

(19) RÉPUBLIQUE FRANÇAISE  
INSTITUT NATIONAL  
DE LA PROPRIÉTÉ INDUSTRIELLE  
PARIS

(11) N° de publication :  
(à n'utiliser que pour les  
commandes de reproduction)

2 656 311

(21) N° d'enregistrement national : 90 16069

(51) Int Cl<sup>5</sup> : C 07 K 15/00, 15/10; C 08 G 69/10; A 23 L 1/305

(12)

## DEMANDE DE BREVET D'INVENTION

A1

(22) Date de dépôt : 21.12.90.

(30) Priorité : 25.12.89 JP 33288489; 27.03.90 JP 7560090; 25.07.90 JP 19478290.

(43) Date de la mise à disposition du public de la demande : 28.06.91 Bulletin 91/26.

(56) Liste des documents cités dans le rapport de recherche : *Le rapport de recherche n'a pas été établi à la date de publication de la demande.*

(60) Références à d'autres documents nationaux apparentés :

(71) Demandeur(s) : Société dite: NISSHIN FLOUR MILLING CO., LTD. — JP.

(72) Inventeur(s) : Miyazaki Toshiyuki, Motoi Hirofumi, Kodama Toshiaki, Maeda Taturo, Tsujita Takahiro et Okuda Hiromichi.

(73) Titulaire(s) :

(74) Mandataire : Bureau Casalonga D.A. - Josse.

(54) Inhibiteurs d'enzymes lipolytiques.

(57) Inhibiteur d'enzyme comprenant comme ingrédient actif au moins une protéine de base, un polypeptide de base ou leurs sels.

L'inhibiteur est utile comme agent diététique pour la prévention de l'obésité et de la lipémie ainsi que comme additif alimentaire.

FR 2 656 311 - A1



INHIBITEURS D'ENZYMES LIPOLYTIQUES

L'invention a pour objet des inhibiteurs d'enzymes qui participent à la lipolyse. Plus particulièrement, l'invention a pour objet des inhibiteurs d'enzymes lipolytiques qui comprennent des protéines de base et/ou des polypeptides de base.

De nombreuses publications ont mentionné que des protéines telles que la sérum albumine, la  $\beta$ -lactoglobuline et certaines protéines du soja inhibent certains types de lipases (voir par exemple Journal of Lipid Research, vol. 10 25, 1984, pages 1214-1221). Cependant, en présence d'acides de la bile, ces protéines perdent leur activité d'inhibition de la lipase et n'exercent pas *in vivo* leur rôle d'inhibiteur de lipase.

Les essais en continue réalisés sur les inhibiteurs de lipase protéinique ont montré que les protéines de base,

les peptides de base et leurs sels inhibent ou suppriment l'activité des enzymes lipolytiques en présence d'acides de la bile.

Ainsi, l'invention fournit un inhibiteur d'enzyme lipolytique qui comprend comme ingrédient actif au moins une protéine de base, une peptide de base ou leurs sels.

L'expression "inhibiteur d'enzyme lipolytique" utilisée ci-après se réfère à un agent ayant comme fonction d'inhiber ou de supprimer l'activité des enzymes lipolytiques telles que les lipases, inhibant ou supprimant ainsi l'hydrolyse des lipides, ce qui a pour résultat d'inhiber ou de supprimer l'absorption des lipides par l'intestin.

Les inhibiteurs d'enzymes lipolytiques selon la présente invention sont efficaces dans les conditions où les lipides sont émulsifiés en présence d'acides de la bile et ainsi ils sont efficaces *in vivo*.

Les protéines de base, les polypeptides de base et leurs sels qui peuvent être utilisés selon l'invention englobent les purothionines contenues dans le blé ; les produits analogues aux purothionines, contenus dans d'autres céréales que le blé (y compris dans l'orge et le seigle) tels que les polypeptides analogues à la purothionine largement distribuées dans l'orge comme décrit dans le brevet Japonais publié sous le N° 57840/1986 et les polypeptides analogues à la purothionine que l'on trouve dans le seigle comme indiqué par J. Agric. Food Chem. Vol.

26, N° 4, pages 794-796 (1978) ; la protamine ; l'histone ; la polylysine ; la polyarginine et leurs sels.

Trois types de purothionines, les purothionine  $\alpha_1$ -,  $\alpha_2$ - et  $\beta$ - présentent quelques différences dans la séquence 5 des amino-acides chacune contenant les séquences ci-après d'amino-acides. On peut utiliser n'importe laquelle des purothionines selon la présente invention.

