

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 655 271**

51 Int. Cl.:

G01N 33/68 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **05.03.2013 PCT/EP2013/054325**

87 Fecha y número de publicación internacional: **26.09.2013 WO13139579**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **05.03.2013 E 13709174 (0)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **25.10.2017 EP 2828667**

54 Título: **Ácido 9-oxo-octadecadienoico (9-oxo-HODE) como biomarcador para el envejecimiento saludable**

30 Prioridad:

22.03.2012 EP 12160731

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

19.02.2018

73 Titular/es:

**NESTEC S.A. (100.0%)
CT-IAM, 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 2 655 271 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

Ácido 9-oxo-octadecadienoico (9-oxo-HODE) 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, ácido 9-oxo-octadecadienoico (9-oxo-HODE) como 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 utilizan el biomarcador ácido 9-oxo-octadecadienoico (9-oxo-HODE).
10

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 resultante de la interacción de una 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.
15

20 Estas preguntas con frecuencia no son abordables al examinar un solo gen o una única ruta, pero se abordan mejor a nivel sistémico, asumiendo 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, hay una creciente conciencia de la importancia de la variación en la microbiota intestinal como sus efectos en el sistema mamífero huésped, que ha mostrado influencia directa en la etiología de varias enfermedades como 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.
35

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 exhaustivo de los mecanismos moleculares que afectan el proceso de envejecimiento. Por otra parte, aún falta una fenotipificación metabólica de la longevidad.
45

En consecuencia, el objetivo de la presente invención era proporcionar a la técnica un biomarcador que se pueda detectar fácilmente y que le permita diagnosticar un estilo de vida que permita un envejecimiento saludable y que, en particular, permita retrasar y/o evitar los trastornos inflamatorios crónicos relacionados con el envejecimiento.
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 una metodología holística de espectroscopía de resonancia magnética nuclear ¹H (RMN) en orina, y espectrometría de masas dirigida (MS) y metodologías lipidómicas en suero, los inventores podrían detectar cambios en los perfiles metabólicos de una cohorte de envejecimiento bien definida que compromete a los centenarios, mayores y adultos jóvenes.

60 El grupo de envejecimiento seleccionado representa una población homogénea de un área geográfica restringida del norte de Italia, que compromete a adultos jóvenes (31 años en promedio), mayores (70 años) y personas centenarias (100 años). 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 antiinflamatorias [Franceschi C, et al., Mech Aging Dev. 2007; 128:92 - 105].
65

Los inventores se sorprendieron al encontrar profundas diferencias entre los fenotipos mayores 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-MS complementario, tanto en orina como en suero, el fenotipo metabólico (metabototipo) 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 exhiben 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 metabonómico dirigido completo basado en MS reveló importantes cambios biológicos 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 de LPC 18:0 parece ser específica de 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, y col., Mol Cell Biochem. 2007; 295:113-120], con propiedades aterogénicas [Schmitz G, et al., Atherosclerosis. 2010; 208:10-18], y sus niveles de aumento a menudo se observan en pacientes con diabetes tipo 2 [Rabini RA, et al., Diabetes. 1994; 43:915 - 919].

35 Los mayores centenarios muestran un cambio equilibrado en la concentración de varias especies de PC acil-éter con contenido de tres especies de PC-O, PC-O 34:3, PC-O 36:4, PC-O 40:1 disminuido significativamente y dos especies de PC éter, PC-O 32:1, PC-O 34:1, significativamente más altas. Si bien el papel fisiológico de los fosfolípidos de éter es menos conocido, los plasmalógenos que contienen un enlace viniléter 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 aciléter 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 un marcado aumento en SM-24:1 y SM-16:0 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, el metabolismo y el transporte, y que se enriquecen en las 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 CVD. Por último, aunque no hubo 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.

50 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.

60 En comparación con los mayores, 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). El 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 mayores, 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. Los EpETrE son componentes importantes de muchas señales intracelulares en tejidos cardíacos y extracardíacos. Los estudios han demostrado que los EpETrEs 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 epítopos pueden ser metabolizados adicionalmente por epóxido hidrolasa soluble (sEH) a ácidos dihidroxi-eicosatrienoicos (DiHETrE).

En general, cuando los EpETrEs son metabolizados a DiHETrEs por sEH, sus actividades biológicas se vuelven menos pronunciadas, por lo tanto, aquí la disminución en la concentración de 11,12-DHET podría revelar un efecto disminuido sEH 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. La mayor parte del ácido linoleico existe en formas esterificadas como PC y linoleato de colesterilo, ambos son componentes principales del LDL y están continuamente expuestos a muchos tipos de estrés oxidativo para generar especies hidroxiladas y hidroperoxiladas.

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 arterosclerosis.

Además, en comparación con los mayores, los centenarios exhiben agotamiento en el ácido eicosapentanoico (EPA). Mientras que el 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, el EPA puede transformarse en eicosanoides n-3, que tienen diversas funciones. Un agotamiento del EPA podría mostrar un aumento de la biosíntesis de eicosanoides n-3.

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

- determinar el nivel de ácido 9-oxo-octadecadienoico (9-oxo-HODE), en una muestra de suero obtenida de un sujeto, y
- comparar el nivel 9-oxo-HODE del sujeto con un valor de referencia predeterminado,

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 un nivel de 9-oxo-HODE sérico inferior en la muestra 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.

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 9-oxo-HODE en la muestra puede detectarse y cuantificarse por cualquier medio conocido en la técnica. Por ejemplo, espectroscopia de masas, por ejemplo, UPLC-ESI-MS/MS o espectroscopia de RMN, por ejemplo. Se puede usar espectroscopia de ¹H-RMN. También se pueden usar otros métodos, como otros métodos espectroscópicos, métodos cromatográficos, técnicas de etiquetado o métodos químicos cuantitativos. El documento de la técnica anterior A. E. FELDSTEIN Y ET AL, "Mass spectrometric profiling of oxidized lipid products in human nonalcoholic fatty liver disease and nonalcoholic steatohepatitis", THE JOURNAL OF LIPID RESEARCH, (20101001), vol. 51, no. 10, pages 3046 - 3054) enseña el perfil de espectrometría de masas de productos lipídicos oxidados en la enfermedad hepática grasa no alcohólica y la esteatohepatitis no alcohólica humanas.

El valor de referencia predeterminado se basa en un nivel promedio de 9-oxo-HODE en suero en una población de control. La población de control puede ser un grupo de al menos 3, preferiblemente al menos 10, más preferiblemente al menos 50 personas con un fondo genético, edad y un estado de salud promedio similares.

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 típico 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).

Los trastornos inflamatorios típicos relacionados con la edad son arterosclerosis, artritis, demencia, diabetes tipo 2, osteoporosis y enfermedades cardiovasculares, por ejemplo. 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, Volume 8, Numbers 3 & 4, 2006, 572-581).

Se puede usar 9-oxo-HODE como el único marcador para el propósito de la presente invención.

Mientras que el 9-oxo-HODE como marcador único es eficaz como una 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 más de un solo marcador.

5 Por lo tanto, se pueden usar uno o más marcadores diferentes para la probabilidad de retrasar y/o evitar trastornos inflamatorios crónicos relacionados con el envejecimiento en combinación con 9-oxo-HODE.

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.

10 Como tales, los inventores han identificado que concentraciones de suero aumentadas 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 los trastornos inflamatorios crónicos relacionados con el envejecimiento, mientras que concentraciones séricas disminuidas de Lisofosfatidilcolinas (LPC) 18:0 Hidroxi-esfingomielina (SM-OH) 22:1, esfingomielina (SM) 24:0, 1-O-alkil-2-acilglicerofosfolina (PC-O) 34:3, 1-O-alkil-2-acilglicerofosfolina (PC-O) 36:4, 1-O-alkil-2-acilglicerofosfolina (PC-O) 40:1, Fosfatidilcolina (PC) 36:2, ácido hidroxi-octadecadienoico (9-HODE), y/o 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.

20 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.

25 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 LPC 18:0, SM-OH 22:1, SM 24:0, PC-O 34:3, PC-O 36:4, PC-O 40:1, PC 36:2, 9-HODE,, 11,12-DiHETre disminuye en el suero, en comparación con un valor de referencia previamente obtenido.

30 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.

35 Por ejemplo, 9-oxo-HODE puede evaluarse junto con SM-OH 22:1.

También se puede evaluar 9-oxo-HODE junto con SM 24:0.

40 Se puede evaluar 9-oxo-HODE junto con PC-O 34:1.

Se puede evaluar 9-oxo-HODE junto con LTE4.

Se puede evaluar 9-oxo-HODE junto con PC-O 40:1.

