

BREVET SPÉCIAL DE MÉDICAMENT

P.V. n° 926.515

N° 2.828 M

Classification internationale :

A 61 k

Médicament renfermant des colibacilles antibiorésistants.

M. LUCIEN NOUVEL résidant en France (Seine).

Demandé le 1^{er} mars 1963, à 15^h 5^m, à Paris.

Délivré par arrêté du 5 octobre 1964.

(Bulletin officiel de la Propriété industrielle [B.S.M.], n° 45 du 2 novembre 1964.)

La présente invention a pour objet un nouveau médicament à base de colibacilles vivants non pathogènes résistant aux antibiotiques. Elle concerne plus particulièrement des compositions médicamenteuses stables destinées au traitement des affections intestinales liées à un déséquilibre de la flore intestinale.

On sait que la présence du colibacille non pathogène, hôte normal et majoritaire du colon, est indispensable dans l'intestin car ledit colibacille exerce à la fois une action digestive, en particulier sur la cellulose qu'il est le seul à digérer, et une action métabolique, par la synthèse endointestinale des vitamines, en particulier celles des groupes B et K.

On sait aussi que l'utilisation de plus en plus fréquente de sulfamides et d'antibiotiques à large spectre d'action entraîne, simultanément à la destruction des germes nocifs, celle de la flore intestinale utile, et notamment des colibacilles non pathogènes qui représentent la population majoritaire du colon.

Dans le but de remédier au déséquilibre ainsi créé dans la flore intestinale il a déjà été proposé, depuis de nombreuses années, de faire absorber aux malades atteints de gastroentérite, entérocolite et autres affections intestinales — y compris les troubles dus à l'absorption d'antibiotiques — des médicaments à base de colibacilles non pathogènes vivants, de préférence d'origine spécifiquement intestinale, et pouvant renfermer en outre d'autres constituants actifs, tels que par exemple du fer (voir par exemple les revues : *Hippokrates*, vol. 24, page 336 et suivantes [1953]; *Die Medizinische*, n° 46, pages 1615-1617 [1955]).

Très récemment il a été préconisé d'associer aux colibacilles non pathogènes vivants, tels que par exemple ceux traités de la souche *Escherichia Coli Communis*, cultivés dans un milieu d'enrichissement approprié, une substance active telle que l'acide glutamique. (Brevet spécial de médicament, n° M. 1275 déposé en France le 6 mai 1961.) La présence de cet acide permet, entre autres avantages, d'améliorer l'implantation du colibacille dans l'in-

testin et de réensemencer le colon de façon durable

Il a maintenant été trouvé que l'on pouvait encore accroître notablement l'efficacité des médicaments à base de colibacilles non pathogènes vivants en leur associant des substances qui permettent à la fois un réensemencement rapide des colibacilles dans l'intestin et une stabilisation immédiate des germes vivants introduits dans la flore intestinale.

Les compositions médicamenteuses selon l'invention renferment essentiellement comme constituants :

Une suspension aqueuse de germes de colibacilles non pathogènes vivants.

Un acide aminé ou son sel de métal alcalin tel que par exemple l'acide glutamique ou le glutamate de sodium.

Un extrait aminé de levure.

Un épaississant de la suspension aqueuse, tel que par exemple de la gélose, peptine, gomme arabique, une alcoylcellulose, ou substances analogues.

Un tampon permettant de régulariser le pH de la suspension aqueuse de culture des colibacilles.

Le demandeur a en effet constaté que la présence dans lesdites compositions d'une substance ou mélange de substances servant de tampon permettait de stabiliser les mélanges de bouillons de cultures des colibacilles non pathogènes et d'acide glutamique et simultanément d'accélérer leur action dans la paroi intestinale.

Le pH de la suspension aqueuse doit être maintenu entre 4 et 9 et de préférence à des valeurs voisines de 7,4. On peut citer à titre non limitatif, comme substances-tampons utilisables dans ce but, des mélanges en proportions appropriées comme par exemple les couples : acide d-l aspartique et d-l aspartate de sodium, tartrate monosodique et tartrate disodique, citrate monosodique et citrate disodique, citrate disodique et citrate trisodique, acide acétique et acétate de sodium, acide glutamique et glutamate de sodium, phosphate disodique et phosphate monopotassique, d-l cystéine

(ou d-l tyrosine) et leurs chlorhydrates, ammoniac et chlorure d'ammonium, etc.