1 5 10 15 20 25

Purothionine  $\alpha_1$  H,N-Lys-Ser-Cys-Cys-Arg-Ser-Thr-Leu-Gly-Lys-Asn-Cys-Tyr-Asn-Leu-Cys-Arg-Ala-Arg-Gly-Ala-Gln-Lys-Leu-Cys-

Purothionine  $\alpha_2$  H,N-Lys-Ser-Cys-Cys-Arg-Thr-Thr-Leu-Gly-Lys-Asn-Cys-Tyr-Asn-Leu-Cys-Arg-Ser-Arg-Gly-Ala-Gln-Lys-Leu-Cys-

Purothionine  $\beta$  H,N-Lys-Ser-Cys-Cys-Lys-Ser-Thr-Leu-Gly-Lys-Asn-Cys-Tyr-Asn-Leu-Cys-Arg-Ala-Arg-Gly-Ala-Gln-Lys-Leu-Cys-

30 35 40 45

-Ala-Gly-Val-Cys-Arg-Cys-Lys-Ile-Ser-Ser-Gly-Leu-Ser-Cys-Pro-Lys-Gly-Phe-Pro-Lys-COOH

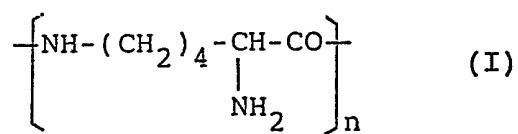
-Ser-Thr-Val-Cys-Arg-Cys-Lys-Leu-Thr-Ser-Gly-Leu-Ser-Cys-Pro-Lys-Gly-Phe-Pro-Lys-COOH

-Ala-Asn-Val-Cys-Arg-Cys-Lys-Leu-Thr-Ser-Gly-Leu-Ser-Cys-Pro-Lys-Asp-Phe-Pro-Lys-COOH

On connaît trois types de protamines englobant les mono-, di- et tri-protamines et cinq types d'histones incluant H1, H2A, H2B, H3, H4 et H5. Tous ces types peuvent être utilisés dans la présente invention.

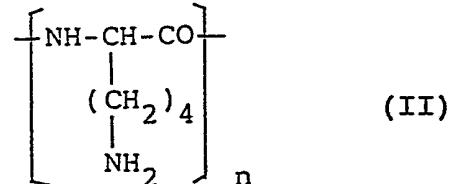
5 La polylysine se distingue par l'emplacement de la liaison peptide et elle est constituée par la  $\epsilon$ -polylysine représentés par la formule (I)

10



où n représente le degré de polymérisation de la lysine et par l' $\alpha$ -polylysine représentées par la formule (II)

15



où n a la signification ci-dessus indiquée. Toutes les 20 polylysines et leurs sels peuvent être utilisés selon l'invention. On préfère l' $\epsilon$ -polylysine et ses sels car ils peuvent maintenir *in vivo* la fonction supprimant ou inhibant les enzymes lypolytiques sur une longue période de temps, permettant ainsi une absorption plus réduite de 25 lipides totaux comparativement à l' $\alpha$ -polylysine et à d'autres protéines de base, polypeptides de base et leurs sels.

Les polylysines de formules (I) et (II) où n désigne 4 ou plus, plus particulièrement 5 ou plus, sont plus efficaces par suite de leur activité plus élevée d'inhiber l'enzyme lipolytique. Les  $\epsilon$ -polylysines où n a une valeur inférieure à 9 ont une activité antimicrobienne faible. Ainsi, les  $\epsilon$ -polylysines où n a pour valeur 5 à 9 auront un effet sur l'inhibition de l'absorption de lipides sans dommage pour la flore intestinale.

Les protéines de base constituant les acides aminés et les peptides englobent deux types d'isomères optiques, les formes L et D. Les protéines de base et les peptides de base dérivés de produits naturelles sont connus comme étant habituellement constitués d'acides aminés L.

Les protéines et les polypeptides de base ainsi que leurs sels utilisés selon l'invention peuvent être constitués d'acides aminés soit L soit D.

Les inhibiteurs d'enzymes lipolytiques selon la présente invention peuvent contenir une protéine de base, une peptide de base et leurs sels seuls ou en combinaison.

Les inhibiteurs d'enzymes lipolytiques selon l'invention peuvent être administrés aux humains et à divers animaux y compris les animaux domestiques et la volaille, tels que les bovins, les chevaux, les poulets ainsi que les animaux de maison comme le chien et le chat. Les doses efficaces varient selon le type, l'âge et les conditions physiques etc. des sujets auxquels on administre. De préférence, on peut les administrer à toute

dose appropriée selon les sujets individuels.

Les inhibiteurs d'enzymes lipolytiques selon l'invention sont formulés en une préparation pour administration orale. On peut les administrer soit seuls, 5 soit en mélange avec un véhicule habituellement utilisé dans l'industrie pharmaceutique ou en combinaison avec d'autres médicaments. En outre, on peut les utiliser sous toutes formes de préparation telles que comprimés, granules, capsules, poudres et produits similaires.