45 Se puede evaluar 9-oxo-HODE junto con SM-OH 22:1 y SM 24:0.

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

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

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

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

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

60 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 los trastornos inflamatorios crónicos relacionada con el envejecimiento.

65 En consecuencia, el método de la presente invención puede comprender además determinar el nivel de al menos uno de SM-OH 22:1, SM 24:0, PC-O 40:1, 9-HODE, LPC 18:0, , PC-O 34:1, o LTE4 en la muestra, y comparar el nivel del sujeto de al menos uno de SM-OH 22:1, SM 24:0, PC-O 40:1, 9-HODE, LPC 18:0, PC-O 34:1, 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, SM 24:0, PC-O 40:1, 9-HODE, 9-oxo-HODE, PC-O 34:1, o nivel de LTE4 en una población de control,

5 y en el que un nivel inferior de LPC en suero 18:0 en la muestra y/o un suero inferior SM-OH 22:1, SM 24:0, PC-O 40:1, 9-HODE, o LPC 18:0 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 cuando el suero elevado Los niveles de PC-O 34:1 y/o LTE4 en la muestra en comparación con los valores de referencia predeterminados indican una mayor probabilidad de retraso y/o evitar los trastornos inflamatorios crónicos relacionados con el envejecimiento.

10 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.

15 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.

20 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.

25 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.

30 El método de la presente invención puede usarse adicionalmente de forma 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.

35 Las interacciones intestino-microflora-huésped se pueden diagnosticar 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.

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

45 Un sujeto se considera "mayor" 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.

50 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 que se va 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.

55 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 LPC 18:0 y opcionalmente los niveles de los otros biomarcadores mencionados aquí se comparan con el nivel de LPC 18:0 y opcionalmente los niveles de los otros biomarcadores obtenidos previamente del sujeto, por ejemplo, antes del cambio en el estilo de vida o antes durante el cambio en el estilo de vida.

60 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 9-Oxo-HODE en suero y opcionalmente los niveles de los otros biomarcadores obtenidos del sujeto antes de un cambio en el estilo de vida.

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 de trabajo y/o de vida diferente, por ejemplo.

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

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

10 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.

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

20 El nivel de los biomarcadores, tal como el nivel de LPC 18:0 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, espectroscopia de masas, por ejemplo, UPLC-ESI-MS/MS o espectroscopia de RMN, por ejemplo. Se puede usar, espectroscopia de ¹H-RMN.

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

El método de la presente invención comprende comparar niveles de 9-Oxo-HODE y opcionalmente los otros biomarcadores de un sujeto de prueba con valores de referencia predeterminados que pueden derivarse del nivel de 9-Oxo-HODE en suero y opcionalmente los niveles de otros biomarcadores de sujetos de control comparables.

30 El alcance de la diferencia entre el nivel de 9-Oxo-HODE del sujeto y opcionalmente el nivel de los otros biomarcadores y el valor de control correspondiente también es útil para caracterizar el alcance del riesgo y, por lo tanto, determinar qué sujetos se beneficiarían más de ciertos terapias.

35 El valor de referencia para 9-Oxo-HODE y opcionalmente para los otros biomarcadores se mide preferiblemente usando las mismas unidades usadas para caracterizar el nivel de LPC 18:0 y opcionalmente los otros biomarcadores obtenidos del sujeto de prueba. Por lo tanto, si el nivel de 9-Oxo-HODE y opcionalmente los otros biomarcadores es un valor absoluto como las unidades de 9-Oxo-HODE en (ng/100 µl de suero, el valor de referencia también se basa en las unidades de 9-Oxo-HODE en ng/100 µl de suero 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 LPC 18:0 y opcionalmente los otros biomarcadores en muestras de suero obtenidas, tales como niveles medios, niveles de mediana o niveles de "corte", se pueden establecer analizando una muestra grande de individuos en la población general o la población seleccionada 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 Bioestadística. William y Wilkins, Harual Publishing Co. Malvern, Pa.

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

Por ejemplo, los valores medios de referencia predeterminados pueden ser

- 55
- 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,
 - 1,25 ng/100 µl de suero para el ácido 15-hidroxi-eicosatetraenoico (15-HpETE),
 - 0.013 ng/100 µl de suero para Leucotrieno E4 (LTE4),
 - 60 • 0.020 ng/100 µl de suero para Leucotrieno B4 (4LTB), y/o
 - 0.070 ng/100 µl de suero para 8,9-epoxieicosatrienoico (8,9 EpETre)
 - 16.07 µM para Hidroxi-esfingomielina (SM-OH) 22:1,
 - 52.00 µM para lisofosfatidilcolinas (LPC) 18:0,
 - 25.00 µM para esfingomielina (SM) 24:0,
 - 65 • 5.07 µM para 1-O-alkil-2-acilglicerofosfolina (PC-O) 34:3,

- 14.30 μM para 1-O-alkuil-2-acilglicerofosfolina (PC-O) 36:4,
- 1.41 μM para 1-O-alkuil-2-acilglicerofosfolina (PC-O) 40:1,
- 10.00 μM para fosfatidilcolina (PC) 36:2,
- 0.34 ng/100 μl de suero para ácido hidroxiocadecadienoico (9-HODE),
- 5 • 0.043 ng/100 μl de suero para el ácido 9-oxo-octadecadienoico (9-oxo-HODE), y/o
- 0.017 ng/100 μl de suero para el 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.

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.

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.

La fenilacetilglutamina (PAG) y/o el sulfato de p-cresol (PCS) se pueden evaluar 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.

Los valores de referencia predeterminados para PAG y PCS pueden determinarse por los de la línea de esqui, variando la técnica y el máximo 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 la orina. Los valores más altos son indicativos de una mayor probabilidad de retrasar y/o evitar los trastornos inflamatorios crónicos relacionados con el envejecimiento.

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.

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 LPC 18:0.

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

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.

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,
- diagnosticar un estilo de vida que permita un envejecimiento saludable,
- diagnosticar la longevidad, y/o
- al diagnosticar interacciones saludables entre la microflora y el huésped intestinal, los biomarcadores también pueden aplicarse en un método para
- 55 • diagnosticar un estilo de vida que favorezca el desarrollo de trastornos inflamatorios crónicos relacionados con el envejecimiento,
- diagnosticar un estilo de vida que probablemente evite el envejecimiento saludable,
- diagnosticar un riesgo para una esperanza de vida acortada, y/o
- diagnosticar interacciones intestinales entre la microflora y el hospedador que son menos saludables.

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,
- 65 • promover la longevidad,

- reducir el riesgo de una esperanza de vida acortada,
- promoviendo interacciones intestinales entre la microflora y el hospedador, y/o
- prevenir interacciones intestinales entre la microflora y el hospedador.

5 Típicamente, tales métodos comprenden una etapa de realizar un método de diagnóstico como se describe aquí en un sujeto; y modificar un 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,
- 10 • un estilo de vida que pueda evitar el envejecimiento saludable,
- un riesgo de acortar la duración de la vida, y/o
- interacciones intestinales de microflora-huésped no saludables;

15 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, por ejemplo.

20 Preferiblemente, el cambio es el uso de al menos un producto nutricional que previamente no se consumía o se consumía en cantidades diferentes, 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).

25 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.

30 Las ventajas y características adicionales de la presente invención son evidentes a partir de las siguientes Tablas, Ejemplos y Figuras.

35 La Tabla 1 muestra las características clínicas demográficas de la cohorte de envejecimiento reclutada. Los valores se presentan como promedios (\pm SD) con el rango entre paréntesis.¹BMI = índice de masa corporal, ²Diabetes mellitus: antecedentes de diabetes, plasma de glucosa en ayunas ≥ 126 mg/dl, ³HDL = lipoproteína de alta densidad, ⁴LDL = lipoproteína de baja densidad, ⁵MMSE = Medida de la función cognitiva utilizando 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 ≥ 20 ausencia de deterioro cognitivo severo; < 12 presencia de deterioro cognitivo severo. ⁶CRP = proteína C reactiva ⁷A-SAA = proteínas de amiloide A séricas (SAA).

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

50 La Tabla 3 muestra todos los metabolitos regulados significativamente en la orina para los 3 grupos de edad detectados por ¹H-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.

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

La Tabla 5 muestra niveles de concentración (ng/100 μ l) de marcadores de inflamación en suero para los 3 grupos de edad analizados por UPLC-ESI-MS/MS, y marcados de la siguiente manera: *p < 0.05., **p < 0.01, ***p < 0.001.

60 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).

65 La Figura 2 muestra la puntuación de OPLS-DA (A) a partir de los espectros de ¹H-RMN urinaria de mayores y centenarios (B) de adultos jóvenes y centenarios.

