

①9 RÉPUBLIQUE FRANÇAISE
—
INSTITUT NATIONAL
DE LA PROPRIÉTÉ INDUSTRIELLE
—
COURBEVOIE
—

①1 N° de publication : **3 045 384**

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

②1 N° d'enregistrement national : **15 62836**

⑤1 Int Cl⁸ : **A 61 K 35/74** (2016.01), A 61 K 35/24, A 61 K 35/38,
A 61 P 1/00, A 61 P 31/04

⑫

BREVET D'INVENTION

B1

⑤4 COMPOSITION LYOPHILISÉE POUR LA CONSERVATION DE MICROBIOTE DANS SON ECOSYSTEME.

②2 Date de dépôt : 18.12.15.

③0 Priorité :

④3 Date de mise à la disposition du public
de la demande : 23.06.17 Bulletin 17/25.

④5 Date de la mise à disposition du public du
brevet d'invention : 07.02.20 Bulletin 20/06.

⑤6 Liste des documents cités dans le rapport de
recherche :

Se reporter à la fin du présent fascicule

⑥0 Références à d'autres documents nationaux
apparentés :

Demande(s) d'extension :

⑦1 Demandeur(s) : *INSTITUT NATIONAL DE LA
RECHERCHE AGRONOMIQUE Société anonyme —
FR, UNIVERSITE PARIS DESCARTES Etablissement
public FR, UNIVERSITE PARIS DIDEROT - PARIS 7
FR et ASSISTANCE PUBLIQUE - HOPITAUX DE
PARIS Etablissement public — FR.*

⑦2 Inventeur(s) : *KAPEL NATHALIE, WALIGORA-
DUPRIET ANNE-JUDITH, THOMAS MURIEL,
CHARRUEAU CHRISTINE, JOLY FRANCISCA,
MAYEUR CAMILLE, ROBERT VERONIQUE et
DELANNOY JOHANNE.*

⑦3 Titulaire(s) : *INSTITUT NATIONAL DE LA
RECHERCHE AGRONOMIQUE Société anonyme,
UNIVERSITE PARIS DESCARTES Etablissement
public, UNIVERSITE PARIS DIDEROT - PARIS 7,
ASSISTANCE PUBLIQUE - HOPITAUX DE PARIS
Etablissement public.*

⑦4 Mandataire(s) : *GEVERS & ORES.*

FR 3 045 384 - B1



COMPOSITION LYOPHILISEE POUR LA CONSERVATION DE MICROBIOTE DANS SON ECOSYSTEME

La présente invention a trait au domaine de la conservation sous forme d'un lyophilisat d'un microbiote dans son écosystème (MDSE). Plus particulièrement, elle concerne une composition lyophilisée de selles permettant la conservation jusqu'à plusieurs mois du microbiote fécal en vue d'une transplantation chez un individu. L'invention concerne également l'utilisation thérapeutique chez l'homme ou l'animal d'une telle composition, notamment sous forme de gélules.

De nombreuses études montrent l'intérêt de la transplantation de microbiote fécal (TMF) pour la prise en charge thérapeutique de certaines pathologies impliquant un déséquilibre du microbiote fécal au sein de son écosystème, appelé dysbiose, telles que par exemple les infections à *Clostridium difficile* et leurs récurrences (Van Nood E. *et al.*, 2013). La TMF dispose déjà d'un niveau de preuve clinique élevé de sorte que le recours à cette technique pour cette indication figure dans les plus récentes recommandations, tant européennes (Debast SB. *et al.*, 2014) que nord-américaines (Surawicz CM. *et al.*, 2013). L'application de cette technique à d'autres contextes pathologiques de dysbiose, comme les maladies inflammatoires de l'intestin, le syndrome du côlon irritable, le syndrome métabolique, l'obésité, le diabète, les bactéries multirésistantes, voire les troubles du développement neurologique, dont les étiologies sont incertaines ou inconnues, est également envisagée (Vrieze A. *et al.*, 2013, Kelly CR. *et al.*, 2015).

Malgré un engouement très fort depuis quelques années de la part de la communauté médicale et l'émergence récente de demandes des patients, il n'existe pas aujourd'hui de procédure standardisée pour la réalisation de la TMF, que ce soit pour la sélection du donneur, le mode de préparation des selles ou la voie d'administration.

D'une manière générale, le donneur est sélectionné sur la base d'un examen clinique et du dépistage d'un panel important d'agents pathogènes comme les bactéries, les virus ou les parasites, réalisés en amont du don. Le résultat est un taux de validation des donneurs potentiels inférieurs à 20% (Borody T. *et al.*, 2015). Ceci, ajouté au délai d'obtention des résultats de la recherche d'agents pathogènes limite fortement la réalisation de dons exploitables.

