

(19)



**Евразийское
патентное
ведомство**

(21) **202193100** (13) **A1**

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОЙ ЗАЯВКЕ

(43) Дата публикации заявки
2023.02.28

(51) Int. Cl. **G01N 33/497 (2006.01)**
G01N 33/64 (2006.01)

(22) Дата подачи заявки
2021.08.16

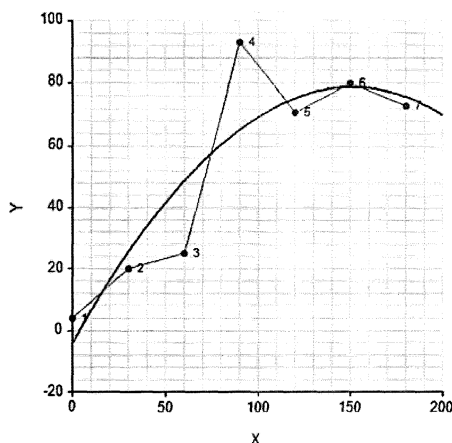
(54) СПОСОБ ОПРЕДЕЛЕНИЯ ИНТЕНСИВНОСТИ ИНДУКЦИИ КЕТОЗА

(96) **2021/ЕА/0052 (ВУ) 2021.08.16**

(74) Представитель:
Мараховский Ю.Х. (ВУ)

(71)(72) Заявитель и изобретатель:
**МАРАХОВСКИЙ ЮРИЙ
ХАРИТОНОВИЧ; ЖАРСКАЯ ОЛЬГА
МАРЬЯНОВНА (ВУ)**

(57) Изобретение относится к медицине, в целом к способам определения и изменения статуса метаболизма человека, и в частности к способу определения интенсивности индукции кетоза. Задача, решаемая изобретением, заключается в создании способа неинвазивной оценки особенностей кетогенного метаболизма путем определения интенсивности (скорости) индукции кетоза. Поставленную задачу решает способ определения интенсивности индукции кетоза, заключающийся в том, что предварительно определяют содержание кетонов в выдыхаемом воздухе и, при его значении менее 4 ppm, индуцируют кетоз путем перорального применения лизина в дозе не менее 0,025 и не более 0,035 г/кг массы тела, затем каждые 30 мин в течение трех часов определяют содержание кетонов в выдыхаемом воздухе и, используя полученные значения, строят диаграмму кривой, определяют максимальное значение содержания кетонов и время его достижения, рассчитывают скорость достижения максимального значения содержания кетонов и площадь под кривой (AUC), и при значении скорости, равном 1,0 ppm/мин и более, судят о быстрой интенсивности, менее 1,0, но более 0,4 ppm/мин - промежуточной интенсивности, 0,1 до 0,4 ppm/мин - средней интенсивности, менее 10 ppm/мин и значении AUC менее 1000 - медленной интенсивности индукции кетоза.



202193100 A1

202193100

A1

Способ определения интенсивности индукции кетоза

Изобретение относится к медицине, в целом - к способам определения и изменения статуса метаболизма человека, и, в частности, к способу определения интенсивности индукции кетоза.

Индукция физиологически приемлемого кетоза является широко используемым вариантом изменения метаболизма с переключением энергетического обмена с глюкогенного на кетогенный. Индукция кетоза обычно проводится кетогенными вариантами диет, смесями веществ и/или отдельными жирами, экзогенными кетонами.

Кетогенная диета (КД) - это диета с высоким содержанием жиров и низким содержанием углеводов, которая ограничивает поступление в организм глюкозы и приводит к индукции кетонов печенью и их усвоению в качестве альтернативного источника энергии мозгом и скелетными мышцами. По вариантам кетогенной диеты как индуктора кетоза имеются многочисленные публикации и патенты. Так, кетогенная диета считается ценным терапевтическим подходом для борьбы с эпилепсией и опухолями головного мозга.

