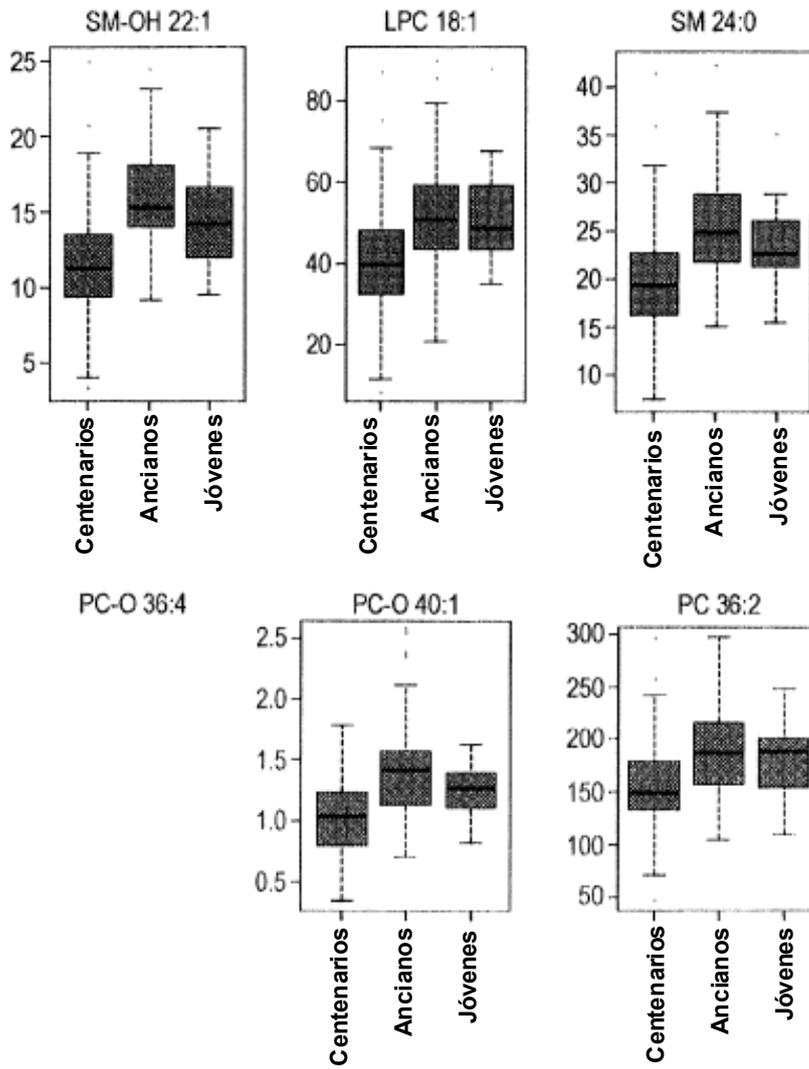


FIG. 5b

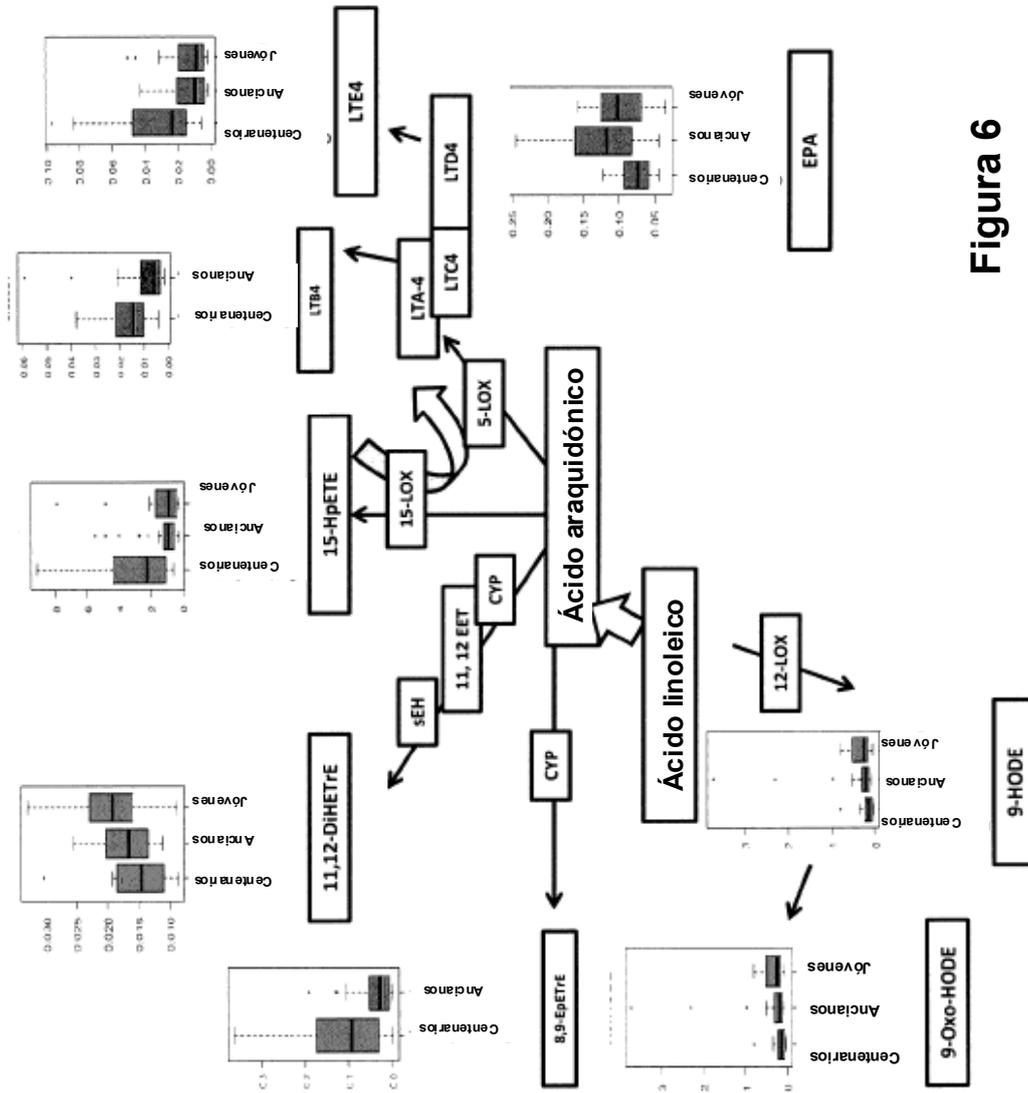


Figura 6