10 En outre, les inhibiteurs d'enzymes lipolytiques selon l'invention peuvent également être administrés comme additifs alimentaires. Ainsi, les inhibiteurs selon l'invention sont utiles comme additifs d'aliments ou d'alimentation.

15 L'administration des inhibiteurs d'enzymes lipolytiques selon l'invention à des humains et à des animaux peut inhiber les enzymes lipolytiques pour supprimer ou inhiber l'hydrolyse des lipides de façon qu'on peut inhiber l'absorption intestinale rapide des lipides 20 ingérés et on peut contrôler l'absorption des graisses totales pour les maintenir à un niveau faible permettant ainsi d'obtenir des résultats tels que prévention de la lipémie et de l'obésité. Ainsi, les inhibiteurs selon l'invention sont utiles comme agents diététiques pour la 25 prévention de l'obésité et de la lipémie.

Parmi les inhibiteurs d'enzymes lipolytiques de l'invention, les  $\epsilon$ -polylysines maintiennent plus

particulièrement leur action inhibant l'absorption des lipides dans l'être vivant pendant une longue période de temps, ce qui a pour résultat une forte réduction de l'absorption des graisses totales in vitro.

5 L'invention sera mieux comprise à l'aide des exemples non limitatifs ci-après.

EXEMPLE 1

(Préparation de purothionine)

On obtient un mélange de purothionine brute contenant les 10 purothionines  $\alpha_1$ ,  $\alpha_2$  et  $\beta$ , à partir de la farine de blé tendre selon le procédé décrit dans Agr. Biol. Chem., Vol. 34, N° 7, pages 1089-1094 (1970). Le mélange brut résultant est purifié pour isoler la purothionine  $\alpha_2$  et le purothionine  $\beta$ , respectivement.

15 (Préparation d'émulsion d'huile d'olive).

250 mg d'huile d'olive, 21,5 mg de cholate de sodium en tant qu'un acide de la bile et 30 mg de phosphatidylcholine sont ajoutés à 5 ml d'une solution tampon au phosphate de potassium à 300 mM à pH 6,8 (appelé 20 ci-après tampon phosphate de potassium).

Le mélange est traité aux ultrasons pour préparer une émulsion d'huile d'olive.

(Préparation d'une solution contenant une protéine (polypeptide))

25 Un ml tampon au phosphate de potassium est ajouté à chaque 4 mg d'un mélange de purothionine brute, de purothionine  $\alpha_2$  purifiée, de purothionine  $\beta$  purifiée, de

sérum albumine bovin (appelé ci-après "BSA", A7030, Sigma Co., Ltd., U.S.A.), de  $\beta$ -lactoglobuline (L0130, Sigma Co., Ltd.) et d'albumine d'oeuf (A5503, Sigma Co. Ltd.) pour préparer six types de solutions contenant une protéine 5 (polypeptide).

(Préparation d'une solution de lipase)

La lipase pancréatique porcine (fabriquée par Sigma Co., Ltd.) est ajoutée à la solution tampon de phosphate de potassium pour préparer une solution de lipase contenant 10 par ml 100 unités de lipase pancréatique porcine.

(Essai de l'activité des protéines inhibant la lipase)

Le témoin et six échantillons à tester sont préparés de la façon suivante.

100  $\mu$ l d'une émulsion d'huile d'olive préparée 15 comme indiqué ci-dessus sont utilisés comme support.

50  $\mu$ l de tampon au phosphate de potassium sont ajoutés au support pour préparer un échantillon d'émulsion témoin. Chacune des 50  $\mu$ l de solutions contenant la protéine (polypeptide) préparées ci-dessus sont ajoutés à 20 100  $\mu$ l de support pour préparer six émulsions d'échantillon à tester. Toutes les émulsions sont incubées pendant 5 minutes. A chacune de ces émulsions on ajoute 50  $\mu$ l d'une solution de lipase préparée comme indiqué ci-dessus. Le mélange résultant est incubé à 37°C pendant 1 heure puis on 25 leur ajoute 3 ml d'un solvant d'extraction (chloroforme : méthanol : n-heptane = 49:1:49).

Après agitation pendant 5 minutes, on centrifuge le

mélange à 3000 t/min pendant 5 minutes. La couche supérieure est éliminée au moyen d'un aspirateur et on ajoute à la solution restante 1 ml d'un réactif au cuivre (0,45 M triethanolamine, 0,05 acide acétique N, 3,4% de sulfate de cuivre pentahydrate et 20% de chlorure de sodium).