La Figura 3 muestra el gráfico de coeficientes derivado de los espectros de ^1H -RMN urinarios de mayores y centenarios.

5 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.

10 Las Figuras 5a, 5b muestran diferencias en los perfiles lipídicos (concentraciones medias de lípidos) entre los tres puntos de tiempo de envejecimiento medidos mediante análisis metabonómico de UPLC-ESI-MS/MS dirigido. Los diagramas de caja representan cambios de izquierda a derecha que denotan centenarios, mayores y personas jóvenes. La concentración está en μM . Los valores medios \pm desviación estándar de la MS 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.

15 La Figura 6 muestra las diferencias en los perfiles lipídicos (los resultados se expresan en $\text{ng}/100 \mu\text{l}$ y representan las concentraciones medias de lípidos) entre los tres puntos de tiempo de envejecimiento medidos mediante análisis metabonómico dirigido de UPLC-ESI-MS/MS. Los diagramas de caja representan cambios de izquierda a derecha que indican centenarios, personas mayores y jóvenes. Los valores medios \pm desviación estándar de la MS 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 5. Solo se muestran diferencias significativas y se evaluaron mediante la prueba U de Mann-Whitney.

25 Ejemplos:

25 Sujetos y grupos de estudio

30 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 mayores 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).

35 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 metabólico.

Química Clínica

40 Se midieron las concentraciones séricas de colesterol de lipoproteínas de alta densidad (HDL) y triglicéridos totales con kits enzimáticos respectivos 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 (IFNy), interleucina 1 beta (IL-1 β), interleucina 6 (IL-6), interleucina 10 (IL-10), interleucina 12 p70 (IL-12 p70), quimiocina derivada de quimocitos (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 tipo sándwich de doble anticuerpo sensible con CRP antihumano de conejo y CRP antihumano de conejo conjugado con peroxidasa.

50 Preparación de muestra para espectroscopía de ^1H RMN. 1 ml de muestra de orina de los tres grupos de envejecimiento se secó en un aparato de liofilización (Freeze-Dryer Fisher Scientific) y se ajustó a pH 6,8 utilizando 580 μL de una solución regulador de fosfato (KH_2PO_4 , concentración final de 0,2 M) que contenía 1 mM de 3-trimetilsilil de sodio) - [2,2,3,3- $^2\text{H}_4$] -1-propionato (TSP), y se introdujo 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 ^1H RMN usando secuencias de pulso que incluyen una detección de ^1H estándar con supresión de agua. Los espectros estándar se adquirieron con un retraso de relajación de 4s y un tiempo de mezcla de 100 ms. Los espectros de ^1H 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 espectroscopía 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 δ 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 la 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, Procedimiento para muestras de tejido preparación y extracción de metabolitos para metabolómica dirigida de alto rendimiento. *Metabolomics*, 2011. Online First). La preparación de la placa de pozo 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 µl 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 un ion TurboV fuente que funciona en modo de ionización por electroaspersión (ESI). Los extractos de muestra (20 µl) se inyectaron dos veces (en modos ESI positivo y negativo) mediante infusión directa usando un caudal de gradiente de 0-2,4 min:30 µl/min, 2,4-2,8 min:200 µl/min, 2,9-3 min:30 µl/min. Los parámetros fuente de MS 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 MS/MS se realizó en modo de monitorización de reacción programada (SRM) con valores optimizados de potencial de desaglomeración 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>).

Preparación de muestra y cuantificación de los marcadores de inflamación mediante UPLC-ESI-MS/MS utilizando la técnica de dilución de isótopos.

Con base en trabajos publicados 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 µl de muestras de suero del material biológico disponible restante de los tres grupos de edad (n =15 centenarios, n =30 mayores, n =50 adultos jóvenes) con 10 µl de regulador BHT (hidroxitolueno butilado, 79,2 mg/ml de PBS) utilizando el sistema FastPrep® 24. Para cada muestra, se mezcló un total de 50 µl de suero con 5 µl de la solución estándar interna (0,1 ng/µl). La mezcla se acidificó mediante la adición de 15 µl de ácido cítrico (1 N). Para precipitar las proteínas, se añadió un volumen de 550 µl de metanol/etanol (1:1, v:v) y las muestras se mezclaron durante 15 min a 4 ° C antes de ser centrifugadas (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 µl de agua, seguido de la adición de 20 µl de acetonitrilo, antes de centrifugarse a 3500 rpm durante 1 minuto a 4 ° C. El sobrenadante se transfirió a Frascos LC-MS antes del análisis. Los análisis se llevaron a cabo mediante cromatografía líquida acoplada a espectrometría de masas en tándem (LC-MS/MS). El LC se realizó en un sistema de cromatografía líquida de ultrapresión Dionex Ultimate 3000 (UPLC) (Dionex AG, Olten, Suiza). La detección de MS 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 µm, Waters, Milford, EE. UU.). El volumen de inyección fue de 5 µl y la columna se mantuvo a 50 ° C. La fase móvil consistía en agua que contenía ácido acético al 1% (eluyente A) y acetonitrilo (eluyente B) a un caudal constante ajustado a 450 µl/min. La elución de gradiente comenzó desde 20% B con un aumento lineal hasta 50% B a los 6 min, desde 50% 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 monitorización 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 MS 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 voltajes respectivos: 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-Δ12,14-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)

Se ejecutó MVA en varios entornos de software. Por lo tanto, los pasos de importación y preprocesamiento de datos para ¹H RMN y datos de MS 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 MS 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.) Ejecutándose en el R medio ambiente (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 mayor en centenarios, en comparación con los mayores. Los mayores 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 utilizó $^1\text{H-RMN}$ a 600 MHz en orina a partir de las muestras disponibles de los tres grupos de envejecimiento (92 centenarios, 283 mayores 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. Proyección ortogonal en estructuras latentes: el análisis discriminante (OPLS-DA) se llevó a cabo 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 de discriminación de orina entre individuos centenarios y mayores muestra una cantidad relativamente mayor de fenilacetilglutamina (PAG), sulfato de p-cresol (PCS). Para obtener información semicuantitativa, se integraron las áreas de los picos en los espectros originales 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 metabonomía de LC-MS 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 metabonómico LC-MS/MS dirigido sobre las muestras biológicas disponibles de los 3 grupos de envejecimiento (143 centenarios, 90 mayores y 20 adultos jóvenes). El análisis de datos multivariados se realizó utilizando Random Forests (RF™) (Breiman, L., Random Forests, Machine Learning, 2001, 45:5-32) sobre datos semicuantitativos pretratados sobre 160 metabolitos, incluidos aminoácidos, azúcares y acilo-carnitinas, esfingolípidos y glicerofosfolípidos. Usando la característica de importancia variable implementada en RF™, 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 mayores 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 mayores y 18 adultos jóvenes) se empleó un método de LC-MS/MS dirigido para investigar los cambios de concentración en la síntesis de eicosanoides. Aquí, RF™ 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 al mismo tiempo, aumenta las concentraciones de ácido 15-hidroxi-eicosatetraenoico (15-HETE) y leucotrieno E4 (LTE4). En comparación con los niveles más antiguos de ácido eicosapentaenoico (EPA) disminuyó en centenarios. Además, se aplicó un análisis MRC por pares entre centenarios y mayores para maximizar los cambios en estos dos grupos de edad que muestran niveles de concentración sérica de 8,9-epoxieicosatrienoico (8,9-EET) y leucotrieno B4 (LTB4) en centenarios. También se describen otras realizaciones como se describe en los siguientes párrafos numerados:

1. Un método 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 suero de un sujeto

- determinar el nivel de PC-O 40:1, en la muestra, y
- comparar el nivel de PC-O 40:1 del sujeto con un valor de referencia predeterminado,
- 5 en el que el valor de referencia predeterminado se basa en un nivel medio de PC-O 40:1 en suero en una población de control,
- y
- 10 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 los trastornos inflamatorios crónicos relacionados con el envejecimiento.
2. Un método de diagnóstico de un estilo de vida que permite retrasar y/o evitar los trastornos inflamatorios crónicos relacionados con el envejecimiento, que comprende
- 15 obtener una muestra de suero de un sujeto
- determinar el nivel de SM-OH 22:1, en la muestra, y
- 20 comparar el nivel SM-OH 22:1 del sujeto con un valor de referencia predeterminado,
- en el que el valor de referencia predeterminado se basa en un nivel medio de SM-OH 22:1 en una población control,
- y
- 25 en el que un nivel más bajo de SM-OH 22:1 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.
3. El método del párrafo 1 o el párrafo 2, que comprende además
- 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
- 35 comparando 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,
- en donde el valor de referencia predeterminado se basa en el nivel sérico promedio en 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 una población control, y
- 40 en el que una disminución del nivel en suero de PC-O 40:1, SM-OH 22:1, LPC 18:0, SM 24:0, PC-O 40:1, 9-HODE, y/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
- 45 en el que niveles aumentados en suero de 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 trastornos inflamatorios crónicos relacionados con el envejecimiento.
4. El método de uno de los párrafos 1 a 3, 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 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 obtenido previamente
- 50
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
- 55 obtener una muestra de orina de un sujeto
- determinar el nivel de sulfato de p-cresol (PCS), en la muestra, y
- 60 comparar el nivel de PCS del sujeto con un valor de referencia predeterminado,
- en donde el valor de referencia predeterminado se basa en un nivel promedio de PCS en orina en una población de control, y
- 65

en el que un nivel elevado de PCS en la orina 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.

