

①9 RÉPUBLIQUE FRANÇAISE
INSTITUT NATIONAL
DE LA PROPRIÉTÉ INDUSTRIELLE
PARIS

①1 N° de publication :

2 947 149

(à n'utiliser que pour les
commandes de reproduction)

②1 N° d'enregistrement national :

09 54392

⑤1 Int Cl⁸ : **A 23 J 3/04** (2006.01), A 23 J 3/34, 1/04, A 23 L 1/305,
A 61 K 35/60, 38/01, A 61 P 3/04

⑫

DEMANDE DE BREVET D'INVENTION

A1

②2 Date de dépôt : 26.06.09.

③0 Priorité :

④3 Date de mise à la disposition du public de la
demande : 31.12.10 Bulletin 10/52.

⑤6 Liste des documents cités dans le rapport de
recherche préliminaire : *Se reporter à la fin du
présent fascicule*

⑥0 Références à d'autres documents nationaux
apparentés :

⑦1 Demandeur(s) : *COMPAGNIE DES PECHES SAINT
MALO SANTE Société par actions simplifiée — FR.*

⑦2 Inventeur(s) : *COUROIS ELISA et DRIEU LA
ROCHELLE HUBERT.*

⑦3 Titulaire(s) : *COMPAGNIE DES PECHES SAINT
MALO SANTE Société par actions simplifiée.*

⑦4 Mandataire(s) : *CABINET LE GUEN ET MAILLET.*

⑤4 **HYDROLYSAT DE PROTEINES DE POISSONS POUR SON UTILISATION DANS L'INHIBITION DE LA PRISE DE
POIDS ET/OU LA PERTE DE POIDS.**

⑤7 La présente invention concerne des hydrolysats de
protéines de poisson pour leur utilisation dans l'induction de
la perte de poids, la limitation et/ou l'inhibition de la prise de
poids ainsi que dans la prévention ou le traitement de trou-
bles de la santé liés à l'excès de poids.

Les hydrolysats de protéines selon l'invention sont obte-
nus par hydrolyse enzymatique d'au moins une source de
protéines choisie parmi le groupe composé des poissons
Micromesistius poutassou, Clupea harengus, Scomber
scombrus, Sardina pilchardus, Trisopterus esmarki, Tra-
churus spp., Gadus morhua, Pollachius virens, Melano-
grammus aeglefinus, Coryphaenoides rupestris, des
poissons appartenant à l'ordre des siluriformes, ladite hy-
drolyse enzymatique étant réalisée par une enzyme endo-
peptidase dérivée de Bacillus subtilis.

FR 2 947 149 - A1



La présente invention concerne des hydrolysats de protéines de poisson. Plus particulièrement, l'invention concerne des hydrolysats de protéines de poisson pour leur utilisation dans l'induction de la perte de poids, la limitation et/ou l'inhibition de la prise de poids ainsi que dans la prévention ou le traitement de troubles de la santé
5 liés à l'excès de poids.

Les hydrolysats de protéines de poisson peuvent être obtenus par voie chimique ou par voie enzymatique. Dans le premier cas, l'hydrolyse des protéines est réalisée à l'aide d'un acide fort ou d'une base forte, dans des conditions strictes de pH. Ces conditions d'hydrolyse altèrent considérablement la qualité des hydrolysats obtenus.
10 Dans le second cas, les hydrolysats sont obtenus par hydrolyse des protéines à l'aide d'enzymes endogènes ou d'enzymes exogènes. Ces conditions d'hydrolyse aboutissent à des hydrolysats de meilleure qualité, notamment en ce qui concerne l'hydrolyse à l'aide d'enzymes hétérogènes qui permet de contrôler le degré d'hydrolyse.

De nombreuses études ont démontré que les hydrolysats issus des coproduits et produits de la pêche obtenus par voie enzymatique présentaient des propriétés nutritionnelles et fonctionnelles intéressantes (Quaglia *et al.* 1987; Shahidi *et al.* 1995; Liceaga-Gesualdo *et al.* 1999; Kristinsson et Rasco 2000; Liaset *et al.* 2003). En effet, la réaction d'hydrolyse enzymatique permet d'obtenir des peptides de poids moléculaire variés pouvant présenter des propriétés biologiques nouvelles par rapport
20 à la protéine native. Par exemple, des études ont révélé que des hydrolysats de protéines de poissons, de crustacés et de mollusques, présentaient des propriétés anticoagulantes (Rajapakse *et al.* 2005), antiprolifératives de lignées cellulaires cancéreuses (Picot *et al.* 2006), réparatrices du tissu épithélial intestinal (Fitzgerald *et al.* 2005), antioxydantes (Chuang *et al.* 2000; Suetsuna *et al.* 2000; Kim *et al.* 2001; Suetsuna 2002; Wu *et al.* 2003; Jun *et al.* 2004; Suetsuna *et al.* 2004; Je *et al.* 2008; Raghavan *et al.* 2008), immunomodulatrices (Bogwald *et al.* 1996; Gildberg *et al.* 1996; Kotzamanis *et al.* 2007; Tang *et al.* 2008), et stimulatrices de la croissance de certaines lignées cellulaires (Ravallec-Plé *et al.* 2000; Guerard *et al.* 2001).

C'est ainsi que ces dernières années, de nombreuses industries pharmaceutiques, cosmétiques ou alimentaires se sont intéressées aux propriétés fonctionnelles des
30 hydrolysats de protéines de poisson ou de tout autre produit de la mer.

L'excès de poids est aujourd'hui une préoccupation constante. En effet, un excès de poids peut non seulement être à l'origine d'un mal être chez l'individu qui en souffre mais il peut également être à l'origine de troubles de la santé plus sérieux.

L'obésité, par exemple, est un facteur de risque de nombreux problèmes de santé, tels que des maladies cardiovasculaires, des troubles du métabolisme, de l'hypertension ou encore des cancers. Les origines d'un excès de poids sont très variées. Ce phénomène peut par exemple être d'origine comportementale, c'est-à-dire
5 lié à de mauvaises habitudes alimentaires, ou encore hormonale, comme au cours de la ménopause chez la femme.

Plusieurs solutions sont aujourd'hui proposées pour permettre de traiter ces problèmes de surpoids. Classiquement, le traitement ou la prévention de la surcharge pondérale peut être réalisé par un régime alimentaire. On sait toutefois qu'un tel
10 régime est difficile à suivre pour bon nombre de sujets et peut, lorsqu'il est mal adapté, entraîner des carences en nutriments essentiels au fonctionnement du corps humain. Une alternative est donc l'utilisation de principes actifs capables d'intervenir dans les mécanismes de limitation de prise de poids et/ou de perte de poids.

Dans ce contexte, les recherches effectuées par la société demanderesse ont
15 permis de découvrir que des hydrolysats de protéines de poisson obtenus à partir de l'hydrolyse enzymatique d'une source de protéines composée de certains poissons présentaient des propriétés permettant d'induire chez un consommateur une perte de poids, une limitation ou une inhibition de la prise de poids.

L'invention concerne ainsi l'utilisation, non thérapeutique, d'un hydrolysats de
20 protéines de poisson obtenu par hydrolyse enzymatique d'au moins une source de protéines choisie parmi le groupe composé des poissons *Micromesistius poutassou*, *Clupea harengus*, *Scomber scombrus*, *Sardina pilchardus*, *Trisopterus esmarki*, *Trachurus spp.*, *Gadus morhua*, *Pollachius virens*, *Melanogrammus aeglefinus*, *Coryphaenoides rupestris*, des poissons appartenant à l'ordre des siluriformes, ladite
25 hydrolyse enzymatique étant réalisée par une enzyme endopeptidase dérivée de *Bacillus subtilis*, pour l'induction de la perte de poids, la limitation ou l'inhibition de la prise de poids.