En outre les compositions selon l'invention peuvent renfermer : d'autres germes normaux de l'intestin humain, comme par exemple des bacilles lactiques; des substances permettant de protéger la paroi intestinale, comme par exemple du kaolin, des sels de bismuth, gels d'alumine; des matériaux nécessaires à l'assise protéique des microorganismes, tels que des peptones (viande, fibrine, etc.), riches en facteurs de croissance; des sels métalliques comme par exemple des sulfates ou phosphates de magnésium, fer, etc.; des bactériophages de germes intestinaux, tels que des protéus, staphylocoques et entérocoques non pathogènes; naturellement on évitera la présence de bactériophages non pathogènes.

Les colibacilles non pathogènes utilisés dans les compositions médicamenteuses selon l'invention peuvent être obtenus selon les procédés classiques. Par exemple, après avoir isolé à partir des selles d'un individu sain la souche de colibacille désirée, on cultive les germes sur un ou plusieurs milieux d'enrichissement appropriés tel que par exemple le milieu de Muller-Kaufmann et celui de Kristensen-Kaufmann. La souche obtenue est ensuite typée par ses caractères antigéniques précis et l'on prépare un sérum coagulant pour permettre une diagnose rapide.

Le germe est caractérisé par ses réactions biochimiques typiques dans le groupe des entérobactériacées, à savoir : gram négatif, réactions négative avec urée, hydrogène sulfuré, réactions positives avec mannitol, glucose, lactose et indol.

Le germe ainsi typé et caractérisé est cultivé dans un bouillon d'enrichissement renfermant les divers ingrédients, énumérés ci-dessus, des compositions de l'invention. A partir de cette culture on sélectionne des individus résistant aux principaux antibiotiques connus, soit par la méthode dite « des gradients » soit en introduisant, dans le milieu de culture de la souche, une quantité déterminée d'antibiotique. Périodiquement la culture est réensemencée dans le bouillon renfermant les antibiotiques et l'on contrôle l'antibiorésistance sur boîte de Pétri. La culture est également contrôlée par mise en contact avec des sérums agglutinants ou par un bactériophage spécifique des formes susceptibles de déclencher des gastro-entérites infantiles et typés sous les dénominations 111 B4, 55 B5, 26 B6, 86 B7, 119 B14, 127 B8, 125 B15, 126 B6, et 128 B12 (produits vendus par l'Institut Pasteur).

La culture peut alors être faite sur une grande échelle et la suspension ainsi obtenue est soit répartie en ampoules buvables, scellées, soit lyophilisée et répartie en flacons ou en capsules.

Un mode d'absorption particulièrement recom-

mandé du médicament selon l'invention consiste à dissoudre, dans l'eau destinée à diluer l'ampoule buvable, un sachet renfermant un mélange de sucres aromatisés comme par exemple un mélange de lactose (0,66 g), saccharose (1,33 g) et essence d'orange (0,01 g). Le contenu du sachet apporte à la suspension de colibacilles, au moment du mélange dans le verre à boire, l'aliment nécessaire à la reproduction immédiate des germes de la culture bactérienne.

Les exemples suivants cités à titre non limitatif illustrent la présente invention. L'exemple 1 décrit un procédé de fabrication d'une composition médicamenteuse selon l'invention. Les exemples 2 à 5 montrent des applications thérapeutiques du médicament obtenu selon l'exemple 1.

Exemple 1. — On prépare le bouillon de culture de composition suivante :

Acide glutamique.....	1 000 g
Extrait aminé de levure.....	2 000 g
Gélose.....	500 g
Phosphate disodique.....	4 150 g
Phosphate monopotassique.....	350 g
Eau distillée stérile : quantité ajustée à	500 litres.

Le bouillon, dont le pH se maintient aux environs de 7,3-7,5 est ensuite passé à l'autoclave puis centrifugé et stérilisé. Après refroidissement le bouillon est ensemencé avec 500 ml d'une suspension aqueuse — préparée environ trois heures auparavant — d'une culture de colibacilles vivants non pathogènes développée sur gélose nutritive inclinée. La suspension ainsi obtenue est maintenue à 37 °C pendant environ trois heures, sous agitation et avec barbotage d'air stérile.

Au bout de ce temps, le liquide obtenu est prêt à être mis en ampoules à l'abri, évidemment, de toute trace de souillure.

Selon une variante du procédé, on peut préparer une suspension beaucoup plus riche en germes actifs de colibacilles et procéder ensuite, selon les techniques connues, à une lyophilisation.

Selon un autre mode de réalisation, le médicament, sous forme lyophilisée, est associé à un lyophilisat de bacilles lactiques ou tout autre germe normal de l'intestin humain aérobique (par exemple staphylocoques, entérocoques, subtilis...) et/ou anaérobique (par exemple bactéroïdes).