5 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,
10 en el que el valor de referencia predeterminado se basa en el nivel promedio de PAG en orina en una población de control, y

15 en el que niveles elevados de PCS en orina y PAG 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.

20 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
25 comparar el nivel de fenilacetilglutamina (PAG) del sujeto, a un valor de referencia predeterminado,

en el que el valor de referencia predeterminado se basa en un nivel de PAG de orina promedio en una población de control, y

30 en el que un nivel elevado de PAG en la orina en la muestra 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.

35 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,
40 en el que el valor de referencia predeterminado se basa en el nivel promedio de PCS en orina en una población control, y

45 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 trastornos inflamatorios crónicos relacionados con el envejecimiento.

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

50 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 microflora-huésped más saludables.

55 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.

60 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 o de orina obtenidos del sujeto antes de un cambio en el estilo de vida.

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

65 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 cantidades diferentes.

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

17. El método de uno de los párrafos 1 a 16, en el que los niveles de los biomarcadores se determinan por ¹H-RMN y/o espectrometría de masas en la muestra y en la referencia.
- 5 18. El método de uno de los párrafos 1 a 17 para diagnosticar un estilo de vida más saludable, en el que los valores medios de referencia predeterminados son
- 2 µM para 1-O-alkuil-2-acilglicerofosfocolina (PC-O) 32:1,
- 10 7.80 µM para 1-O-alkuil-2-acilglicerofosfocolina (PC-O) 34:1,
- 1.25 µg/100 µl de suero para el ácido 15-hidroxi-eicosatetraenoico (15-HpETE),
- 0.013 µg/100 µl de suero para Leucotrieno E4 (LTE4),
- 15 0.020 µg/100 µl de suero para Leucotrieno B4 (4LTB), y/o
- 0.070 µg/100 µl de suero para 8,9-epoxieicosatrienoico (8,9 EpETre)
- 20 16.07 µM para hidroxifingomielina (SM-OH) 22:1,
- 52,00 µM para lisofosfatidilcolinas (LPC) 18:0,
- 25.00 µM para esfingomielina (SM) 24:0,
- 25 5,07 µM para 1-O-alkuil-2-acilglicerofosfocolina (PC-O) 34:3,
- 14.30 µM para 1-O-alkuil-2-acilglicerofosfocolina (PC-O) 36:4,
- 30 1.41 µM para 1-O-alkuil-2-acilglicerofosfocolina (PC-O) 40:1,
- 10.00 µM para fosfatidilcolina (PC) 36:2,
- 0,34 µg/100 µl de suero para ácido hidroxiocadecadienoico (9-HODE),
- 35 0.043 µg/100 µl para el ácido 9-oxo-octadecadienoico (9-oxo-HODE), y/o
- 0,017 µg/100 µl de suero para ácido 11,12-epoxieicosatrienoico (11,12-DiHETre).
- 40 19. El método según cualquiera de los párrafos 1 a 18, que además comprende:
- 40 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
- 45 comparar el nivel de fenilacetilglutamina (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 donde los niveles elevados de PAG y/o PCS en la muestra en comparación con los valores de referencia predeterminados indican una mayor probabilidad de retraso y/o evitar los trastornos inflamatorios crónicos relacionados con el envejecimiento.
- 50 20. 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.
- 55 21. 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 SM-OH 22:1.
22. El biomarcador de acuerdo con el párrafo 20 o 21, en el que el biomarcador debe detectarse en suero.
- 60 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 la fenilacetilglutamina (PAG).
24. 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 el sulfato de p-cresol (PCS).
- 65 25. El biomarcador de acuerdo con el párrafo 23 o 24, en donde el biomarcador debe ser detectado 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 acortar la duración de la vida y/o (iv) interacciones intestinales entre la microflora y el hospedador, que son menos saludables, que comprende
- 5 obtener una muestra de suero de un sujeto
- determinar el nivel de PC-O 40:1 y/o SM-OH 22:1 en la muestra, y
- 10 comparar el PC-O 40:1 y/o SM-OH 22:1 del sujeto con un valor de referencia predeterminado,
- en el que el valor de referencia predeterminado se basa en un nivel promedio de PC-O 40:1 y/o SM-OH 22:1 en suero en una población control, y
- 15 en el que un aumento del nivel sérico de PC-O 40:1 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 probablemente evite el envejecimiento saludable, (iii) un mayor riesgo de una esperanza de vida acortada, y/o (iv) interacciones intestinales entre la microflora y el hospedador menos saludables.
- 20
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 vida más corta, y/o (iv) interacciones intestinales entre la microflora y el hospedador, que son menos saludables, que comprende
- 25 obtener una muestra de orina de un sujeto
- determinar el nivel de PAG y/o PCS en la muestra, y
- 30 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 de orina en una población de control, y
- 35 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 trastornos inflamatorios crónicos relacionados con el envejecimiento, (ii) un estilo de vida que puede evitar el envejecimiento saludable, (iii) un mayor riesgo de acortamiento de la duración de la vida, y/o (iv) interacciones intestinales entre la microflora y el hospedador menos saludables.
- 40
28. Un método para (i) retrasar, evitar y/o prevenir el desarrollo de trastornos inflamatorios crónicos relacionados con el envejecimiento, (ii) promover el envejecimiento saludable, (iii) promover la longevidad, (iv) reducir el riesgo de acortar la esperanza de vida; (v) promover interacciones entre la microflora y el hospedador en el intestino más sanas, y/o (vi) prevenir las interacciones intestinales entre la microflora y el hospedador, que son menos saludables, que comprende:
- 45
- (a) realizar un método de diagnóstico como se describe en el párrafo 26 o 27; y
- (b) modificar el estilo de vida del sujeto si el sujeto tiene (i) una mayor probabilidad de desarrollar trastornos inflamatorios crónicos relacionados con el envejecimiento, (ii) un estilo de vida que probablemente evite el envejecimiento saludable, (iii) un mayor riesgo para una vida útil acortada, y/o (iv) interacciones intestinales entre la microflora y el hospedador menos saludables.
- 50
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.
- 55
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.
- 60

Tabla 1:

Factor	Centenarios	Mayor	Joven
Demográfico			
Género, <i>masculino/femenino</i>	31/125	158/205	12/10
Edad, años	100.9 [±] 2 (99-111)	70.4 [±] 6 (55-88)	30.6 [±] 5 (25-40)
Clínico			
BMI ¹ , <i>kg/m²</i>	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 ² , <i>n</i>	8	36	n/a
Colesterol, <i>mg/dl</i>	188.2 [±] 38.1 (110-318)	201.0 [±] 38.8 (5-335)	162.3 [±] 28.4 (123-207)
Triglicéridos, <i>mg/dl</i>	119.6 [±] 65.4 (50-535)	125.5 [±] 63.1 (41-550)	71.1 [±] 32.1 (28-143)
HDL ³ , <i>mg/dl</i>	47.4 [±] 13.1 (20-99)	55.8 [±] 21.1 (20-212)	51.3 [±] 8.7 (38-66)
LDL ⁴ , <i>mg/dl</i>	116.2 [±] 36.1 (27-248)	120 [±] 41.7 (12-248)	96.8 [±] 30.1 (49-144)
MMSE ⁵	20.3 [±] 6.4 (1.3-30.8)	27.3 [±] 1.9 (1.3-31.0)	n/a
CRP ⁶ , <i>mg/L</i>	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, <i>n</i>	44	4	0
Ritmo cardíaco irregular, <i>n</i>	33	46	0
Angina de pecho, <i>n</i>	25	12	0
A-SAA ⁷ , <i>µg/ml</i>	540 [±] 706 (0.01-3859.4)	158.2 [±] 21.9.6 (0.01-1861.9)	n/a