Les hydrolysats selon l'invention permettent d'obtenir une diminution de la masse corporelle, en particulier de la masse grasse, une amélioration du ratio masse
30 grasse/masse maigre, une amélioration de la composition corporelle et une régulation du métabolisme lipidique, plus particulièrement, une stimulation de la lipolyse et/ou une inhibition de la lipogénèse.

Selon un mode de réalisation de l'invention, l'hydrolysats de protéines de poisson présente:

- la répartition du profil moléculaire suivant : de 33 à 39 % de molécules de poids moléculaire inférieur à 300 Da, de 34 à 37 % de molécules dont le poids moléculaire est compris entre 300 et 1 000 Da, de 21 à 24 % de molécules dont le poids moléculaire est compris entre 1 000 et 3 000 Da, de 3 à 4 % de molécules dont le poids moléculaire est compris entre 3 000 et 5 000 Da et de 1 à 2 % de molécules dont le poids moléculaire est compris entre 5 000 et 10 000 Da,
- une teneur en lipides inférieure à 1 %, en pourcentage de produit brut,
- une teneur en glucides inférieure à 4 %, en pourcentage de produit brut,
- une teneur en protéines supérieure à 80 %, en pourcentage de produit brut,
- une teneur en matière minérale comprise entre 5 et 10 %, en pourcentage de produit brut.

L'hydrolysate de protéines de poisson présente avantageusement la composition en acides aminés suivante : Acide glutamique 16,9 %, Acide aspartique 11,7 %, Lysine 10 %, Leucine 8,2 %, Arginine 6,3 %, Alanine 6,8 %, Valine 4,8 %, Isoleucine 4,4 %, Glycine 5 %, Thréonine 4,5 %, Sérine 4,4 %, Tyrosine 3,2 %, Phénylalanine 3,9 %, Méthionine 2,6 %, Proline 3,4 %, Histidine 2 %, Cystine 1 %, Tryptophane 0,8 %, en pourcentage en poids par rapport au poids total d'acides aminés.

Un tel hydrolysate ainsi que son procédé d'obtention est déjà décrit dans la demande de brevet n° 08 00753 déposée par la société demanderesse, publiée sous le n° FR 2 927 336.

Selon un mode de réalisation de l'invention, la source de protéines de poisson comprend la pulpe obtenue à partir du filet du ou des poissons.

L'hydrolysate de protéines de poisson est obtenu par un procédé d'obtention comprenant:

- le broyage d'au moins une source de protéines choisie parmi le groupe composé des espèces de poissons *Micromesistius poutassou*, *Clupea harengus*, *Scomber scombrus*, *Sardina pilchardus*, *Trisopterus esmarki*, *Trachurus spp.*, *Gadus morhua*, *Pollachius virens*, *Melanogrammus aeglefinus*, *Coryphaenoides rupestris*, de poissons appartenant à l'ordre des siluriformes, en présence d'eau, de manière à récupérer la pulpe dudit ou desdits poissons,
- l'hydrolyse enzymatique de ladite source de protéines à une température comprise entre 50 et 75°C, pendant 1 à 5 heures, après l'ajout d'une enzyme

endopeptidase dérivée de *Bacillus subtilis* de manière à obtenir un mélange réactionnel,

- l'arrêt de ladite hydrolyse enzymatique par inactivation desdites enzymes après élévation de la température dudit mélange réactionnel à un niveau non inférieur à 70°C, pendant 8 à 20 minutes,
- la séparation de l'hydrolysate de protéines obtenu du reste du mélange réactionnel.

Avantageusement ladite hydrolyse enzymatique est réalisée selon un ratio enzyme/source de protéines compris entre 0,01 et 2 %, préférentiellement égal à 0,75 %, et à une température d'hydrolyse égale à 55°C.

Selon l'invention, l'enzyme endopeptidase dérivée de *Bacillus subtilis* est une métalloendopeptidase, ou bacillolysine, appartenant à la classe EC 3.4.24.28 de la classification EC établie par la Commission des enzymes et publiée par l'Union internationale de biochimie et de biologie moléculaire (IUBMB) en 1992.

L'invention concerne encore un hydrolysate de protéines de poisson obtenu par hydrolyse enzymatique d'au moins une source de protéines choisie parmi le groupe composé des poissons *Micromesistius poutassou*, *Clupea harengus*, *Scomber scombrus*, *Sardina pilchardus*, *Trisopterus esmarki*, *Trachurus spp.*, *Gadus morhua*, *Pollachius virens*, *Melanogrammus aeglefinus*, *Coryphaenoides rupestris*, des poissons appartenant à l'ordre des siluriformes, ladite hydrolyse enzymatique étant réalisée par une enzyme endopeptidase dérivée de *Bacillus subtilis* pour son utilisation dans le traitement et/ou la prévention de troubles de la santé liés à un excès de poids et/ou de maladies liées à un excès de poids.

Selon un mode de réalisation de l'invention, les troubles de la santé et/ou les maladies liés à un excès de poids sont l'obésité, les maladies cardiovasculaires, l'hypertension, l'hypercholestérolémie, l'athérosclérose, les troubles du métabolisme général, les troubles du poids symptomatiques de la ménopause.

Dans ces modes de réalisation, l'hydrolysate de protéines de poisson est tel que défini précédemment.

L'hydrolysate de protéines de poisson tel que défini précédemment peut ainsi être utilisé pour la fabrication d'un complément alimentaire, ou d'une composition pharmaceutique ou nutraceutique, destiné au traitement et/ou à la prévention de troubles de la santé liés à un excès de poids et/ou de maladies liées à un excès de poids.

L'hydrolysate de protéines de poisson selon l'invention encore peut être utilisé dans tout procédé d'amincissement ou d'amaigrissement.

L'invention concerne encore ainsi un procédé de traitement non thérapeutique pour l'induction de la perte de poids, la limitation ou l'inhibition de la prise de poids caractérisé en ce qu'il consiste à administrer par voie orale un hydrolysate de protéines de poisson tel que défini précédemment.

Les caractéristiques de l'invention mentionnées ci-dessus, ainsi que d'autres, apparaîtront plus clairement à la lecture de la description suivante d'un exemple de réalisation, ledit exemple se voulant illustratif et non limitatif.

La Fig. 1 illustre le poids, en gramme (non rapporté à 100 g), de l'utérus mesuré des souris au début de la première étude,

La Fig. 2 illustre le gain de poids cumulé en grammes relevé pour chaque groupe de souris au cours des trois mois de la première étude,

La Fig. 3 représente les index d'adiposité, c'est-à-dire, le rapport de la masse grasse sur la masse maigre, relevés,

La Fig. 4 illustre le poids de l'utérus des souris en gramme pour 100 grammes de poids corporel mesuré au début de la seconde étude,

La Fig. 5 illustre le gain de poids cumulé en grammes relevé pour chaque groupe de souris au cours des trois mois de la seconde étude,

La Fig. 6 illustre la proportion de tissu adipeux sous-cutané total pour 100 g de poids corporel, pour chaque groupe de souris, à la fin des trois mois de la seconde étude,

La Fig. 7 présente le résultat des mesures des tailles moyennes des repas, exprimées en grammes, en fonction des groupes, et en fonction de la période étudiée:

La Fig. 8 présente le résultat des mesures des tailles des repas exprimées en grammes pour 100 g de poids corporel, en fonction des groupes, et en fonction de la période étudiée lors de la seconde étude,

La Fig. 9 indique le nombre de repas effectués en fonction des groupes et de la période étudiée lors de la seconde étude, et

La Fig. 10 indique l'activité moyenne des souris, exprimée en unité arbitraire, rapportée à 100 g de poids corporel en fonction des groupes et de la période étudiée lors de la seconde étude.