В источниках информации [1] описаны кетогенные диеты и способы их приготовления, [2] – применение кетогенных соединений для лечения возрастного ухудшения памяти, [3] – способы получения физиологически приемлемого кетоза для лечения пациента, нуждающегося в терапии одной или нескольких из следующих патологий: боковой амиотрофический склероз, заболевания с избыточным свободнорадикальным окислением, сердечная недостаточность и мышечная дистрофия Дюшенна, [4] – способы лечения синдрома дефицита внимания и гиперактивности, а также связанных с ним симптомов патологии ЦНС с нарушением обучения, планирования и решения проблем, импульсивным дефицитом внимания и агрессией путем введения пациентам кетогенного материала в количествах, достаточных для возникновения кетоза, [5] – способы индукции кетоза для лечения пациентов, страдающих избыточным апоптозом тканей, путем введения терапевтически эффективного количества одного или нескольких экзогенных кетогенных соединений, в результате чего возникает кетоз, достаточный для остановки апоптоза.

Индукция кетоза кетогенными диетами наиболее эффективна в случаях готовности метаболизма переключиться на кетогенный вариант, поэтому важно уметь определять, есть ли у человека готовность к кетогенному

метаболизму, т.е. определять интенсивность индукции кетоза. Такой подход не используется в описаниях указанных выше патентов, и является их общим недостатком.

Кроме того, недостатком известных способов является развитие целой серии неблагоприятных реакций на этапе начальной индукции кетоза, таких как головная боль, неприятный запах изо рта, мышечные спазмы, диарея, общая слабость и кожная сыпь.

Экзогенные индукторы кетоза имеют существенный недостаток из-за сложности стандартизовать их дозировку, кроме того применение экзогенных индукторов вызывает развитие кетоза в крови (кетонемия) с возникновением блокирования самого кетогенеза в печени, что не позволяет определить интенсивность индукции кетоза.

Известны способы определения кетогенности метаболизма животного [6], которые являются неинвазивным вариантом определения кетоза и включают сбор образца мочи у животного в два разных периода времени, определение концентрации бета-гидроксibuтирата в двух образцах мочи и формирование заключения о кетогенном статусе животного и/или влиянии принятой внутрь композиции либо диеты на такой статус на основе разницы между концентрациями бета-гидроксibuтирата для двух образцов.

Недостатком способов является то, что результаты, полученные при использовании тест-полосок на кетоны в моче, равно как и других вариантов определения кетонов в моче, не взаимосвязаны с уровнем кетов крови. Кроме того, различия между содержанием кетоновых тел в моче и кетонов в крови существенны при целой серии состояний, таких как разная степень гидратации, изменения объема выделяемой мочи, кислотно-щелочного дисбаланс, нарушения почечной гемодинамики и экскреции. Существенный недостаток всех вариантов определения кетонов в моче заключается в том, что содержание кетонов в моче отражает содержание кетонов в крови за предыдущий временной промежуток, а не на момент сбора мочи.

Известно, что содержание кетонов в выдыхаемом воздухе коррелирует с содержанием кетонов крови [7]. Фактически содержание кетонов в крови можно определить по уравнению, полученному на основе измерений кетонов в выдыхаемом воздухе. В исследованиях с тщательным сопоставлением кетонов в выдыхаемом воздухе с другими биомаркерами было показано, что дыхательный тест на кетоны имеет высокую чувствительность и специфичность и является неинвазивным, удобным и воспроизводимым методом диагностики и терапевтического мониторинга диабетического кетоза [8].

Источник информации, близкий к заявляемому способу, не выявлен.

Задача, решаемая изобретением, заключается в создании способа неинвазивной оценки особенностей кетогенного метаболизма, путем определения интенсивности (скорости) индукции кетоза.

Поставленную задачу решает способ определения интенсивности индукции кетоза, заключающийся в том, что предварительно определяют содержание кетонов в выдыхаемом воздухе и, при его значении менее 4 ppm, индуцируют кетоз путем перорального применения лизина в дозе не менее 0,025 и не более 0,035 г/кг массы тела, затем каждые 30 мин в течение 3-х часов определяют содержание кетонов в выдыхаемом воздухе и, используя полученные значения, строят диаграмму кривой, определяют максимальное значение содержания кетонов и время его достижения, рассчитывают скорость достижения максимального значения содержания кетонов и площадь под кривой (AUC), и при значении скорости, равном 1,0 ppm/мин и более, судят о быстрой интенсивности, менее 1,0, но более 0,4 ppm/мин – промежуточной интенсивности, 0,1 до 0,4 ppm/мин – средней интенсивности, менее 10 ppm/мин и значении AUC менее 1000 – медленной интенсивности индукции кетоза.