Les modalités d'administration d'une TMF sont diverses. Le microbiote fécal peut être administré par sonde nasogastrique ou nasoduodénale, au cours d'une coloscopie ou encore par lavement rectal (Kelly CR. *et al.*, 2015), chacune de ces méthodes présentant ses propres avantages et inconvénients. La voie nasogastrique ou nasoduodénale, par exemple, peut être mal perçue par l'individu à traiter, avec un risque de vomissement, voire d'aspiration et peut nécessiter un contrôle radiologique lors de la mise en place de la sonde. La voie colique présente

l'intérêt de permettre l'observation de la muqueuse en même temps que l'administration mais elle présente des facteurs de morbidité et un coût significatifs. Enfin, la voie du lavement rectal est la plus facile à mettre en œuvre et la moins coûteuse mais il peut être difficile pour l'individu à traiter d'assurer la rétention du matériel administré. Ces méthodes sont basées sur
5 l'administration de matériel fécal dans les 6h suivant l'émission, tel que recommandé actuellement en France par le Groupe Français de Transplantation Fécale dans le cadre des colites à *Clostridium difficile* (Sokol H. *et al.*, 2015) et par l'ANSM pour les essais cliniques (ANSM, 2015). A ces difficultés s'ajoutent des réticences de la part des patients liées aux caractères organoleptiques de la préparation.

10 Pour faciliter l'accès au don, des préparations fécales conservées congelées à -80°C et donc immédiatement disponibles sont proposées. Leur efficacité est similaire à celle observée pour les transplantations utilisant du matériel frais (Hamilton MJ. *et al.*, 2012 ; Youngster I. *et al.*, 2014a). Ces préparations congelées nécessitent la réalisation d'une dilution au sein d'une solution contenant un cryoprotecteur pour protéger le microbiote des effets de la congélation. Le seul
15 cryoprotecteur décrit dans la littérature pour la congélation des selles en vue de leur transplantation est le glycérol à la concentration de 10%. L'efficacité de la transplantation réalisée avec ces préparations congelées contenant du glycérol est maintenue jusqu'à 5 mois post-préparation (Youngster I. *et al.*, 2014a). L'utilisation de gélules remplies avec ce matériel et conservées à -80°C a été rapportée avec des résultats satisfaisants (Youngster I. *et al.*, 2014b). Ce
20 type de préparation ouvre donc de nouvelles perspectives pour une approche galénique facilitant l'administration chez l'individu à traiter, en particulier le patient. Cependant, en l'état actuel, elle implique une production encore très empirique et nécessite une conservation à -80°C à laquelle sont liés des problèmes de stockage. De plus, elle nécessite d'administrer au patient des volumes importants, qu'il s'agisse de la dilution fécale en cas d'administration par sonde nasogastrique ou
25 nasoduodénale, coloscopie ou lavement, ou des gélules congelées, ce qui est contraignant.

Il existe donc un besoin non satisfait de disposer de préparations de selles dont la préparation et le stockage seraient facilités tout en maintenant les qualités initiales du microbiote fécal pendant la durée de conservation et qui seraient disponibles sous une forme galénique permettant l'administration par une voie d'abord aisée et non invasive d'un volume réduit.

30 Dans ce contexte, les inventeurs ont maintenant développé une composition lyophilisée comprenant des selles diluées dans un mélange optimisé de cryoprotecteurs dans le but de faciliter la production de préparations fécales, leur disponibilité et leur conservation à long terme, tout en améliorant l'acceptabilité et le confort des individus à traiter.

La lyophilisation est un procédé de conservation utilisé dans l'industrie pharmaceutique pour la préservation des souches bactériennes. La lyophilisation doit être réalisée dans des conditions optimales pour assurer le maintien de la viabilité ainsi que l'équilibre des différents genres bactériens, notamment dans le cas de mélanges complexes comme c'est le cas pour le MDSE en général et les selles en particulier. L'utilisation de cryoprotecteurs appropriés permet d'assurer la survie complète ou au moins partielle, des bactéries lors d'une congélation.

On distingue trois catégories de molécules cryoprotectrices vis-à-vis des organismes vivants, notamment des bactéries :

- les molécules de haute masse moléculaire demeurant en milieu extracellulaire tels les protéines et les polysaccharides qui facilitent l'efflux aqueux à partir des cellules pendant la phase de congélation, limitant ainsi la formation de cristaux de glace intracellulaires. En augmentant la viscosité du milieu extracellulaire, ces molécules réduisent également la croissance cristalline ;

- les molécules capables de traverser la paroi cellulaire comme les acides aminés et les oligosaccharides ;

- les molécules pénétrant la paroi cellulaire et la membrane cytoplasmique tels le DMSO et le glycérol (Carvalho A.S. *et al.*, 2004).