Exemple 1: Hydrolysats de protéines obtenu à partir de merlan bleu

Le merlan bleu (*Micromesistius poutassou*) est pêché en Atlantique Nord au large de Terre-Neuve. Les poissons sont débités en filets qui sont ensuite broyés de manière à en obtenir la pulpe. Cette pulpe de poisson constitue une source de protéines pour la production de l'hydrolysats. La pulpe est conservée à -20°C jusqu'à utilisation.

Trois kilos de la pulpe de merlan bleu préalablement décongelée sont mélangés à de l'eau selon un rapport massique de 1. La température est portée à 55°C et une enzyme endopeptidase dérivée de *Bacillus subtilis*, commercialisée sous le nom de Corolase N par la société AB Enzyme (Feldbergstraße 78, D-64293, Darmstadt, Germany) est alors ajoutée dans le mélange réactionnel selon un ratio enzyme/source de protéines de 0,75 %.

La réaction d'hydrolyse est menée pendant 2 heures puis l'enzyme est inactivée par élévation de la température du milieu réactionnel à 85°C. Cette température est maintenue durant 15 minutes.

L'hydrolysats de protéines de merlan bleu obtenu, dénommé par la suite H1, est ensuite filtré sur un tamis (grillage de 2mm/2mm) de manière à éliminer les matières solides, puis récupéré dans un récipient. La fraction récupérée dans le récipient est alors centrifugée pendant 30 plus ou moins 5 minutes, à une vitesse comprise entre 4000 et 7000 RPM. Après élimination du culot, le surnageant est récupéré, lyophilisé et conservé dans un endroit frais et sec, à l'abri de la lumière. Le surnageant peut également être atomisé.

Exemple 2: Hydrolysats de protéines obtenu à partir d'autres espèces de poisson selon l'invention

Des hydrolysats de protéines de maquereau (H2) (*scomber scombrus*), chinchard (H3) (*Trachurus spp.*), grenadier (H4) (*Coryphaenoides rupestris*), tacaud (H5) (*Trisopterus esmarki*), sardine (H6) (*Sardina pilchardus*), hareng (H7) (*Clupea harengus*), panga (H8) (poissons appartenant à l'ordre des siluriformes), lieu noir (H10) (*Pollachius virens*), cabillaud (H9) (*Gadus morhua*) et églefin (H11) (*Melanogrammus aeglefinus*) ont été préparés selon le procédé de l'exemple 1.

Exemple 3: Analyses physico-chimiques des hydrolysats de protéines obtenus selon les exemples 1 et 2

Une détermination des poids moléculaires des peptides constitutifs de chaque hydrolysats de protéines H1 à H11 est réalisée par chromatographie d'exclusion stérique (SEC-HPLC).

L'hydrolysats de protéines sous forme de poudre après lyophilisation est suspendu dans de l'eau ultra pure à raison de 20 mg/mL, puis filtré sur une membrane de 0,45 µm et analysé par filtration sur gel avec une colonne Superdex Peptide HR 10/30, commercialisée par la société Pharmacia. La matrice de la colonne est composée d'un gel poreux réticulé (diamètre 13-15µm) d'agarose et de dextrane d'un volume total de 24 mL. Son domaine de fractionnement est compris entre 100 et 7000 Da. La colonne est montée sur une chaîne HPLC, commercialisée par la société Dionex, qui est équipée d'une pompe (module Dionex P680). La mesure est réalisée par un détecteur d'ultra violets multi longueur d'ondes (module Dionex UVD 170 U). L'hydrolysats de protéines H1 est élué par une phase mobile contenant de l'acétonitrile, de l'eau et du TFA. L'élution dure environ 1H à un débit de 0.5mL/min.

La répartition des poids moléculaires est calculée à partir des paramètres d'une droite de calibration obtenue après le passage dans la colonne de marqueurs de poids moléculaires connus suivants: Cytochrome C (12 400 Da), aprotinine (6 511 Da), gastrine I (2 126 Da), substance P fragment 1-7 (1 348 Da), glycine (75 Da) et leupeptine (463 Da). Les données sont collectées grâce au logiciel Chromeleon (Dionex). Les pourcentages des poids moléculaires sont calculés à l'aide d'un logiciel (GPC Cirrus de chez Polymer Laboratories). La longueur d'onde d'acquisition est de 214 nm. La répartition des poids moléculaires en fonction dW/logM est donnée par le logiciel. Le pourcentage de l'aire sous la courbe correspond au pourcentage de molécules. La répartition des poids moléculaires par classe de taille est donnée dans le Tableau 1:

La répartition des poids moléculaires par classe de taille est donnée dans le Tableau 1 suivant. Le pourcentage de l'aire sous la courbe correspond au pourcentage de molécules peptidiques.

Tous les hydrolysats montrent un profil de répartition des poids moléculaires identique.

Tableau 1

Classes	H1	H2	H3	H4	H5	H6	H7	H8	H9	H10	H11
< 0,3	33-39	39	33	33	33	35	33	33	36	33	34
0,3-1	34-37	34	37	37	37	37	37	37	37	36	37
1-3	21-24	22	24	24	24	22	24	24	22	24	23
3-5	3- 4	4	4	4	4	4	4	4	3	4	4
5->10	1- 2	1	2	2	2	2	2	2	2	2	2

La composition en acides aminés de l'hydrolysate de protéines H1 est donnée dans le Tableau 2 et est obtenue en suivant les indications de la Directive Européenne 98/64/CE et de la norme NF EN ISO 13904-octobre 2005.

Tableau 2

Acide aminé	Pourcentage d'acide aminé	Acide aminé	Pourcentage d'acide aminé
Acide glutamique	16,9	Glycine	5
Lysine	10	Thréonine	4,5
Acide aspartique	11,7	Sérine	4,4
Leucine	8,2	Tyrosine	3,2
Arginine	6,3	Phénylalanine	3,9
Alanine	6,8	Méthionine	2,6
Valine	4,8	Proline	3,4
Isoleucine	4,4	Histidine	2
Cystine	1	Tryptophane	0,8

10

La teneur en protéines est supérieure à 80 %, en pourcentage de produit brut (norme NF V18-120-Mars 1997 corrigée KJELDAHL).

La teneur en lipides est inférieure à 1%, en pourcentage de produit brut (selon la directive européenne 98/64/CE).

15

La valeur énergétique de l'hydrolysate de protéines H1 est d'environ 350 Kcal/100g.

La teneur en glucides est inférieure à 4 % (déduite à partir des teneurs en protéines et glucides et de la valeur énergétique).

Exemple 4: Activités biologiques d'un hydrolysats de protéines de merlan bleu H1

L'hydrolysats de protéines H1 a été testé vis-à-vis de son activité sur le poids chez un mammifère.

Lors des études qui suivent, un modèle de souris ovariectomisée a été utilisé afin d'induire une déficience en œstrogènes et de mimer un phénomène de ménopause.

Etude n°1:

Un régime contenant 14% en poids d'hydrolysats de protéines de poisson H1 a été comparé à un régime standard témoin contenant 14% en poids de caséines.

36 souris C3H, fournies par le centre d'élevage Harlan, ont été placées dans des cages au sein d'une pièce thermostatée à 22°C en cycle jour-nuit inversé (nuit de 6h à 18h). Les animaux ont été habitués à leur environnement et à leur nourriture sous forme de poudre pendant 2 semaines. Chaque animal a reçu de l'eau et de la nourriture *ad libitum* (5 grammes par jour et par souris) pendant les trois mois de l'étude.