Заявляемый способ является неинвазивным, в качестве индуктора кетоза используется аминокислота L-лизин (лизин), метаболизирующаяся преимущественно в печени. Лизин отличается от известных индукторов кетоза, не входит в состав кетогенных диет или смесей, не является липидом, или углеводом. Лизин — алифатическая, эссенциальная для человека аминокислота с выраженными свойствами основания.

Авторам способа впервые удалось доказать наличие у лизина кетогенного действия на метаболизм у человека.

Для решения поставленной задачи проведено клиническое исследование.

Пример 1.

В исследовании приняли участие 17 взрослых добровольцев: 16 женщин и 1 мужчина, средний возраст – 42,5 года (95% ДИ = 36,0 - 49,1), медианный – 43 года (32 - 57,5 перцентиль). Пять случаев были исключены из анализа, поскольку их исходные значения кетоза были выше 10 ppm, два случая – из-за отсутствия кетоза после нагрузки лизином с AUC менее 1000. Результаты индукции кетоза, вызванного приемом лизина, представлены в таблице 1.

Таблица 1

	AUC	Базовое значение ppm	Максимальное значение ppm	Время достижения максимального значения, минуты
Mean	3780	3,3	37,1	114

Standard Error	873,1	0,7	7,5	14,7
Lower 95% CL Mean	1804,8	1,8	20,1	80,7
Upper 95% CL Mean	5755,2	4,8	54,1	147,2
Median	2632,5	3,5	35,5	120
25th Percentile	1650	1	17,5	82,5
75th Percentile	5542,5	5,2	46,75	150

Примечание: 95%ДИ – доверительный интервал с 95% достоверностью

Значение медианы составило:

– для базового уровня кетонов - 3,5 ppm, с наименьшей величиной, т.е. 25 - процентиля (P25), - 1,0 ppm и наибольшей величиной, т.е. 75 процентиля (P75), - 5,2 ppm;

– для максимального значения кетонов в выдыхаемом воздухе (после индукции лизином) - 35,5 ppm, с P25-75 = 17,5 - 46,75, и 10-ой процентилю - 11,5 ppm;

– для времени достижения максимального значения содержания кетонов – 120 мин с P25-75 = 82,5 - 150,0 мин;

– для значений AUC - 2632,5 с P25-75 = 1650 - 5542,5, при этом полученная P10-я = 1200, что и является обоснованием отсекающего наименьшего значения 1000.

Для определения интенсивности индукции кетоза, в соответствии с заявляемым способом, рассчитывали скорость достижения максимального значения содержания кетонов площадь подкривой (AUC) максимальное содержание кетонов в выдыхаемом воздухе, определяемое каждые 30 минут (ppm/мин). Получены следующие результаты: у 30% – 1,0 ppm/мин и более (быстрая интенсивность), в остальных случаях от 0,1 до 0,4 ppm/мин (средняя интенсивность). У двух субъектов с отсутствием кетоза после нагрузки лизином – AUC менее 1000 и максимальное количество кетонов менее 10 ppm/мин (медленная интенсивность).

Следует отметить, что в случаях с предполагаемым начальным кетозом (более 10 ppm/мин, 5 случаев) прием лизина вызвал дополнительный кетоз в 4 случаях: максимальное время составило 3 часа, с 48, 38, 72 и 153 ppm/мин, т.е в трех случаях выявлена средняя интенсивность, в одном случае – промежуточная интенсивность – 0,85 ppm/мин.

Пример 2.

Индивидуальные варианты индукции кетоза лизином.

Быстрая интенсивность индукции кетоза (для субъекта С6 в таблице 2 приведен вариант кетоза лизином, в таблице 3 – секция детализации данных).