On agite le mélange pendant 5 minutes et on centrifuge à 3000 t/min pendant 5 minutes. 0,5 ml de solution sont prélevés de la couche supérieure et on ajoute 10 à cette solution 0,5 ml d'un agent développant la couleur (une solution de 0,1% de bathocuproine et 0,05% de butyle hydroxyanisole dans le solvant d'extraction ci-dessus).

On mesure sur les solutions témoins et les solutions à tester l'absorbance à 480 nm (Abs 480), en 15 utilisant un photomètre pour déterminer la quantité d'acides libres formés c'est-à-dire l'activité de la lipase pancréatique porcine.

Les résultats figurent sur le tableau 1 où l'activité est exprimée sous forme de pourcentage de Abs 20 480 dans le cas où l'échantillon témoin est hydrolysé par la lipase pancréatique.

Tableau 1

	<u>Protéine (polypeptide)</u> <u>contenue dans l'échantillon</u>	<u>pH isoélectrique</u>	<u>Activité de la lipase</u> <u>pancréatique porcine (%)</u>
5	Témoin	-	100
	purothionines brutes	env. 10	6,0
	purothionine $\alpha_2$	env. 10	0
	purothionine $\beta$	env. 10	0
	albumine d'oeuf	env. 4-5	107,0
10	$\beta$ -lactoglobuline	env. 5	103,9
	BSA	env. 4-5	105,4

On peut voir d'après les résultats figurant au tableau 1 que l'activité de la lipase est fortement inhibée lorsque l'inhibiteur selon l'invention comprenant des purothionines brutes ou une purothionine  $\alpha_2$  purifiée ou une purothionine  $\beta$  purifiée est ajoutée en présence d'un acide de la bile, tandis que l'albumine d'oeuf, la  $\beta$ -lactoglobuline et BSA, n'appartenant pas aux protéines de base n'ont pas une activité d'inhibition de lipase dans les conditions spécifiées dans cet exemple.

#### EXEMPLE 2

On a contrôlé l'activité de la lipase pancréatique porcine de la même façon que dans l'exemple 1, sauf que la solution contenant la purothionine brute ou la purothionine  $\beta$  a été diluée à une concentration en protéine de 0,2 mg/ml. L'activité de lipase de l'échantillon contenant de la purothionine brute était de 97,5% indiquant ainsi que la purothionine brute dans une telle concentration présente une faible activité d'inhibition de la lipase pancréatique

porcine. Au contraire, l'activité de lipase de l'échantillon contenant la  $\beta$ -purothionine était de 0% montrant ainsi que la  $\beta$ -purothionine est capable d'inhiber fortement l'activité de la lipase pancréatique porcine même 5 en une telle concentration.

En outre, dans un essai séparé mis en oeuvre d'une façon similaire à celle indiquée ci-dessus, la  $\beta$ -purothionine était capable de réduire l'activité de la lipase pancréatique porcine à 5,2% même à une concentration 10 de 0,04 mg/ml montrant sa grande activité d'inhibition de la lipase pancréatique porcine.

#### EXEMPLE 3

(Préparation d'une émulsion d'oléate de cholestérol)

32,5 mg d'oléate de cholestérol et 25 mg de 15 phosphatidylcholine et 21,5 mg de cholate de sodium sont ajoutés à 5 ml de tampon au phosphate de potassium. La solution est soumise aux ultrasons pour préparer une émulsion d'oléate de cholestérol.

(Préparation d'une solution contenant la protéine)

20 Suivant le procédé indiqué dans l'exemple 1, on prépare quatre solutions contenant de la protéine, chacune de ces solutions contenant les purothionines brutes, BSA,  $\beta$ -lactoglobuline ou albumine d'oeuf.

(Préparation d'une solution d'estérase de cholestérol)

25 Une estérase de cholestérol isolée du pancréas porcine est ajoutée à 300 mM de solution tampon au phosphate de potassium pour préparer une solution d'enzyme

contenant 40  $\mu$ g/ml d'estérase de cholestérol.

(Contrôle de l'activité d'inhibition d'estérase de cholestérol de la protéine)

Un témoin et quatre échantillons à tester sont  
5 préparés de la façon suivante.

100  $\mu$ l d'une émulsion d'huile d'olive préparée comme ci-dessus sont utilisés comme support.

50  $\mu$ l d'une solution tampon au phosphate de potassium sont ajoutés au support pour préparer une  
10 émulsion témoin. Chaque 50  $\mu$ l solution contenant la protéine (polypeptide), préparée comme indiqué ci-dessus est ajoutée à 100  $\mu$ l de support pour préparer quatre émulsions d'échantillon à tester. Toutes les émulsions sont incubées pendant 5 minutes. A chacune de ces émulsions on  
15 ajoute 50  $\mu$ l de solution de lipase préparée comme ci-dessus. Le mélange résultant est incubé à 37°C pendant 1 heure puis on y ajoute 3 ml de solvant d'extraction utilisé dans l'exemple 1. Après agitation pendant 5 minutes, le mélange est centrifugé à 3000 t/min pendant 5 minutes. La  
20 couche supérieure est éliminée avec un aspirateur et on ajoute à la solution restante 1 ml de réactif au cuivre utilisé dans l'exemple 1. On agite le mélange pendant 5 minutes et on centrifuge à 3000 t/min pendant 5 minutes. 0,5 ml d'une solution sont prélevés de la couche supérieure  
25 et on ajoute à cette solution 0,5 ml de l'agent développant la couleur utilisé dans l'exemple 1.