A douze semaines, les souris ont subi soit une ovariectomie, soit une chirurgie sans ablation des ovaires. Suite à l'opération, les animaux ont été répartis en 3 groupes de 12 individus selon les régimes qu'ils allaient recevoir :

- Groupe 1: Les souris subissent l'ovariectomie et reçoivent le régime contrôle.
- Groupe 2: Les souris sont opérées sans subir d'ablation des ovaires et reçoivent le régime contrôle, soit 14% de caséines.

- Groupe 3: Les souris subissent l'ovariectomie et reçoivent un régime contenant 14% de H1 (même composition que le régime contrôle mais les protéines de lait sont substituées par l'hydrolysats de protéines de poisson obtenu selon l'exemple 1).

Tous les régimes fournis contiennent 14% de protéines et sont de compositions énergétiques proches comme l'indique le tableau 3 ci-dessous.

Tableau 3

	Constituants en g/kg de régime groupes 1 et 2	Constituants en g/kg de régime groupe 3
Protéines totales de lait g	140,0	0,0
H1 (poudre) g	0,0	140,0
Total Kcal/kg de régime	3617,4	3582,8

A l'issue de 3 mois de régime, les souris sont anesthésiées (injection de 0,1 ml
pour 10 grammes de poids corporel d'une solution de xylazine 1mg/ml et kétamine
10mg/ml) puis sont sacrifiées. La composition corporelle est établie par prélèvement
et pesée des différents tissus adipeux (péri-ovarien, mésentérique, péri-rénal, sous-
cutané, brun). Le poids de différents organes (rein, foie, utérus, rate, intestin) est
également évalué.

10

Validation du modèle

Lors du sacrifice, le poids des utérus a été mesuré précisément afin de vérifier
que l'ovariectomie avait été effectuée correctement. Dans un tel cas, l'utérus doit
apparaître atrophié. Dans le cas contraire, les souris ont été exclues de l'étude. Ces
résultats représentés sur la Fig. 1, laquelle rapporte le poids, en gramme (non rapporté
à 100 g), de l'utérus mesuré des souris. Les résultats ont montré que les souris du
groupe 2, qui n'ont pas subi d'ablation des ovaires, possédaient un utérus
significativement plus gros que celui des souris de tous les autres groupes. Sur la
Fig. 1, les valeurs sont données sous forme de moyenne plus ou moins les valeurs
d'écart-type. Les groupes n'ayant pas les mêmes lettres sont statistiquement différents
($p < 0.05$).

Aussi, aucun problème n'a été détecté lors de la vérification de l'efficacité de
l'ovariectomie.

25

Gain de poids au cours du temps:

La Fig. 2 illustre le gain de poids cumulé en grammes relevé pour chaque groupe de souris au cours des trois mois de l'étude. Les valeurs sont données sous forme de moyenne plus ou moins les valeurs d'écart-type. Les groupes n'ayant pas les mêmes lettres sont statistiquement différents ($p < 0.05$). Avant l'ablation des ovaires ou l'opération sans ablation des ovaires, tous les groupes avaient un poids moyen comparable. Dès un mois de régime, des différences apparaissent entre les groupes, différences qui s'accroissent au cours du temps. Ainsi, comme le montre la Fig. 2, après 3 mois de régime, le gain de poids cumulé observé pour le groupe témoin 1 est statistiquement plus élevé que celui rapporté pour les groupes 2 et 3 (résultat très significatif $p < 0,001$). Un effet « ovariectomie » est observé puisque les souris du groupe 1 prennent statistiquement plus de poids que les souris témoins du groupe 2. Cet effet n'est pas retrouvé chez les souris du groupe 3 puisqu'elles sont statistiquement plus maigres que les souris du groupe 1 après 3 mois de régime. Cette observation confirme que le régime reçu par le groupe 3 est efficace pour limiter la prise de poids engendrée par l'ovariectomie.

Le régime à base de l'hydrolysate H1 limite la prise de poids par rapport au régime constitué de caséines.

Index d'adiposité:

On a mesuré pour chacun des groupes à la fin des trois mois de l'étude les poids des carcasses, c'est-à-dire la masse maigre, ainsi que les masses adipeuses. Ces deux paramètres ont permis de calculer les index d'adiposité (rapport de la masse grasse sur la masse maigre) représentés sur la Fig. 3. Les index d'adiposité sont identiques en ce qui concerne les groupes 1 et 2 alors que celui du groupe 3 est statistiquement plus faible.

Le régime à base de l'hydrolysate H1 induit une diminution de la masse grasse et une augmentation de la masse maigre, améliorant significativement l'indice d'adiposité.

Etude n°2:

Des régimes contenant 7,5% ou 12,5 %, en poids, d'hydrolysats de protéines de poisson H1 ont été comparés à un régime standard témoin contenant 14,6%, en poids de caséines.

48 souris, C3H fournies par le centre d'élevage Harlan, ont été placées dans des cages au sein d'une pièce thermostatée à 22°C en cycle jour-nuit inversé (nuit de 6h à 18h). Les animaux ont été habitués à leur environnement et à leur nourriture sous forme de poudre pendant 2 semaines. Chaque animal a reçu de l'eau et de la nourriture *ad libitum* (5 grammes par jour et par souris) pendant les trois mois de l'étude.

A huit semaines, les souris ont subi soit une ovariectomie, soit une chirurgie sans ablation des ovaires. Suite à l'opération, les animaux ont été répartis en 4 groupes de 12 individus selon les régimes qu'ils allaient recevoir :

- Groupe 1: Les souris subissent l'ovariectomie et reçoivent le régime contrôle.
- Groupe 2: Les souris sont opérées sans subir d'ablation des ovaires et reçoivent le régime contrôle, soit 14,6% de caséines.
- Groupe 3: Les souris subissent l'ovariectomie et reçoivent un régime contenant 7,5 % de H1 (même composition que le régime contrôle mais une partie des protéines de lait sont substituées par l'hydrolysat de protéines de poisson obtenu selon l'exemple 1).
- Groupe 4: Les souris subissent l'ovariectomie et reçoivent un régime contenant 12,5 % de H1 (même composition que le régime contrôle mais les protéines de lait sont substituées par l'hydrolysat de protéines de poisson obtenu selon l'exemple 1).

La composition énergétique des régimes fournis est indiquée dans le tableau 4 ci-dessous.

Tableau 4

	Constituants en g/kg de régime groupes 1 et 2	Constituants en g/kg de régime groupe 3	Constituants en g/kg de régime groupe 4
Caséines g	146,7	60,6	0,0
H1 (poudre) g	0,0	75,0	125,0
Total Kcal/kg de régime	3721,3	3554,5	3249,3

A l'issue de 3 mois de régime, les souris sont anesthésiées (injection de 0,1 ml pour 10 grammes de poids corporel d'une solution de xylazine 1mg/ml et kétamine 10mg/ml) puis sont sacrifiées. La composition corporelle est établie par prélèvement et pesée des différents tissus adipeux (péri-ovarien, mésentérique, péri-rénal, sous-cutané, brun). Le poids de différents organes (rein, foie, utérus, rate, intestin) est également évalué.

Validation du modèle

Lors du sacrifice, le poids des utérus a été mesuré précisément afin de vérifier que l'ovariectomie avait été effectuée correctement (utérus atrophié) comme lors de l'étude n°1. Ces résultats représentés sur la Fig. 4 (poids de l'utérus en gramme pour 100 grammes de poids corporel) ont montré que les souris du groupe 2, qui n'ont pas subi d'ablation des ovaires, possédaient un utérus significativement plus gros que celui des souris de tous les autres groupes. Sur la Fig. 4, les valeurs sont données sous forme de moyenne plus ou moins les valeurs d'écart-type. Les groupes n'ayant pas les mêmes lettres sont statistiquement différents ($p < 0.05$).