Metabólica			
Orina- ¹ H-RMN	18/74	128/155	11/10
Género, <i>masculino/femenino</i> Edad, años	100.9 [±] 2 (99-111)	70.1 [±] 6 (55-88)	30.9 [±] 5 (24-40)
Suero MS dirigido	30/113	34/56	11/9
Género, <i>masculino/femenino</i> Edad, años	100.9 [±] 2 (99-111)	69.6 [±] 6 (56-86)	30.6 [±] 5 (24-40)
Lipidómica			
Suero MS dirigido	2/10	21/16	9/9
Género, <i>masculino/femenino</i> Edad, años	101 [±] 2 (99-104)	70 [±] 6 (59-78)	31.2 [±] 5 (25-40)

Tabla 2:

Resumen	R2X _(cum)	R2Y _(cum)	Q ² Y	AuROC	
Centenarios vs. Mayores	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. Mayores	0.05	0.21	0.09	0.92	0.81

Tabla 3:

Grupo de edad		Centenarios	Mayores	Jóvenes
		Media ± desviación estándar	Media ± desviación estándar	Media ± desviación estándar
Integral de pico (a.u.)	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

5

Tabla 4:

Metabolitos [µM/1]	Jóvenes	Mayores	Centenarios
	Media ± desviación estándar	Media ± desviación estándar	Media ± desviación estándar
PC-O 32:1	2.02 ± 0.36	2 ± 0.51	2.35 ± 0.63*
PC-O 34:1	7.34 ± 1.07	7.88 ± 1.71	9.54 ± 2.19***
PC-O 34:3	5.73 ± 1.4	5.07 ± 1.71	3.94 ± 1.54***
PC-O 36:2	9.54 ± 1.75	9.58 ± 2.39	9.29 ± 2.26*
PC-O 36:4	14.48 ± 2.83	14.35 ± 3.55	12.39 ± 2.56*
PC-O 40:1	1.23 ± 0.23	1.41 ± 0.41	1.02 ± 0.32***
LPC 18:0	52.18 ± 12.93	52 ± 13.5	40.4 ± 12.02**
SM 24:0	23.45 ± 4.37	25.64 ± 5.31	19.79 ± 4.92***
SM-OH 22:1	14.52 ± 2.94	16.07 ± 3.37	11.51 ± 3.04***

Tabla 5:

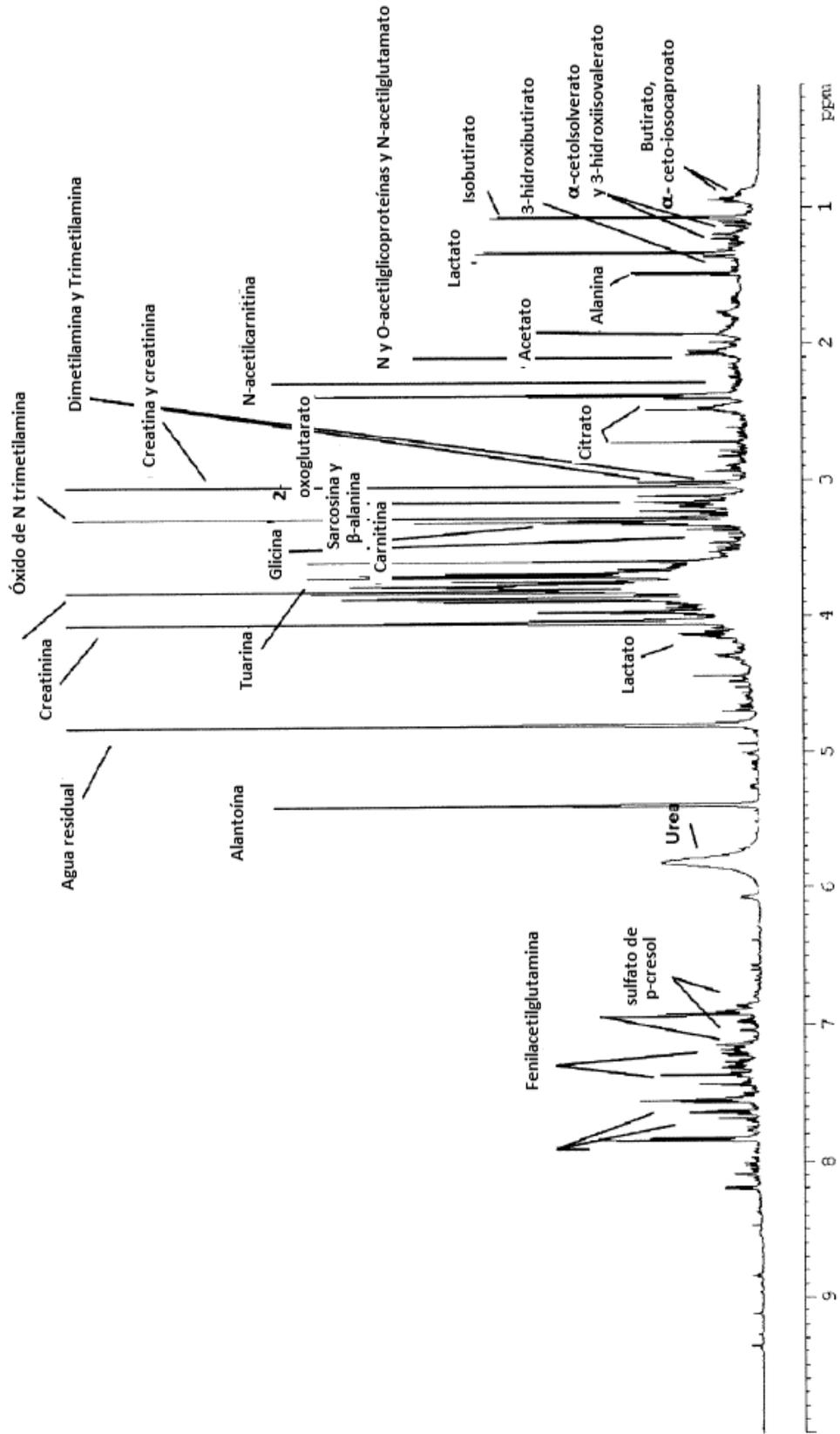
Metabolitos [(ng/100 µl suero)]	Jóvenes	Mayores	Centenarios
LTE4	0.015 ± 0.014	0.013 ± 0.011	0.035 ± 0.03***
LTB4	0.011 ± 0.014	0.019 ± 0.047	0.016 ± 0.009*
EPA	0.097 ± 0.036	0.123 ± 0.052	0.078 ± 0.026**
15-HpETE	1.512 ± 1.949	1.255 ± 1.245	3.348 ± 2.865***
11,12-DiHETrE	0.02 ± 0.006	0.017 ± 0.004	0.016 ± 0.006*
9-oxo-ODE	0.042 ± 0.028	0.043 ± 0.039	0.022 ± 0.013***
9-HODE	0.348 ± 0.223	0.397 ± 0.677	0.204 ± 0.211**
8,9-EpETrE	0.067 ± 0.101	0.074 ± 0.186	0.113 ± 0.107***

REIVINDICACIONES

1. Un método de diagnóstico de un estilo de vida que permite un envejecimiento saludable, que comprende
- 5 - determinar el nivel de ácido 9-oxo-octadecadienoico (9-Oxo-HODE), en una muestra de suero obtenida de un sujeto, y
- comparar el nivel 9-Oxo-HODE del sujeto con un valor de referencia predeterminado,
- 10 en el que el valor de referencia predeterminado se basa en un nivel sérico medio de 9-Oxo-HODE en una población de control, y
- en el que un nivel inferior de 9-Oxo-HODE en suero en la muestra en comparación con el valor de referencia predeterminado indica una mayor probabilidad de permitir un envejecimiento saludable.
- 15 2. El método de la reivindicación 1, que comprende, además
- determinar el nivel de al menos uno de SM-OH 22:1, SM 24:0, PC-O 40:1, 9-HODE, LPC 18:0, PC-O 34:1, o LTE4 en la muestra, y
- 20 - comparar el nivel del sujeto de al menos uno de SM-OH 22:1, SM 24:0, PC-O 40:1, 9-HODE, LPC 18:0, PC-O 34:1 o LTE4 a un valor predeterminado de referencia,
- en donde el valor de referencia predeterminado se basa en el promedio de SM-OH 22:1, SM 24:0, PC-O 40:1, 9-HODE, LPC 18:0, PC-O 34:1 en suero, o nivel de LTE4 en una población de control, y en la que un nivel de LPC en suero inferior a 18:0 en la muestra y/o un nivel en suero inferior de SM-OH 22:1, SM 24:0, PC-O 40:1, 9-HODE o LPC 18:0 en la muestra en comparación con los valores de referencia predeterminados indican una mayor probabilidad de permitir un envejecimiento saludable
- 25 en el que niveles elevados de PC-O 34:1 y/o LTE4 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 el suero, en comparación con un valor de referencia previamente obtenido.
- 35 4. El método de una de las reivindicaciones precedentes para diagnosticar la longevidad.
- 40 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 los niveles séricos obtenidos del sujeto antes de un cambio en el estilo de vida.
- 45 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.
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 previamente no se consumía o consumía en cantidades diferentes.
- 50 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 9-oxo-HODE y opcionalmente los otros biomarcadores se determinan por ¹H-RMN y/o espectrometría de masas en la muestra y en la referencia.
- 55 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,
- 60 7.80 µM para 1-O-alkil-2-acilglicerofosfolina (PC-O) 34:1,
- 1.25 ng/100 µl de suero para el ácido 15-hidroxi-eicosatetraenoico (15-HpETE),
- 0.013 ng/100 µl de suero para Leucotrieno E4 (LTE4),
- 65 0.020 ng/100 µl de suero para Leucotrieno B4 (4LTB), y/o