Les solutions résultantes utilisées comme témoin et

essai à tester sont mesurées pour l'absorbance à 480 nm (Abs 480) utilisant un photomètre pour déterminer la quantité d'acide gras libre formé, c'est-à-dire l'activité de l'estérase de cholestérol.

5 Les résultats figurent sur le tableau 2 où l'activité est exprimée sous forme de pourcentage de Abs 480 lorsque l'échantillon témoin a été hydrolysé par l'estérase de cholestérol.

10

**Tableau 2**

	<u>Protéine (polypeptide)</u> <u>contenue dans l'échantillon</u>	<u>Activité de l'estérase de cholestérol(%)</u>
15	Témoin	100
	purothionines brutes	9,8
	albumine d'oeuf	93,6
	β-lactoglobuline	89,9
	BSA	120,0

20 Les résultats figurant dans le tableau 2 montrent que l'activité d'estérase de cholestérol est fortement inhibée lorsque l'inhibiteur selon l'invention renfermant des purothionines brutes, c'est-à-dire lorsque la protéine de base a été ajoutée en présence d'un acide de la bile, 25 tandis que l'albumine d'oeuf, la β-lactoglobuline et BSA n'appartenant pas aux protéines de base n'ont pas ou n'ont qu'une faible d'activité inhibant l'estérase de cholestérol, dans ces conditions.

**EXEMPLE 4**

30 (Préparation d'une émulsion d'huile d'olive)

250 mg de huile d'olive, 21,5 mg de cholate de sodium en tant que constituant acide de la bile et 30 mg de phosphatidylcholine sont ajoutés à 5 ml d'une solution tampon Tris de 200 mM à un pH de 6,8 (appelée ci-après 5 "tampon Tris").

Le mélange est soumis aux ultrasons pour préparer une émulsion d'huile d'olive.

(Préparation d'une solution contenant la protéine ou peptide)

10 10 ml de tampon Tris sont ajoutés à 1 mg de chacun des composés suivants :  $\beta$ -purothionine purifiée utilisée dans l'exemple 1, protamine (P4005, Sigma Co., Ltd., U.S.A.), histone H2A (H6881, Sigma Co., Ltd.), histone H3 (H4380, Sigma Co., Ltd.),  $\alpha$ -poly-L-lysine (3075, Peptide 15 Research Co., Ltd.) pour préparer six types de solutions contenant une protéine ou un peptide.

(Préparation de la solution de lipase)

La lipase pancréatique porcine (fabriquée par Sigma Co., Ltd.) est ajoutée au tampon Tris pour préparer une 20 solution d'enzyme contenant 100 unités de lipase pancréatique porcine par ml.

(Contrôle de l'activité des protéines inhibant la lipase)

Le témoin et les six échantillons à tester sont préparés de la façon suivante.

25 100  $\mu$ l d'émulsion d'huile d'olive préparée comme indiqué ci-dessus sont utilisés comme support.

50  $\mu$ l de tampon Tris sont ajoutés au support pour

préparer une émulsion témoin. Des portions de 50 ml de solution contenant la protéine (polypeptide) préparée comme ci-dessus sont ajoutés 100  $\mu$ l de support en vue de préparer six émulsions à tester. Toutes les émulsions sont incubées 5 pendant 5 minutes. A chacune de ces émulsions on ajoute 50  $\mu$ l d'une solution de lipase préparée comme ci-dessus. Le mélange résultant est incubé à 37°C pendant 1 heure puis on y ajoute 3 ml de solvant d'extraction utilisé dans l'exemple 1. Après agitation pendant 5 minutes, le mélange 10 est centrifugé à 3000 t/min pendant 5 minutes. La couche supérieure est éliminée avec un aspirateur et à la solution résultante on ajoute 1 ml du réactif au cuivre utilisé dans l'exemple 1. Le mélange est agité pendant 5 minutes et centrifugé à 3000 t/min pendant 5 minutes. 0,5 ml de 15 solution sont prélevés de la couche supérieure et on ajoute à cette solution 0,5 ml d'agent développant la couleur utilisé dans l'exemple 1.