Aucun problème n'a été détecté lors de la vérification de la validité du modèle.

Gain de poids au cours du temps:

La Fig. 5 illustre le gain de poids cumulé en grammes relevé pour chaque groupe de souris au cours des trois mois de l'étude. Les temps I, II et III correspondent respectivement aux mesures réalisées après un, deux et trois mois de régime. Les valeurs sont données sous forme de moyenne plus ou moins les valeurs d'écart-type. Les groupes n'ayant pas les mêmes lettres sont statistiquement différents ($p < 0.05$). Avant l'ablation des ovaires (groupes 1, 3 et 4) ou l'opération sans ablation des ovaires (groupe 2), tous les groupes présentaient un poids moyen comparable. Après trois mois de régime, des différences significatives apparaissent entre les groupes. Ainsi, le gain de poids cumulé observé pour le groupe témoin 1 de souris ovariectomisées est statistiquement plus élevé que celui rapporté pour les groupes 2, 3 et 4. De plus, le gain de poids cumulé observé pour le groupe 4 qui a reçu la quantité la plus élevée d'hydrolysate de protéines de poisson est inférieur de manière significative au gain de poids cumulé observé pour le groupe 3. Il n'y a pas de différence significative entre les

gains de poids cumulés relevés pour le groupe témoin 2 et le groupe 4. Ces observations démontrent que les hydrolysats de protéines de poisson reçus par les groupes 3 et 4 ont permis de limiter une prise de poids au cours du temps qui serait due à l'ovariectomie.

- 5 Aussi, le régime alimentaire à base de l'hydrolysat H1 aux concentrations 12,5 % et 7,5 % permet de diminuer significativement la prise de poids induite par l'ovariectomie et ce dès deux mois de régime.

Proportion des tissus adipeux pour 100g de poids corporel:

10

- On a représenté sur la Fig. 6 la proportion des tissus adipeux sous-cutanés totaux pour 100 g de poids corporel, pour chaque groupe de souris, à la fin des trois mois de l'étude. On observe encore une différence significative entre les souris du groupe 4 et les souris ovariectomisées du groupe 1 qui n'ont pas reçu l'hydrolysat de protéines de poisson. Ces dernières présentent une proportion de tissu adipeux sous-cutané supérieure à celle mesurée pour les souris du groupe 4.

15

Les régimes à base de l'hydrolysat H1 ont donc un effet positif sur la diminution du tissu adipeux.

20

Mesure de la prise alimentaire:

- Une étude sur la prise alimentaire par les souris a été réalisée afin de vérifier que l'effet observé sur le poids de l'hydrolysat de protéines de poisson n'est pas le résultat d'une aversion pour le régime, entraînant ainsi une perte de poids, ou bien encore le résultat d'un effet satiétogène de l'hydrolysat qui minimiserait la prise alimentaire.

25

- Pour ce faire, cinq souris du groupe 1, six souris du groupe 2 et cinq souris du groupe 4 sont individualisées durant cinq jours entiers dans des cages métaboliques. Ces cages métaboliques permettent d'enregistrer la quantité d'aliments ingérée en fonction du temps ainsi que de l'activité des souris. Les trois premiers jours sont des jours d'adaptation pour les souris à cet environnement. Les prises alimentaires et les activités sont mesurées les deux derniers jours. La nourriture est fournie sous forme semi-liquide durant les cinq jours.

30

Taille des repas pris par les souris:

La Fig. 7 présente le résultat des mesures des tailles moyennes des repas, exprimées en grammes, en fonction des groupes, et en fonction de la période étudiée: P1: période globale; P2: jour; P3: nuit.

5 La Fig. 8 présente le résultat des mesures des tailles des repas exprimées en grammes pour 100 g de poids corporel, en fonction des groupes, et en fonction de la période étudiée: P1: période globale; P2: jour; P3: nuit.

Nombre de repas effectués en fonction des groupes et de la période étudiée:

10

La Fig. 9 indique le nombre de repas effectués en fonction des groupes et de la période étudiée: P1: période globale; P2: jour; P3: nuit. Les groupes n'ayant pas les mêmes lettres sont statistiquement différents ($p < 0.05$).

15 Comme cela ressort des Figs. 7 et 8, aucune différence significative n'est observée entre les différents groupes en ce qui concerne la taille des repas. Par contre, la Fig. 9 indique des différences significatives entre les groupes 4 et les groupes 1 ou 2 en ce qui concerne le nombre de repas pris par les souris durant la période nocturne (P3) ainsi que durant la période globale (P1). Les souris du groupe 4, dont le régime alimentaire inclut l'hydrolysate de protéines de poisson, se nourrissent plus souvent que
20 les souris dont le régime alimentaire n'inclut pas l'hydrolysate de protéines de poisson.

Cette étude démontre que l'hydrolysate de protéines de poisson n'a pas d'effet satiétogène et n'induit pas, de plus, d'aversion pour le régime alimentaire.

25 Ainsi, le groupe recevant le régime contenant H1 a une taille de repas identique aux autres groupes témoins, mais le nombre de repas est significativement plus élevé. Donc le groupe recevant H1 ingère significativement plus de nourriture, mais il est significativement plus maigre que le groupe témoin recevant des caséines, et ce dès 1 mois de régime.

Mesure de l'activité des animaux:

La Fig. 10 indique l'activité moyenne des souris (unité arbitraire) rapportée à 100 g de poids corporel en fonction des groupes et de la période étudiée (P1, P2, P3).

L'ovariectomie entraîne une diminution significative de l'activité totale, comme le montrent les différences significatives observées entre le groupe 1 (ovariectomisé) et le groupe 2 (non ovariectomisé) lequel montre une activité supérieure.

5 L'ovariectomie des souris entraîne chez ces dernières une diminution significative de la dépense énergétique.

Conclusions

10 Ainsi, l'hydrolysate de protéines de poisson a limité la prise de poids alors qu'il n'a pas limité la prise alimentaire. De plus, l'ingestion de cet hydrolysate ne s'est pas accompagnée d'une augmentation de l'activité physique des souris. Son effet sur le poids des souris est donc dû à un ou plusieurs phénomènes physiologiques.

REVENDICATIONS

- 1) Utilisation non thérapeutique d'un hydrolysat de protéines de poisson obtenu par hydrolyse enzymatique d'au moins une source de protéines choisie parmi le groupe composé des poissons *Micromesistius poutassou*, *Clupea harengus*, *Scomber scombrus*, *Sardina pilchardus*, *Trisopterus esmarki*, *Trachurus spp.*, *Gadus morhua*, *Pollachius virens*, *Melanogrammus aeglefinus*, *Coryphaenoides rupestris*, des poissons appartenant à l'ordre des siluriformes, ladite hydrolyse enzymatique étant réalisée par une enzyme endopeptidase dérivée de *Bacillus subtilis*, pour l'induction de la perte de poids, la limitation ou l'inhibition de la prise de poids.
- 2) Utilisation selon la revendication 1, dans laquelle l'hydrolysat de protéines de poisson présente:
- la répartition du profil moléculaire suivant : de 33 à 39 % de molécules de poids moléculaire inférieur à 300 Da, de 34 à 37 % de molécules dont le poids moléculaire est compris entre 300 et 1 000 Da, de 21 à 24 % de molécules dont le poids moléculaire est compris entre 1 000 et 3 000 Da, de 3 à 4 % de molécules dont le poids moléculaire est compris entre 3 000 et 5 000 Da et de 1 à 2 % de molécules dont le poids moléculaire est compris entre 5 000 et 10 000 Da,
 - une teneur en lipides inférieure à 1 %, en pourcentage de produit brut,
 - une teneur en glucides inférieure à 4 %, en pourcentage de produit brut,
 - une teneur en protéines supérieure à 80 %, en pourcentage de produit brut,
 - une teneur en matière minérale comprise entre 5 et 10 %, en pourcentage de produit brut.
- 3) Utilisation selon l'une des revendications 1 ou 2, dans laquelle l'hydrolysat de protéines de poisson présente la composition en acides aminés suivante : Acide glutamique 16,9 %, Acide aspartique 11,7 %, Lysine 10 %, Leucine 8,2 %, Arginine 6,3 %, Alanine 6,8 %, Valine 4,8 %, Isoleucine 4,4 %, Glycine 5 %, Thréonine 4,5 %, Sérine 4,4 %, Tyrosine 3,2 %, Phénylalanine 3,9 %, Méthionine 2,6 %, Proline 3,4 %, Histidine 2 %, Cystine 1 %, Tryptophane 0,8 %, en pourcentage en poids par rapport au poids total d'acides aminés.
- 4) Utilisation selon l'une des revendications précédentes, dans laquelle ladite source de protéines de poisson comprend la pulpe obtenue à partir du filet dudit ou desdits poissons.