Таблица 2

Показатель	AUC	Максимальное значение содержания ацетона в выдыхаемом воздухе, ppm	Время в минутах достижения максимального значения	Исходное время	Длительность в минутах проведения теста	Число переменных (точек измерения)
Ацетон в воздухе	9825	93	90	0	180	7

Таблица 3

Номер субъекта	Время в мин	ppm
C6	0	3
C6	30	20
C6	60	25
C6	90	93
C6	120	71
C6	150	80
C6	180	70
Скорость индукции – 1,03 ppm/мин		

На фиг. 1 изображена диаграмма кривой содержания кетонов в выдыхаемом воздухе у субъекта С6 до и после приема лизина (Y – содержание кетонов в выдыхаемом воздухе, X – время в минутах).

Примечание: сплошная жирная линия – аппроксимация опытных данных.

Промежуточная интенсивность кетоза (для субъекта С7 в таблице 4 приведен вариант кетоза лизином, в таблице 5 – секция детализации данных).

Таблица 4

Показатель	AUC	Максимальное значение содержания ацетона в выдыхаемом воздухе, ppm	Время в минутах достижения максимального значения	Исходное время	Длительность в минутах проведения теста	Число переменных (точек измерения)
Ацетон в воздухе	5445	41	90	0	150	7

Таблица 5

Номер субъекта	Время в мин	ppm
C7	0	1
C7	30	25
C7	60	36
C7	90	24
C7	120	38
C7	150	41
C7	180	34
Скорость индукции – 0,27 ppm/мин		

На фиг. 2 изображена диаграмма кривой содержания кетонов в выдыхаемом воздухе у субъекта С7 до и после приема лизина (Y - содержание кетонов в выдыхаемом воздухе, X - время в минутах)

Примечание: сплошная жирная линия - аппроксимация опытных данных.

Пример 3.

Унификация определения интенсивности кетоза, индуцированного лизином.

На основании полученных данных разработана унифицированная шкала оценки интенсивности кетоза у 16 добровольцев. Использовали отсекающее значение по времени 60 мин, учет значений кетонов в выдыхаемом воздухе проводился после этого времени. Шкала оценки интенсивности кетоза представлена в таблице 6.

Таблица 6

Категория по значениям кетоза на основе медианного статистического анализа	Степень кетоза	Баллы
10-я перцентиль и менее	минимальная	1
Менее 25-ой перцентилии более 10 –ой	слабая	2
Более 25 – ой перцентили, но менее 75-ой	допустимая средняя	3
Более 75-ой прцентили, но менее 90-ой	выраженная	4
90-я перцентиль и более	экстремальная	5

Примечание: значение медианы в таблице 1, значения в ppm перцентилей: 10-я -11,5, 25-я -17,5, 75-я - 46,8, 90-я - 88,6.

Проведена индивидуальная оценка интенсивности кетоза по разработанной шкале, результаты оценены анализом частотной таблицы, и представлены в таблице 7.

Таблица 7

Баллы категории	Частота (число)	Кумуляция (число)	Доля в % от всех участников	Доля в % кумуляции
1	3	3	18,8	18,8
2	1	4	6,3	25,0
3	6	10	37,5	62,5
4	4	14	25,0	87,5
5	2	16	12,5	100,0

Как следует из результатов, представленных в таблице 7, чаще всего (37,5+25,0=62,5) интенсивность кетоза была допустимой (3) и выраженной (4). Однако в 18,8% случаев отмечена минимальная, и в 12,5% – экстремальная интенсивность кетоза, индуцированного лизином.

Дополнительно у 9 добровольцев, кроме индукции кетоза лизином, проведен анализ кетоза после употребления традиционной для субъекта пищи. В каждой группе проведена оценка интенсивности кетоза по представленной выше шкале и проведен анализ корреляции между лизин-индуцированным кетозом и пищевым кетозом. Результаты оценки

корреляции непараметрическим анализом (Спирман/Spearman R) представлены в таблице 8.

Таблица 8

Valid N	Spearman R	T (N-2)	p-value
9	0,74	2,92	0,022

Результаты оценки корреляции параметрическим анализом представлены в таблице 9.