- 0.070 ng/100 µl de suero para 8,9-epoxieicosatrienoico (8,9 EpETre)
- 16.07 µM para hidroxifingomielina (SM-OH) 22:1,
- 5 52,00 µM para lisofosfatidilcolinas (LPC) 18:0,
- 25.00 µM para esfingomielina (SM) 24:0,
- 10 5,07 µM para 1-O-alkil-2-acilglicerofosfocolina (PC-O) 34:3,
- 14.30 µM para 1-O-alkil-2-acilglicerofosfocolina (PC-O) 36:4,
- 1.41 µM para 1-O-alkil-2-acilglicerofosfocolina (PC-O) 40:1,
- 15 10.00 µM para fosfatidilcolina (PC) 36:2,
- 0.34 ng/100 µl de suero para ácido hidroxiocadecadienoico (9-HODE),
- 0,043 ng/100 µl de suero para el ácido 9-oxo-octadecadienoico (9-oxo-HODE), y/o
- 20 0.017 ng/100 µl de suero para el ácido 11,12-epoxieicosatrienoico (11,12-DiHETre).
11. El método de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 10, que comprende, además:
- 25 - 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
- 30 - comparar el nivel de fenilacetilglutamina (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 orina en una población de control, y donde niveles elevados de PAG y/o PCS en orina en la muestra en comparación con los valores de referencia predeterminados indican una mayor probabilidad de permitir un envejecimiento saludable.
- 35 12. Un método para diagnosticar un estilo de vida que pueda prevenir un envejecimiento saludable y/o un riesgo de una vida más corta, que comprende
- determinar el nivel de 9-Oxo-HODE, en una muestra de suero obtenida de un sujeto, y
- 40 - comparar el nivel 9-Oxo-HODE del sujeto con un valor de referencia predeterminado,
- en el que el valor de referencia predeterminado se basa en un nivel sérico medio de 9-Oxo-HODE en una población de control, y
- 45 en el que un nivel de 9-oxo-HODE en suero superior en la muestra en comparación con el valor de referencia predeterminado indican un estilo de vida que es probable que evite el envejecimiento saludable, y/o un mayor riesgo de una vida útil acortada.
- 50 13. Un método para promover el envejecimiento saludable, promover la longevidad y/o reducir el riesgo de una vida más corta que comprende:
- (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 puede evitar el envejecimiento
- 55 saludable y/o un mayor riesgo de una vida más corta
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.
- 60 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.