5) Utilisation selon l'une des revendications précédentes, dans laquelle l'hydrolysate de protéines de poisson est obtenu par un procédé d'obtention comprenant:

- le broyage d'au moins une source de protéines choisie parmi le groupe composé des espèces de poissons *Micromesistius poutassou*, *Clupea harengus*, *Scomber scombrus*, *Sardina pilchardus*, *Trisopterus esmarki*, *Trachurus spp.*, *Gadus morhua*, *Pollachius virens*, *Melanogrammus aeglefinus*, *Coryphaenoides rupestris*, de poissons appartenant à l'ordre des siluriformes, en présence d'eau, de manière à récupérer la pulpe dudit ou desdits poissons,
- l'hydrolyse enzymatique de ladite source de protéines à une température comprise entre 50 et 75°C, pendant 1 à 5 heures, après l'ajout d'une enzyme endopeptidase dérivée de *Bacillus subtilis* de manière à obtenir un mélange réactionnel,
- l'arrêt de ladite hydrolyse enzymatique par inactivation desdites enzymes après élévation de la température dudit mélange réactionnel à un niveau non inférieur à 70°C, pendant 8 à 20 minutes,
- la séparation de l'hydrolysate de protéines obtenu du reste du mélange réactionnel.

6) Utilisation selon l'une des revendications précédentes, dans laquelle ladite hydrolyse enzymatique est réalisée selon un ratio enzyme/source de protéines compris entre 0,01 et 2 %, préférentiellement égal à 0,75 %, et à une température d'hydrolyse égale à 55°C.

7) Utilisation selon l'une des revendications précédentes, dans laquelle l'enzyme endopeptidase dérivée de *Bacillus subtilis* est une métalloendopeptidase, ou bacillolysine, appartenant à la classe EC 3.4.24.28 de la classification EC établie par la Commission des enzymes.

8) Utilisation d'un hydrolysate de protéines de poisson tel que défini dans l'une des revendications 1 à 7 pour la fabrication d'un complément alimentaire, ou d'une composition pharmaceutique ou nutraceutique, destiné au traitement et/ou à la prévention de troubles de la santé liés à un excès de poids et/ou de maladies liées à un excès de poids.

9) Utilisation selon la revendication 8 dans laquelle les troubles de la santé et/ou les maladies liés à un excès de poids sont l'obésité, les maladies

cardiovasculaires, l'hypertension, l'hypercholestérolémie, l'athérosclérose, les troubles du métabolisme général, les troubles du poids symptomatiques de la ménopause.

- 10) Hydrolysats de protéines de poisson obtenu par hydrolyse enzymatique d'au moins une source de protéines choisie parmi le groupe composé des poissons
- 5 *Micromesistius poutassou*, *Clupea harengus*, *Scomber scombrus*, *Sardina pilchardus*, *Trisopterus esmarki*, *Trachurus spp.*, *Gadus morhua*, *Pollachius virens*, *Melanogrammus aeglefinus*, *Coryphaenoides rupestris*, des poissons appartenant à l'ordre des siluriformes, ladite hydrolyse enzymatique étant réalisée par une enzyme endopeptidase dérivée de *Bacillus subtilis* pour son utilisation dans le traitement et/ou
- 10 la prévention de troubles de la santé liés à un excès de poids et/ou de maladies liées à un excès de poids.

- 11) Hydrolysats de protéines de poisson selon la revendication 9, caractérisé en ce que les troubles de la santé et/ou les maladies liés à un excès de poids sont l'obésité, les maladies cardiovasculaires, l'hypertension, l'hypercholestérolémie,
- 15 l'athérosclérose, les troubles du métabolisme général, les troubles du poids symptomatiques de la ménopause.

- 12) Hydrolysats de protéines de poisson selon la revendication 10 ou 11, caractérisé en ce qu'il est tel que défini dans les revendications 1 à 7.

- 13) Procédé de traitement non thérapeutique pour l'induction de la perte de poids, la limitation ou l'inhibition de la prise de poids caractérisé en ce qu'il consiste à
- 20 administrer par voie orale un hydrolysats de protéines de poisson tel que défini dans les revendications 1 à 7.