Таблица 9

r(X,Y)	R ²	t	p	N	Constant	Slope	Constant
0,80	0,64	3,53	0,01	9	0,80	0,80	0,60

Формула расчета прогностической степени пищевого кетоза, по оценке интенсивности лизин индуцированного кетоза:

$$\text{БПК} = 0,8 + 0,8 \times \text{БЛК},$$

где: БПК – балл пищевого кетоза, БЛК – балл лизинового кетоза.

Например: балл пищевого кетоза = $0,8 + 0,8 \times 5 = 4,8$ (т.е. близок к экстремальному).

Полученные результаты доказывают возможность индукции кетоза за счет приема лизина, при этом интенсивность тяжести кетоза может достигать значений, аналогичных кетогенной диете (более 40 ppm) и введения экзогенных кетонов. Даже при наличии базального кетоза (более 10 ppm) лизин вызывает дополнительный кетоз с присутствием его чрезвычайно высокого уровня (153 ppm).

Таким образом, заявляемый способ оценки особенностей кетогенного метаболизма, путем определения интенсивности (скорости) индукции кетоза, является неинвазивным тестом для определения и изменения статуса метаболизма человека.

Литература

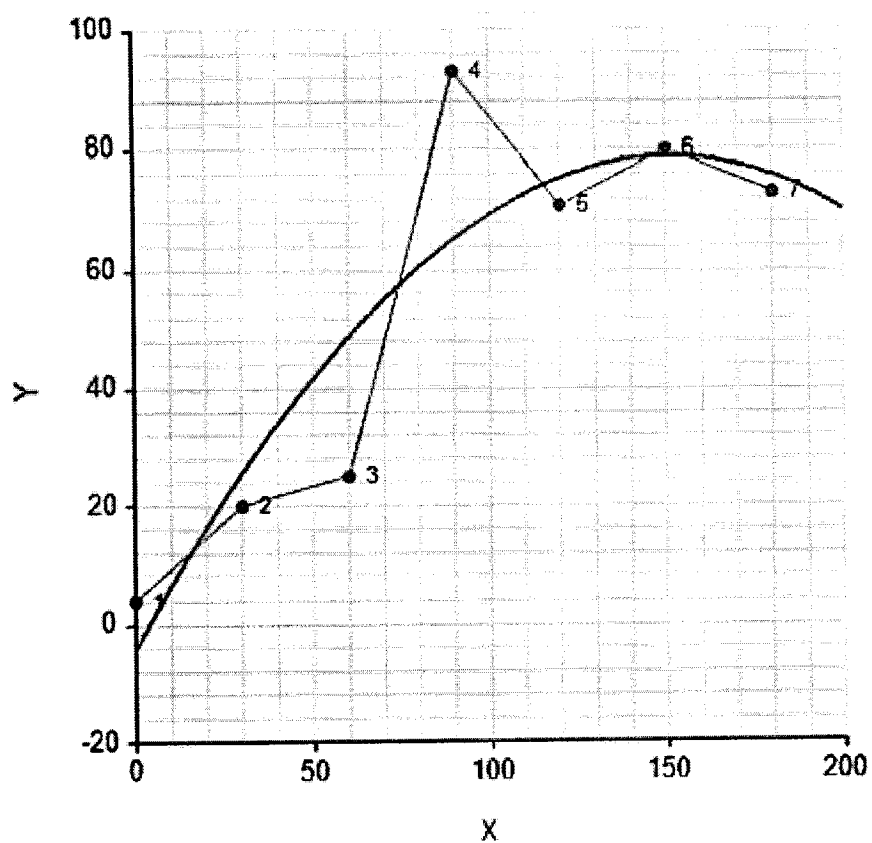
1. Патент US20100310740A1, [COMPOSITION FOR KETOGENIC DIET AND PREPARATION METHOD THEREOF Pub. No.: US 2010/031074.0 A. Kim et al. COOKALEX LTD. Pub. Date: Dec. 9, 2010].
2. Патент US8124589, [USE OF KETOGENIC COMPOUNDS FOR TREATMENT OF AGE-ASSOCIATED MEMORY IMPAIRMENT. Patent No.: US 8,124,589 B2, Samuel T. Henderson, Broomfield, CO, Date of Patent: Feb. 28, 2012].
3. Патент US7351736, [THERAPEUTIC COMPOSITIONS (II). Patent No.: US 7,351,736. Richard Lewis Veech, Rockville Date of Patent: Apr. 1, 2008].