Les solutions témoin et les échantillons à tester ainsi obtenus sont contrôlés pour mesurer leur absorbance à 20 480 nm (Abs 480) utilisant un photomètre pour déterminer la quantité d'acides gras libres formés, c'est-à-dire l'activité de la lipase pancréatique porcine.

Les résultats figurent sur le tableau 1 où l'activité est exprimée sous forme de pourcentage de Abs 25 480 lorsque l'échantillon témoin est hydrolysé par la lipase pancréatique porcine.

Tableau 3

	<u>Protéine (polypeptide)</u> <u>contenue dans l'échantillon</u>	<u>pH isoélectrique</u>	<u>Activité de la lipase</u> <u>pancréatique porcine (%)</u>
5	Témoin	-	100
	$\beta$ -purothionine	env. 10	1,3
	protamine	env. 10	1,3
	histone H2A	env. 10	3,7
	histone H3	env. 10	2,3
10	$\alpha$ -poly-L-lysine	env. 10	6,9
	poly-L-arginine	env. 10	16,5

Les résultats du tableau 3 montrent que l'activité de lipase est fortement inhibée lorsque l'inhibiteur selon la présente invention comprend les composés ci-après :  $\beta$ -purothionine purifiée, protamine, histone,  $\alpha$ -poly-L-lysine ou poly-L-arginine, une sorte de protéine ou peptine de base ajoutée dans les conditions spécifiées dans cet exemple.

#### EXAMPLE 5

20 Deux groupes de 10 rats mâles SD (âgés de 9 mois, pesant environ 200 g) ont été préparés.

50 g d'huile de maïs, 6 g de lécithine de jaune d'oeuf et 12,5 g de glycérine sont ajoutés à l'eau distillée pour compléter jusqu'à 100 ml. Le mélange est 25 soumis aux ultrasons pour préparer une émulsion.

On donne aux rats du premier groupe par voie orale, en utilisant une sonde gastrique, 2 ml d'émulsion et 100 mg de  $\epsilon$ -poly-L-lysine fabriqué par Chisso Corp. (contenant de

la dextrine et de la  $\epsilon$ -poly-L-lysine dans un rapport en poids de 1:1 et ayant la formule (I) où n représente environ 30). Du sang est prélevé de la veine caudale, à des intervalles prédéterminés, et on mesure la concentration du 5 sérum en triglycérides, en utilisant la trousse "Kyowa Medics enzyme Kit TG" et on détermine la valeur moyenne (mg/dl) par animal, calculée sur la base de la concentration en triglycérides du sérum avant l'administration (pris pour 0 mg/dl) (selon l'invention).

10 Les rats du second groupe sont alimentés par voie orale avec 2 ml d'émulsion et 50 mg de dextrine. On mesure la concentration en triglycérides du sérum à des intervalles prédéterminés et on détermine la valeur moyenne calculée de la même façon que ci-dessus, pour l'exemple 15 témoin.

Les résultats figurent sur le tableau 4 ci-après.

Tableau 4

<u>Concentration sanguine en graisse neutre (ml/dl)</u>			
	<u>Temps écoulé depuis l'administration (h)</u>	<u>Selon l'invention</u>	<u>Témoin</u>
20	0 (avant l'administration)	0	0
	1	53,3±2,5 <sup>a</sup>	176,8±16,3
	2	32,4±4,9 <sup>a</sup>	124,1±25,2
25	3	16,7±3,2 <sup>a</sup>	79,6±11,0
	4	11,1±3,0 <sup>a</sup>	62,0±10,5
	7	4,2±1,0 <sup>a</sup>	17,3± 3,0

a: Significativement différent à P<0,01

Comme montrent les résultats du tableau 4, dans le

cas des rats auxquels on a administré un échantillon contenant de l' $\epsilon$ -poly-L-lysine (une peptide de base selon l'invention) l'absorption des lipides par voie intestinale est inhibée et la concentration en triglycérides du sérum 5 peut être maintenue à un taux bas pendant une période de temps allant du début jusqu'à 7 heures après l'administration, ayant comme résultat une absorption de graisses totales très réduite. Ces résultats indiquent que  $\epsilon$ -polylysine exerce une activité d'inhibition in vivo de 10 l'enzyme lipolytique pendant une longue période de temps.

EXAMPLE 6

(Préparation de solutions contenant du peptide)

Deux solutions contenant du peptide sont préparées en ajoutant 1 mg d'eau distillée à chaque 1 mg de 15 chlorhydrate de  $\alpha$ -poly-L-lysine (3075, Peptide Research Co., Ltd.) et chlorhydrate de  $\alpha$ -poly-D-lysine (P7886, Sigma Co., Ltd.).

(Essai de la polylysine pour son activité d'inhibition de la lipase)

20 Un témoin et deux échantillons à tester ont été préparés de la façon suivante.

100  $\mu$ l d'une émulsion d'huile d'olive préparée de la même façon que dans l'exemple 4 a été utilisée comme support.