PL 1/5

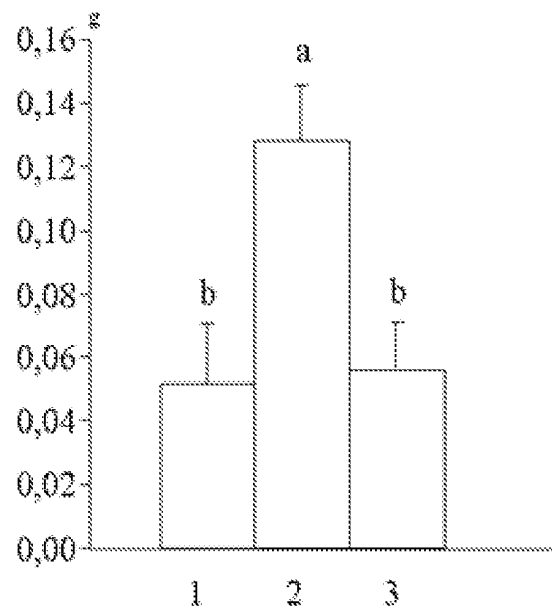


Fig. 1

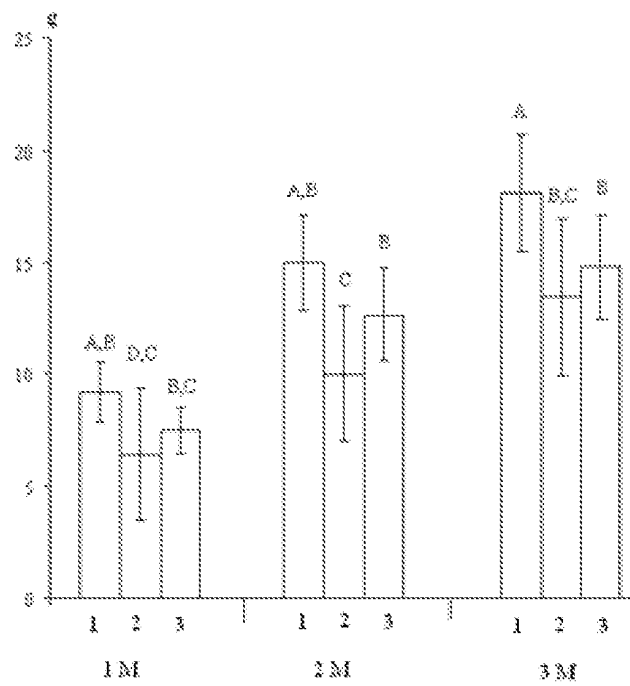


Fig. 2

PL 2/5

Fig. 3

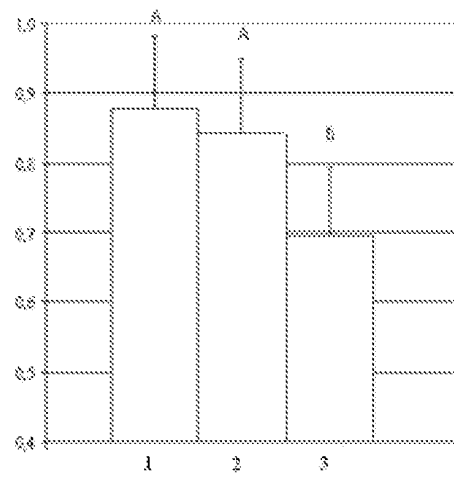
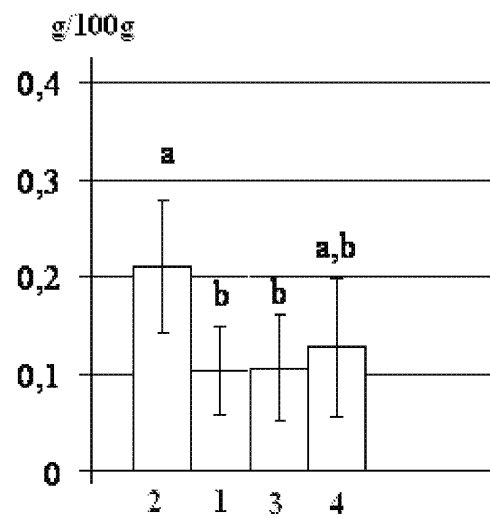


Fig. 4



PL 3/5

Fig. 5

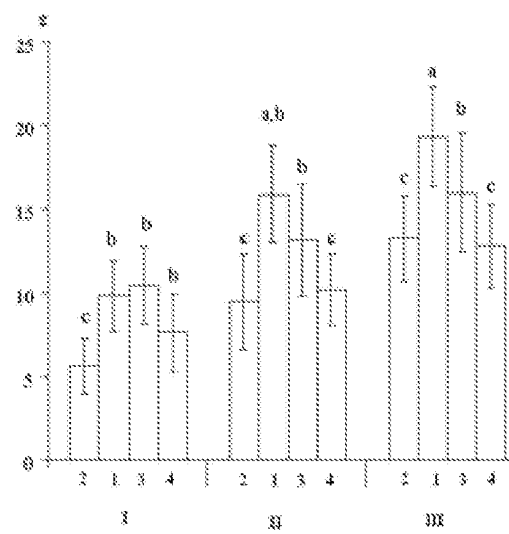
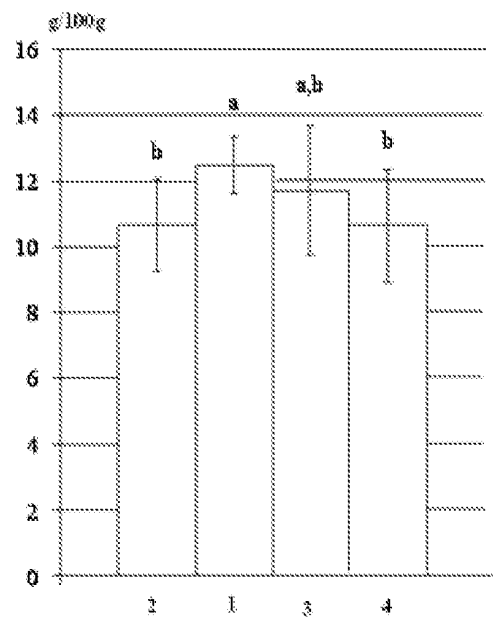


Fig. 6



PL 4/5

Fig. 7

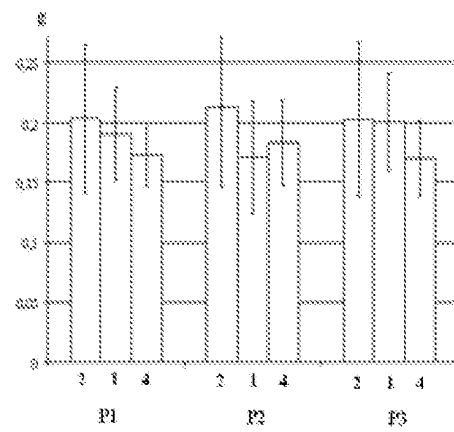
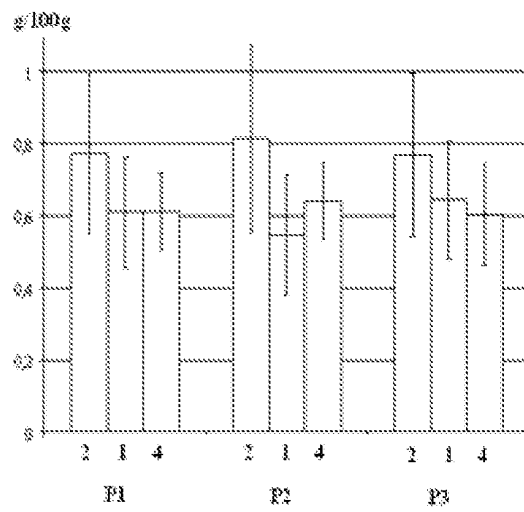


Fig. 8



PL 5/5

Fig. 9

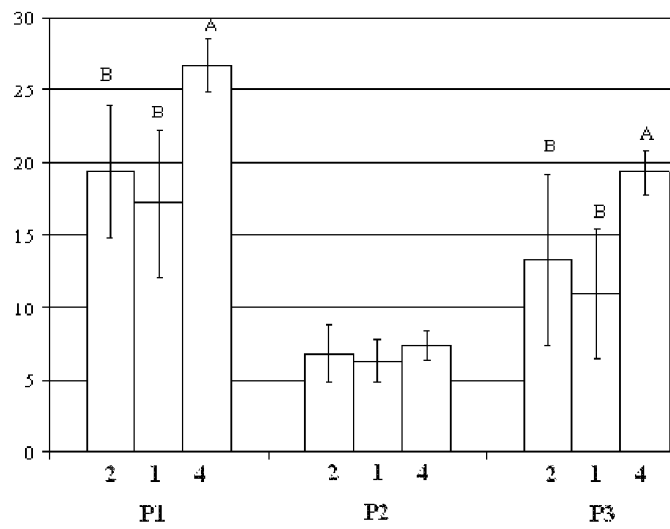
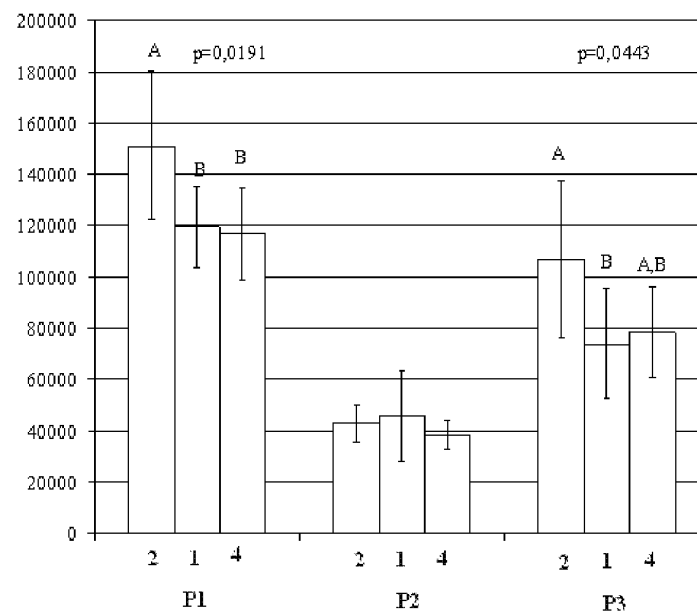