Figura 1



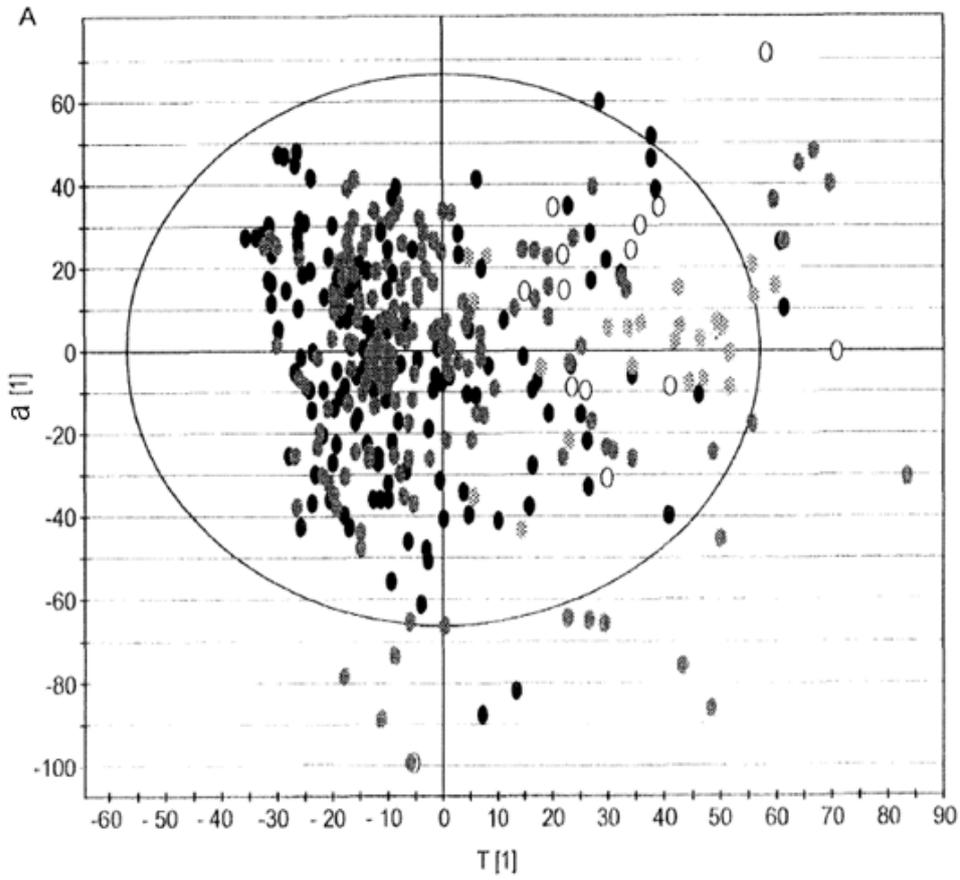


FIG. 2

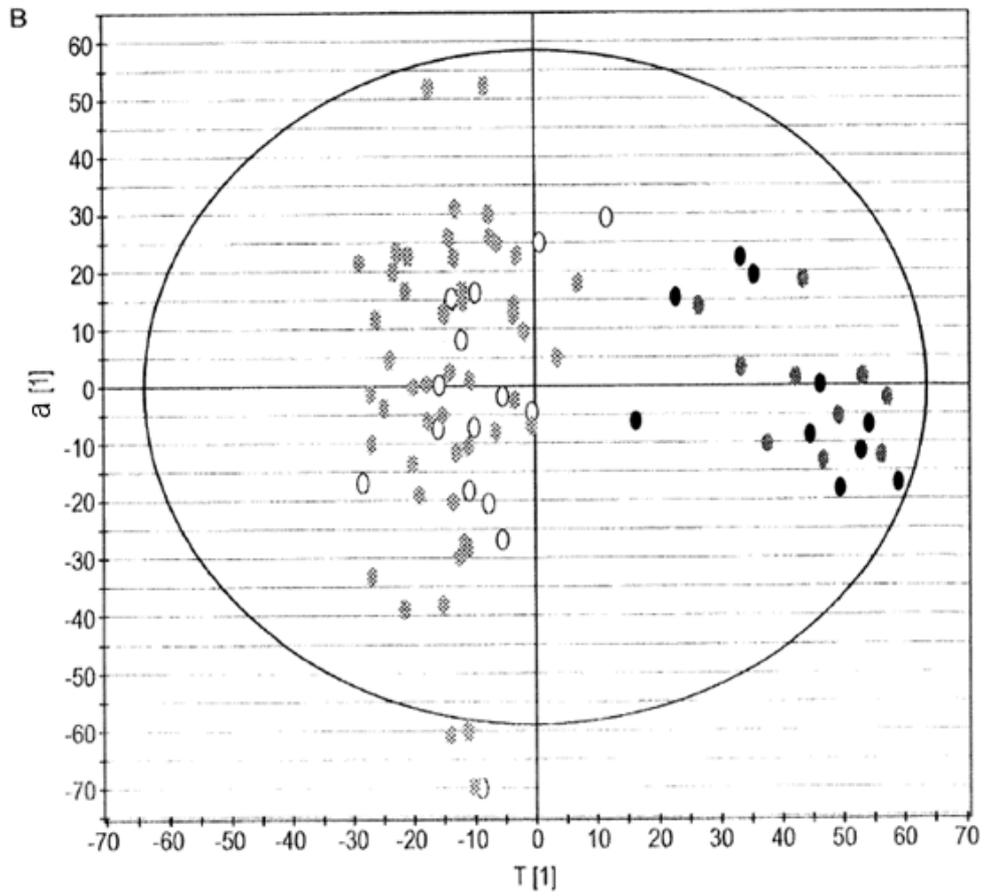


FIG. 2 Continuación

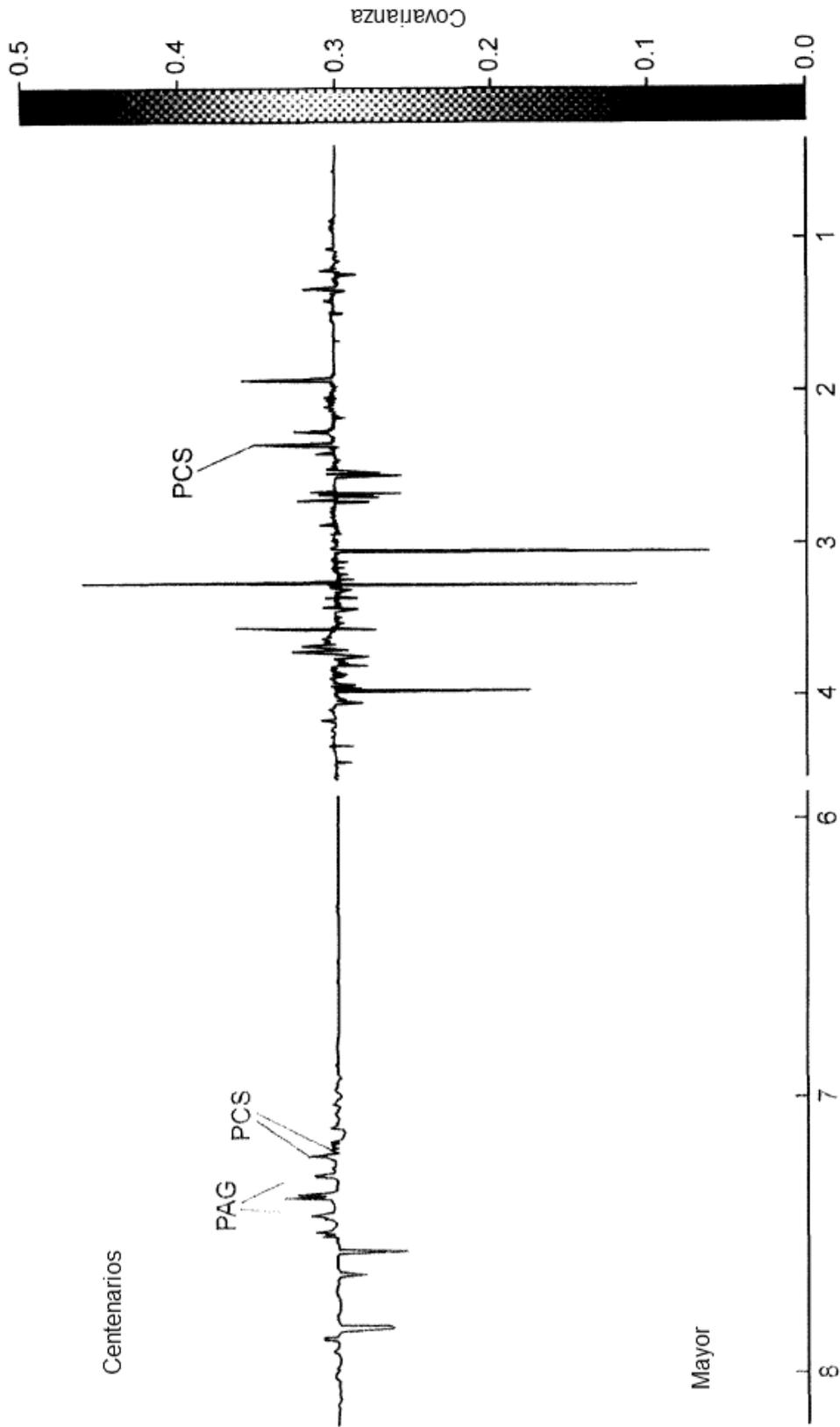


FIG. 3