25 50  $\mu$ l de tampon Tris ont été ajoutés au support pour préparer une émulsion témoin. A chaque 100  $\mu$ l de support ont été ajoutés 50  $\mu$ l de solution contenant du

polypeptide préparée comme indiqué ci-dessus pour obtenir deux émulsions à tester. Après incubation des émulsions pendant 5 minutes, on a ajouté 50  $\mu$ l de solution d'enzyme préparée comme dans l'exemple 4. Les mélanges résultants 5 ont été incubés à 37°C pendant une heure.

Ensuite, les mélanges incubés ont été traités et on a mesuré leur activité sur la lipase pancréatique porcine de la même façon que dans l'exemple 4.

Les résultats figurent sur le tableau 5 ci-après.

10

Tableau 5

	<u>Polylysine contenue dans les échantillons</u>	<u>Activité sur la lipase pancréatique porcine (%)</u>
15	Témoin	100
	chlorhydride de $\alpha$ -poly-L-lysine	1,6
	bromhydrate de $\alpha$ -poly-D-lysine	1,1

On peut voir par les chiffres ci-dessus que les 20 polylysines aussi bien L que D peuvent inhiber fortement l'activité de la lipase dans les conditions spécifiées dans cet exemple.

EXAMPLE 7

(Préparation de solutions contenant du peptide)

25 On a préparé des oligomères de lysine ayant un degré de polymérisation de 2 à 5 comme indiqué au tableau 6, en utilisant un synthétiseur de peptide (Biolynx 4170, LKB-Pharmacia Co., Ltd.). Chacun des oligomères a été purifié par chromatographie liquide haute performance. A

chacun des oligomères on a ajouté de l'eau distillée pour compléter jusqu'à 1  $\mu$ mole/ml. Sept solutions contenant l'oligomère lysine ont été préparées.

5 (Essai de l'activité d'inhibition de lipase des oligomères de lysine)

Le témoin et les six échantillons à tester ont été préparés de la façon suivante.

100  $\mu$ l d'émulsion d'huile d'olive préparée de la même façon que dans l'exemple 4 ont été utilisés comme 10 support.

50  $\mu$ l de tampon Tris ont été ajoutés au support pour préparer une émulsion témoin. A chaque 50  $\mu$ l de solution contenant l'oligomère lysine préparée comme indiqué ci-dessus ont été ajouté 100  $\mu$ l de support pour 15 préparer six émulsions à tester. Après incubation des émulsions pendant 5 minutes, on leur a ajouté 50  $\mu$ l de solution de lipase contenant 100 unités de lipase pancréatique porcine par ml préparée de la même façon que dans l'exemple 4. Le mélange résultant a été incubé à 37°C 20 pendant une heure.

Ensuite, les mélanges incubés ont été traités pour mesurer leur activité sur la lipase pancréatique porcine de la même façon que dans l'exemple 4.

Les résultats figurent au tableau 6.

Tableau 6

	<u>Lysine oligomère contenue dans les échantillons</u>	<u>Activité de lipase pancréatique porcine (%)</u>
5	Témoin	100
	$\alpha$ -(L-lysine) <sub>2</sub>	103,6
	$\alpha$ -(L-lysine) <sub>4</sub>	103,8
	$\alpha$ -(L-lysine) <sub>5</sub>	2,1
10	$\epsilon$ -(L-lysine) <sub>3</sub>	89,0
	$\epsilon$ -(L-lysine) <sub>4</sub>	53,8
	$\epsilon$ -(L-lysine) <sub>5</sub>	3,1

Les chiffres ci-dessus montrent que les oligomères de lysine ayant un degré de polymérisation de 5 ou au-dessus de 5 inhibent fortement l'activité de la lipase, tandis que les oligomères avec un degré de polymérisation de 4 ou moins de 4 n'ont pas une activité inhibant la lipase dans les conditions spécifiées dans l'exemple. De plus, les oligomères de lysine de type  $\epsilon$  avec un degré de polymérisation de 4 ont une activité inhibant la lipase mais cette activité n'est pas suffisante tandis que l'oligomère avec un degré de polymérisation de 5 a une activité élevée d'inhibition de lipase. Il résulte du tableau 6 que l'oligomère de lysine ayant un degré de polymérisation plus élevé a une activité inhibant la lipase supérieure que la lysine ayant un degré de polymérisation inférieur.

Il a été signalé que les oligomères de  $\epsilon$ -lysine avec

un degré de polymérisation d'environ 10 ou supérieur possèdent une forte activité antimicrobienne. De ce fait, ainsi que des résultats figurant au tableau 6, on a conclu que les oligomères  $\epsilon$ -lysine ayant un degré de polymérisation 5 de 5 à 9 et qui n'exercent pas d'effet défavorable sur la flore intestinale peuvent être utilisés plus efficacement comme inhibiteur d'enzyme lipolytique.