Fig. 10





RAPPORT DE RECHERCHE PRÉLIMINAIRE

établi sur la base des dernières revendications
déposées avant le commencement de la recherche

N° d'enregistrement
national

FA 728444
FR 0954392

DOCUMENTS CONSIDÉRÉS COMME PERTINENTS		Revendication(s) concernée(s)	Classement attribué à l'invention par l'INPI
Catégorie	Citation du document avec indication, en cas de besoin, des parties pertinentes		
E	WO 2009/101134 A1 (CIE DES PECHES SAINT MALO SANT [FR]; MUSEUM NAT D HISTOIRE NATURELL [F] 20 août 2009 (2009-08-20) * page 1, ligne 2-5 * * page 3, ligne 5 - page 4, ligne 3 * * page 4, ligne 19-23 * -----	1,4,8-13	A23J3/04 A23J3/34 A23J1/04 A23L1/305 A61K35/60 A61K38/01 A61P3/04
X	RAVALLEC-PLÉ ROZENN ET AL: "The presence of bioactive peptides in hydrolysates prepared from processing waste of sardine (Sardina pilchardus)" JOURNAL OF THE SCIENCE OF FOOD AND AGRICULTURE, WILEY & SONS, CHICHESTER, GB, vol. 81, no. 11, 1 septembre 2001 (2001-09-01), pages 1120-1125, XP002501882 ISSN: 0022-5142 [extrait le 2001-01-01]	1,3-13	
A	* le document en entier *	2	
X	RAVALLEC-PLÉ R ET AL: "Secretagogue activities in cod (Gadus morhua) and shrimp (Penaeus aztecus) extracts and alcalase hydrolysates determined in AR4-2J pancreatic tumour cells" COMPARATIVE BIOCHEMISTRY AND PHYSIOLOGY. PART B, BIOCHEMISTRY AND MOLECULAR BIOLOGY, ELSEVIER, OXFORD, GB, vol. 134, no. 4, 1 avril 2003 (2003-04-01) , pages 669-679, XP002501880 ISSN: 1096-4959	1,3-13	DOMAINES TECHNIQUES RECHERCHÉS (IPC) A23J A23L A61K
A	* le document en entier * ----- -/-	2	
Date d'achèvement de la recherche		Examineur	
18 février 2010		Couzy, François	
CATÉGORIE DES DOCUMENTS CITÉS X : particulièrement pertinent à lui seul Y : particulièrement pertinent en combinaison avec un autre document de la même catégorie A : arrière-plan technologique O : divulgation non-écrite P : document intercalaire T : théorie ou principe à la base de l'invention E : document de brevet bénéficiant d'une date antérieure à la date de dépôt et qui n'a été publié qu'à cette date de dépôt ou qu'à une date postérieure. D : cité dans la demande L : cité pour d'autres raisons & : membre de la même famille, document correspondant			



RAPPORT DE RECHERCHE PRÉLIMINAIRE

établi sur la base des dernières revendications
déposées avant le commencement de la recherche

N° d'enregistrement
national

FA 728444
FR 0954392

DOCUMENTS CONSIDÉRÉS COMME PERTINENTS		Revendication(s) concernée(s)	Classement attribué à l'invention par l'INPI
Catégorie	Citation du document avec indication, en cas de besoin, des parties pertinentes		
X	US 2006/183690 A1 (EWART HARRY S [CA] ET AL EWART HARRY STEPHEN [CA] ET AL) 17 août 2006 (2006-08-17)	8-12	
A	* alinéas [0006], [0008], [0014] - [0016], [0023], [0032] - [0033], [0048] - [0049] *	1-7,13	
X	WO 2006/084383 A1 (OCEAN NUTRITION CANADA LTD [CA]; EWART HARRY STEPHEN [CA]; DENNIS DORO) 17 août 2006 (2006-08-17)	8-12	
A	* page 4, ligne 6 - page 5, ligne 16 * * page 5, ligne 17-27 * * page 6, ligne 20 - page 7, ligne 23 * * page 9, ligne 26-29 * * page 13, ligne 22-23 *	1-7,13	
A	US 4 584 197 A (TAKASAKI TAKASHI [JP] ET AL) 22 avril 1986 (1986-04-22) * colonne 1, ligne 8 - colonne 2, ligne 68 * * colonne 3, ligne 43-61 * * colonne 4, ligne 25-28 *	1-13	DOMAINES TECHNIQUES RECHERCHÉS (IPC)
A	US 2007/142274 A1 (BERGE ROLF [NO]) 21 juin 2007 (2007-06-21) * alinéas [0007], [0010], [0023] *	1-13	
Date d'achèvement de la recherche		Examineur	
18 février 2010		Couzy, François	
CATÉGORIE DES DOCUMENTS CITÉS X : particulièrement pertinent à lui seul Y : particulièrement pertinent en combinaison avec un autre document de la même catégorie A : arrière-plan technologique O : divulgation non-écrite P : document intercalaire T : théorie ou principe à la base de l'invention E : document de brevet bénéficiant d'une date antérieure à la date de dépôt et qui n'a été publié qu'à cette date de dépôt ou qu'à une date postérieure. D : cité dans la demande L : cité pour d'autres raisons & : membre de la même famille, document correspondant			

ANNEXE AU RAPPORT DE RECHERCHE PRÉLIMINAIRE **RELATIF A LA DEMANDE DE BREVET FRANÇAIS NO. FR 0954392 FA 728444**

La présente annexe indique les membres de la famille de brevets relatifs aux documents brevets cités dans le rapport de recherche préliminaire visé ci-dessus.

Les dits membres sont contenus au fichier informatique de l'Office européen des brevets à la date du **18-02-2010**

Les renseignements fournis sont donnés à titre indicatif et n'engagent pas la responsabilité de l'Office européen des brevets, ni de l'Administration française

Document brevet cité au rapport de recherche	Date de publication	Membre(s) de la famille de brevet(s)	Date de publication
WO 2009101134 A1	20-08-2009	FR 2927335 A1	14-08-2009
US 2006183690 A1	17-08-2006	CA 2567582 A1	17-08-2006
		WO 2006084351 A1	17-08-2006
		EP 1853290 A1	14-11-2007
WO 2006084383 A1	17-08-2006	CA 2639880 A1	17-08-2006
		US 2009111747 A1	30-04-2009
US 4584197 A	22-04-1986	DE 3318130 A1	06-09-1984
		DK 217583 A	05-09-1984
		FR 2541897 A1	07-09-1984
		GB 2136002 A	12-09-1984
		JP 1014885 B	14-03-1989
		JP 1531241 C	15-11-1989
		JP 59161319 A	12-09-1984
		SU 1308183 A3	30-04-1987
US 2007142274 A1	21-06-2007	AU 2004253441 A1	13-01-2005
		CA 2542396 A1	13-01-2005
		CL 16422004 A1	06-05-2005
		CN 1845748 A	11-10-2006
		EP 1653981 A1	10-05-2006
		JP 2007527384 T	27-09-2007
		KR 20060111897 A	30-10-2006
		NO 322425 B1	02-10-2006
		WO 2005002605 A1	13-01-2005
		NZ 545120 A	30-04-2009
		RU 2360693 C2	10-07-2009