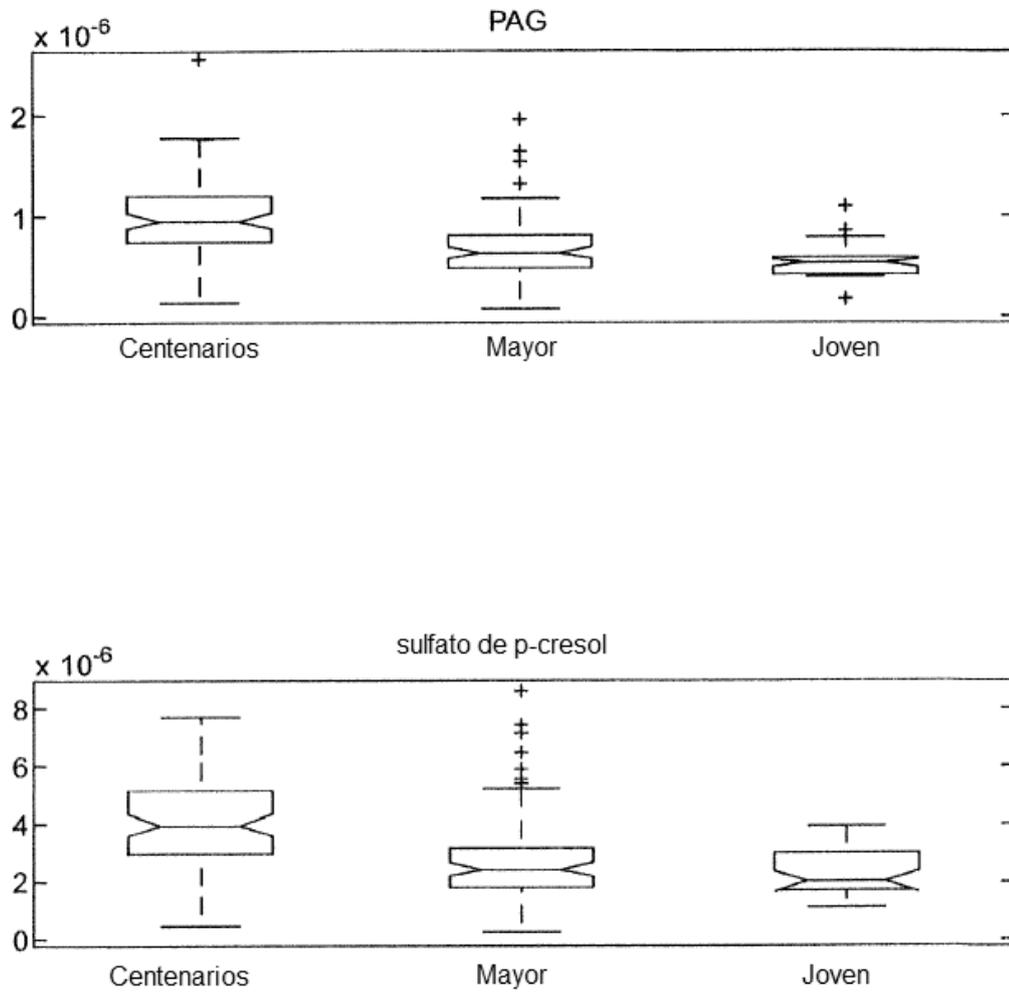


FIG. 4

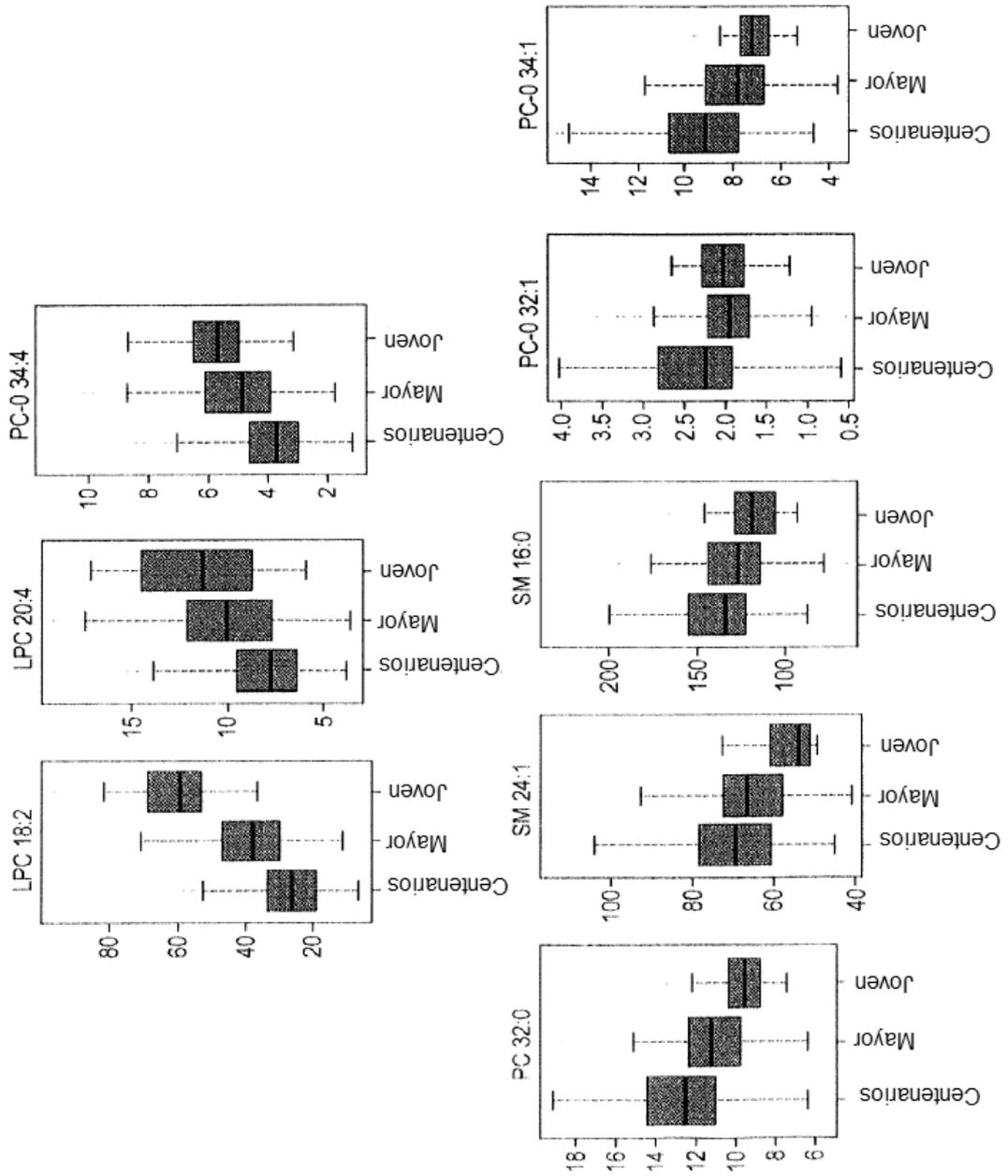
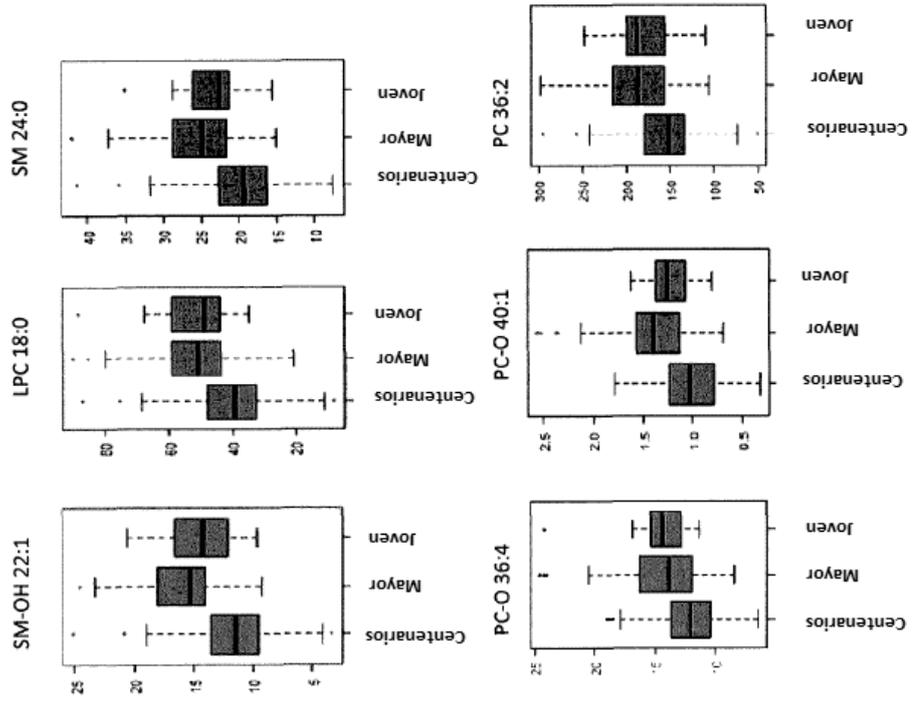


FIG. 5a

Figura 5b



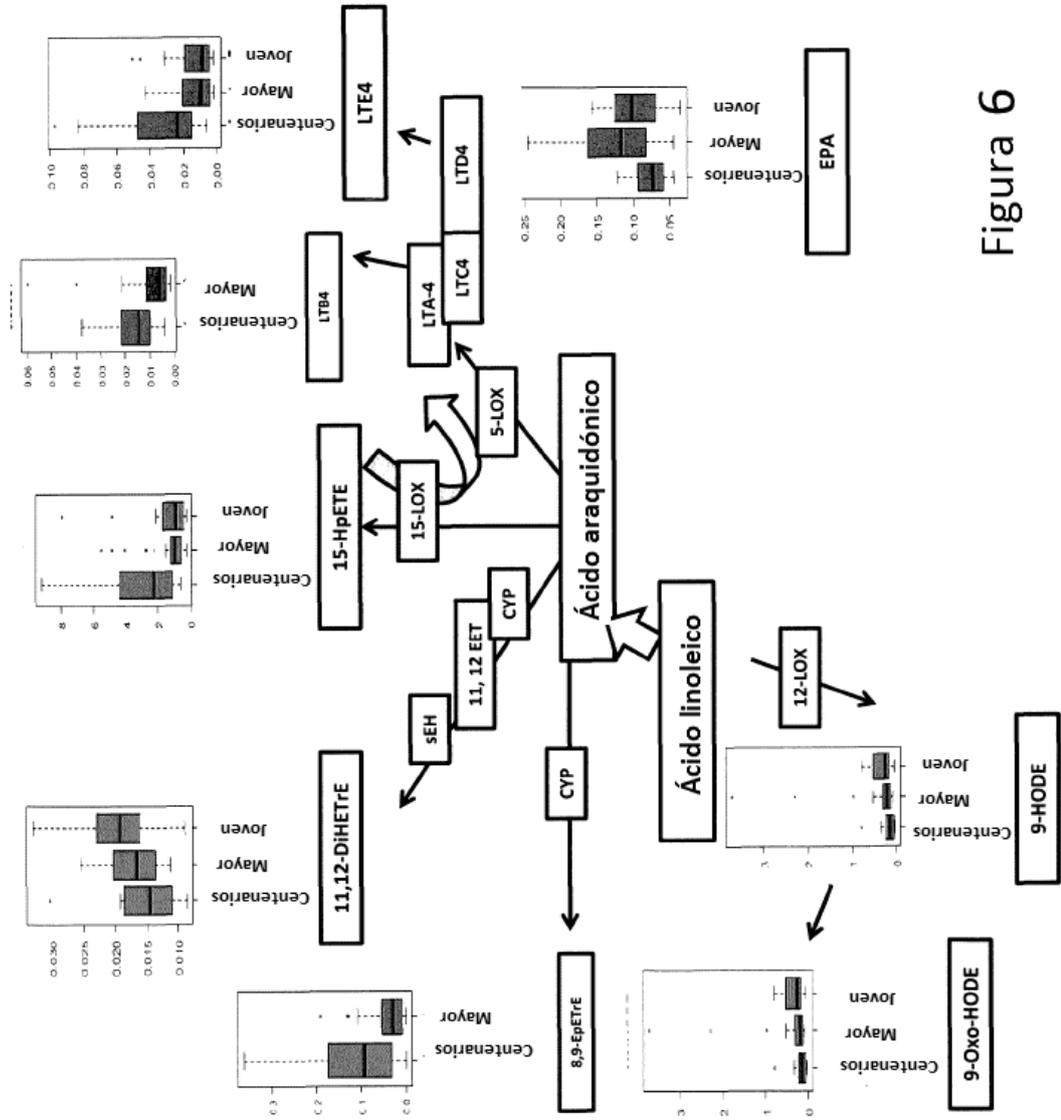


Figura 6