4. Патент US 20120252902A, [TREATMENT OF ADHD. Pub. No.: US 2012/0252902 A1, Martin et al. BTG International Limited. Pub. Date: Oct. 4, 2012].
5. Патент US20080249173A1, [METHODS FOR DETERMINING ANIMALS METABOLISM IS KETOGENIC. Pub. No.: US 2014/0134747 A1. Pan et al. NESTEC SA. Pub. Date: May 15, 2014].
6. Nestec S.A. [et al.] Methods for determining if an animal's metabolism is ketogenic // Electronic source. – Mode of access: https://patentscope.wipo.int/search/ru/detail.jsf?docId=WO2014074972&_cid=P10-KQ72SZ-78826-1. – Date of access: 21.06.2021.
7. Breath acetone predicts plasma ketone bodies in children with epilepsy on a ketogenic diet/K. Musa-Veloso [et al.]/ Nutrition. – 2006. – Vol. 22. – P. 1–8.
8. Breath Ketone Testing: A New Biomarker for Diagnosis and Therapeutic Monitoring of Diabetic Ketosis/ Y. Qiao [et al.]/ Hindawi Publishing Corporation BioMed Research International. – 2014. - Vol. 2014. - Article ID 8691-86.

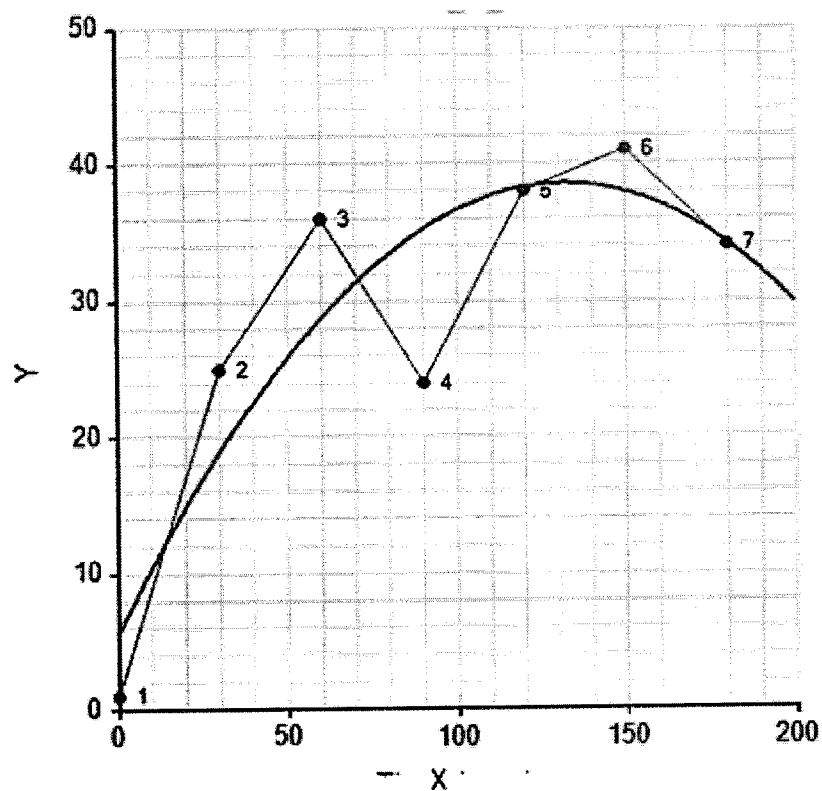
Формула изобретения

Способ определения индивидуальной интенсивности индукции кетоза, заключающийся в том, что предварительно определяют содержание кетонов в выдыхаемом воздухе и, при его значении менее 4 ppm, индуцируют кетоз путем перорального применения лизина в дозе не менее 0,025 и не более 0,035 г/кг массы тела, затем каждые 30 мин в течение 3-х часов определяют содержание кетонов в выдыхаемом воздухе и, используя полученные значения, строят диаграмму кривой, определяют максимальное значение содержания кетонов и время его достижения, рассчитывают скорость достижения максимального значения содержания кетонов и площадь под кривой (AUC), и при значении скорости, равном 1,0 ppm/мин и более, судят о быстрой интенсивности, менее 1,0, но более 0,4 ppm/мин – промежуточной интенсивности, 0,1 до 0,4 ppm/мин – средней интенсивности, менее 10 ppm/мин и значении AUC менее 1000 – медленной интенсивности индукции кетоза.

Способ определения интенсивности индукции кетоза



Фиг. 1



Фиг. 2

ОТЧЕТ О ПАТЕНТНОМ ПОИСКЕ
(статья 15(3) ЕАПК и правило 42 Патентной инструкции к ЕАПК)

Номер евразийской заявки:

202193100

А. КЛАССИФИКАЦИЯ ПРЕДМЕТА ИЗОБРЕТЕНИЯ:

G01N 33/497 (2006.01)

G01N 33/64 (2006.01)

Согласно Международной патентной классификации (МПК)

Б. ОБЛАСТЬ ПОИСКА:

Просмотренная документация (система классификации и индексы МПК)

G01N 33/52, 33/64, 2033/4975

Электронная база данных, использовавшаяся при поиске (название базы и, если, возможно, используемые поисковые термины)
Espacenet, ЕАПАТИС, ЕРОQUE Net, Reaxys, Google

В. ДОКУМЕНТЫ, СЧИТАЮЩИЕСЯ РЕЛЕВАНТНЫМИ

Категория*	Ссылки на документы с указанием, где это возможно, релевантных частей	Относится к пункту №
A	RU 2614718 C2 (ФЕДЕРАЛЬНОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ БЮДЖЕТНОЕ ОБРАЗОВАТЕЛЬНОЕ УЧРЕЖДЕНИЕ ВЫСШЕГО ПРОФЕССИОНАЛЬНОГО ОБРАЗОВАНИЯ "КУБАНСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ АГРАРНЫЙ УНИВЕРСИТЕТ") 19.01.2017, формула	1
A	RU 2032909 C1 (НАУЧНО-ВНЕДРЕНЧЕСКОЕ ПРЕДПРИЯТИЕ "АПТ-ЭКОЛОГИЯ") 10.04.1995, формула	1
A	JP 2003079601 A (TANITA CORP et al.) 18.03.2002, формула	1
A	WO 2014074972 A1 (NESTEC SA et al.) 15.05.2014, формула	1

☐ последующие документы указаны в продолжении

* Особые категории ссылочных документов:

«А» - документ, определяющий общий уровень техники

«D» - документ, приведенный в евразийской заявке

«Е» - более ранний документ, но опубликованный на дату подачи евразийской заявки или после нее

«О» - документ, относящийся к устному раскрытию, экспонированию и т.д.

"Р" - документ, опубликованный до даты подачи евразийской заявки, но после даты испрашиваемого приоритета"

«Т» - более поздний документ, опубликованный после даты приоритета и приведенный для понимания изобретения

«Х» - документ, имеющий наиболее близкое отношение к предмету поиска, порочащий новизну или изобретательский уровень, взятый в отдельности

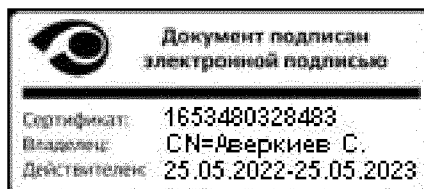
«У» - документ, имеющий наиболее близкое отношение к предмету поиска, порочащий изобретательский уровень в сочетании с другими документами той же категории

«&» - документ, являющийся патентом-аналогом

«L» - документ, приведенный в других целях

Дата проведения патентного поиска: 06 декабря 2022 (06.12.2022)

Уполномоченное лицо:
Начальник Управления экспертизы



С.Е. Аверкиев