Exemple 2. — Un individu souffrant d'une diarrhée saisonnière provoquant jusqu'à 12 selles liquides par jour est traité avec le médicament de l'exemple 1 à raison de 3 ampoules buvables de 5 ml par jour (soit environ : 75 millions de germes/jour). On constate l'arrêt total de la diarrhée en quarante-huit heures.

Exemple 3. — A un malade atteint d'une diarrhée persistante consécutive à un traitement de huit jours par de la tétracycline, on a administré par jour 3 ampoules de 5 ml du médicament selon

l'exemple 1. Les selles sont normales au bout de trois jours. Trente jours après ce traitement pas de récurrence de la diarrhée.

Exemple 4. — A un malade soumis à un traitement de dix jours par du chloramphénicol à raison de 2 g par jour, on a administré simultanément 2 ampoules de 5 ml par jour du médicament susmentionné. Les selles sont restées normales et le malade n'a présenté aucun trouble ni pendant, ni après le traitement.

Exemple 5. — Afin de contrôler l'amélioration de l'efficacité d'une culture de colibacilles, préparée, selon l'invention, en milieu tamponné par rapport à une culture normale de colibacilles du type déjà connu, on a effectué des expérimentations cliniques sur deux groupes de malades.

Six malades d'un premier groupe A et dix malades d'un second groupe B ont subi un traitement par des antibiotiques, du groupe des cyclines. Après cinq jours les malades présentaient, d'une façon générale les symptômes suivants :

Selles nombreuses (4 à 8 fois par jour);

Selles liquides ou pâteuses, de couleur claire, sans odeur;

Présence dans les selles de cellulose non digérée (visible au microscope).

On instaure alors la colithérapie en faisant absorber, aux individus du groupe A, 2 ampoules/jour de 5 ml renfermant un bouillon de colibacilles de même composition que celui de l'exemple 1 mais exempt d'excipient tamponné. Les individus du groupe B sont soumis au même traitement, selon les mêmes doses, mais en utilisant le bouillon de culture tamponné selon l'invention.

Les selles des malades du groupe A redeviennent normales à partir du troisième jour et il faut continuer le traitement pendant environ six jours.

Pour les malades du groupe B, l'amélioration se fait déjà sentir dès le premier jour et trois jours de traitement sont suffisants pour régulariser complètement le transit des matières fécales.

RÉSUMÉ

L'invention a pour objets :

I. Un médicament destiné au traitement des affections liées à un déséquilibre de la flore intes-

tinale, essentiellement à base de colibacilles non pathogènes vivants antibiorésistants et d'acide aminé, caractérisé en ce qu'il renferme, dans son excipient, une ou plusieurs substances-tampons permettant de maintenir le pH entre 4 et 9, de préférence voisin de 7,4.

Le nouveau médicament peut en outre présenter les caractéristiques suivantes, prises isolément ou en combinaison :

a. Les colibacilles non pathogènes proviennent d'au moins une souche prélevée sur des selles humaines de sujet sain;

b. L'acide aminé est de préférence l'acide glutamique ou son sel de métal alcalin;

c. La substance-tampon utilisée peut être choisie parmi les composés ou associations de composés, connus en soi, susceptibles de permettre, à une dose convenablement choisie, le réglage du pH dans les limites sus-indiquées.

d. La substance-tampon peut avantageusement être constituée par un mélange de phosphate disodique et de phosphate monopotassique;

e. Le médicament selon I contient, outre les colibacilles et l'acide aminé, un extrait aminé de levure et un épaississant tel que par exemple gélose, peptine, gomme arabique, alcoylcellulose ou substances analogues;

f. Les constituants actifs du médicament selon I (a à e) sont associés à une ou plusieurs autres substances actives, en particulier d'autres germes normaux aérobies et/ou anaérobies de l'intestin, des substances permettant de protéger la paroi intestinale, des matériaux nécessaires à l'assise protéique des microorganismes, des sels métalliques, des bactériophages intestinaux, etc.

II. Un procédé de traitement d'affections liées à un déséquilibre de la flore intestinale dû, en particulier, à l'administration d'antibiotiques, par administration, au sujet malade, du médicament selon I soit sous forme de bouillon de culture, en ampoules buvables, soit sous forme lyophilisée.

LUCIEN NOUVEL

Par procuration :

Armand KOHN

AVIS DOCUMENTAIRE SUR LA NOUVEAUTÉ

Documents susceptibles de porter atteinte à la nouveauté du médicament :

— Vidal, 1963, p. 1287, « Normaflore ».

Le présent avis a été établi après les observations présentées par le titulaire du brevet et l'opposition des tiers.