REVENDICATIONS

1. Inhibiteur d'enzyme lipolytique comprenant comme ingrédient actif au moins une protéine de base, un polypeptide de base ou leurs sels.
- 5 2. Inhibiteur selon la revendication 1 où la protéine de base est choisie parmi les histones et les protamines.
- 10 3. Inhibiteur selon la revendication 1 ou 2 où la protéine de base est choisie dans le groupe formé par les histones H1, H2A, H2B, H3, H4, H5, les mono-, di- et tri-protamines.
- 15 4. Inhibiteur selon la revendication 1 où le polypeptide de base est choisi dans le groupe formé par la purothionine, l'analogue de purothionine, la polylysine, la polyarginine et leurs mélanges.
5. Inhibiteur selon la revendication 1 où le polypeptide de base est choisi parmi les purothionines  $\alpha_1$ ,  $\alpha_2$  et  $\beta$ .
- 20 6. Inhibiteur selon la revendication 1 où le polypeptide de base est choisi parmi l' $\alpha$  et  $\beta$ -polylysine et leurs mélanges.
- 25 7. Inhibiteur selon la revendication 1 où le polypeptide de base est un oligomère d' $\alpha$ -lysine ayant un degré de polymérisation de 5 ou plus, un oligomère  $\epsilon$ -lysine ayant un degré de polymérisation de 5 ou plus ou leurs mélanges.
8. Inhibiteur selon la revendication 1 où le sel de

la polypeptide de base est choisi parmi le chlorhydrate de  $\alpha$ -poly-L-lysine et le bromhydrate d' $\alpha$ -poly-D-lysine.

9. Agent diététique comprenant une substance inhibant l'enzyme lipolytique choisie dans le groupe formé 5 par une protéine de base, un polypeptide de base et leurs sels.

10. Agent diététique selon la revendication 9 où la substance inhibante est choisie parmi les histones, les protamines et leurs mélanges.

10 11. Agent diététique selon la revendication 9 où la substance inhibante est choisie parmi les histones H1, H2A, H2B, H3, H4, H5 et les mono-, di- et tri-protamines.

15 12. Agent diététique selon la revendication 9 où la substance inhibante est choisie parmi la purothionine, l'analogue de purothionine, la polylysine, la polyarginine et leurs mélanges.

13. Agent diététique selon la revendication 9 où la substance inhibante est choisie parmi les purothionines  $\alpha_1$ ,  $\alpha_2$  et  $\beta$ .

20 14. Agent diététique selon la revendication 9 où la substance inhibante est choisie parmi l' $\alpha$  et  $\beta$ -polylysines.

15 25 15. Agent inhibant selon la revendication 9 où la substance inhibante est un oligomère d' $\alpha$ -lysine ayant un degré de polymérisation de 5 ou plus, un oligomère d' $\epsilon$ -lysine ayant un degré de polymérisation de 5 ou plus ou leurs mélanges.

16. Agent diététique selon la revendication 9 où la

substance inhibante est le chlorhydrate d' $\alpha$ -poly-L-lysine ou le bromhydrate d' $\alpha$ -poly-D-lysine.

17. Additif alimentaire ou aliment comprenant une substance inhibant l'enzyme lipolytique, choisie parmi une 5 protéine de base, un polypeptide de base et leurs sels.

18. Additif selon la revendication 17 où la substance inhibante est choisie parmi les histones et les protamines.

19. Additif selon la revendication 17 où la 10 substance inhibante est choisie parmi les histones H1, H2A, H2B, H3, H4, H5 et les mono-, di- et tri-protamines.

20. Additif selon la revendication 17 où la substance inhibante est choisie parmi la purothionine, la purothionine analogue, la polylysine et la polyarginine.

21. Additif selon la revendication 17 où la 15 substance inhibante est choisie parmi les purothionines  $\alpha_1$ ,  $\alpha_2$  et la  $\beta$ .

22. Additif selon la revendication 17 où la substance inhibante est l' $\alpha$  ou la  $\beta$ -polylysine.

23. Additif selon la revendication 17 où la 20 substance inhibante est choisie parmi les oligomères d' $\alpha$ -lysine ayant un degré de polymérisation de 5 ou plus, les oligomères d' $\epsilon$ -lysine ayant un degré de polymérisation de 5 ou plus et leurs mélanges.

24. Additif selon la revendication 17 où la 25 substance inhibante est le chlorhydrate de  $\alpha$ -poly-L-lysine ou le bromhydrate de  $\alpha$ -poly-D-lysine.