Les agents pénétrants des seconde et troisième catégories limitent la déshydratation cellulaire et abaissent la température de congélation à l'intérieur de la cellule, réduisant ainsi la concentration saline et diminuant le choc osmotique (Béal C. *et al.*, 2015).

Afin d'optimiser la conservation des organismes vivants constitutifs du microbiote fécal, les inventeurs ont évalué plusieurs cryoprotecteurs, isolés ou en association. Le glycérol à 10% classiquement utilisé pour les TMF réalisées avec du matériel congelé (Hamilton MJ. *et al.*, 2012 ; Youngster I. *et al.*, 2014a) apparaît non adapté à la réalisation de lyophilisat. Parmi les cryoprotecteurs testés, deux se sont révélés prometteurs : la maltodextrine et le tréhalose. Si le tréhalose donne des résultats performants, les résultats obtenus avec un mélange maltodextrine / tréhalose sont encore meilleurs aussi bien pour le maintien de la viabilité du microbiote (Figure 4) que pour le maintien de sa diversité (Figures 5 et 6). Le maintien de la diversité est en particulier très important du fait que la TMF a justement pour but de rétablir l'équilibre entre les différentes populations présentes dans l'écosystème intestinal de l'individu bénéficiaire. Les effets protecteurs du mélange maltodextrine / tréhalose vis-à-vis du microbiote sont observés pendant au moins 3 mois et jusqu'à 7 mois après lyophilisation. Le mélange maltodextrine / tréhalose est également plus favorable au maintien de la viabilité des bactéries extrêmement sensibles à l'oxygène (EOS) telles que les bactéries du groupe *Clostridium leptum*.

Ainsi, l'invention concerne l'utilisation d'un mélange de cryoprotecteurs maltodextrine / tréhalose pour la préservation sous forme lyophilisée d'un microbiote dans son écosystème.

5 Par « microbiote dans son écosystème » ou MDSE, on entend un microbiote dont la composition est non modifiée par rapport à celle existante à l'état naturel dans l'organisme. Le microbiote et son écosystème constituent un mélange complexe et riche, constitué notamment de bactéries, champignons, virus, bactériophages mais aussi de débris cellulaires, de nombreux peptides et protéines sécrétés par les entérocytes et cellules de la *lamina propria* tels les IgA sécrétoires, la calprotectine, les cytokines et autres peptides anti-inflammatoires ou antimicrobiens type défensines...), de produits bactériens sécrétés ou non, incluant des
10 métabolites tels que les acides gras à chaîne courte, les bactériocines, et toutes les autres molécules biologiquement actives produites par les bactéries ou d'autres microorganismes du microbiote, de mucus, de composés glucidiques type mono et polysaccharides, d'oligoéléments... Le MDSE constitue donc une matrice complexe que l'on peut qualifier de vivant dans lequel de nombreuses interactions moléculaires et cellulaires se produisent.

15 Les MDSE peuvent être conservés sous forme lyophilisée en utilisant un mélange maltodextrine / tréhalose selon l'invention. A titre d'exemples, les MDSE pouvant être conservés selon cette méthode sont le microbiote intestinal anciennement appelé flore intestinale, le microbiote fécal contenu dans les selles et le microbiote vaginal anciennement appelé flore vaginale. Chacun de ces microbiotes est caractérisé par des groupes de bactéries dominantes bien
20 connus de l'homme du métier.

Dans un mode de réalisation préféré, le MDSE à préserver consiste en des selles.

Par « lyophilisation », on entend, au sens de l'invention, le procédé consistant à éliminer l'eau d'un produit à l'aide de la congélation puis d'une évaporation sous vide de la glace sans la faire fondre. Cette technique est bien connue de l'homme du métier. On distingue trois phases
25 majeures dans un cycle de lyophilisation :

- la congélation, où les produits sont réfrigérés à des températures de l'ordre de -20 °C à -80 °C ; l'eau se transforme alors en glace ;
- la dessiccation primaire, sous vide, qui consiste à sublimer la glace libre interstitielle ;
- la dessiccation secondaire, qui permet d'extraire par désorption les molécules d'eau
30 piégées à la surface des produits séchés.

Par « selles », on entend, au sens de l'invention, les matières obtenues après les phases de digestion et d'absorption des aliments et leur transit dans le tractus intestinal. Elles sont normalement constituées d'eau à 75-85% et de matières sèches à 15-25% [cellules intestinales

desquamées et cellules immunitaires issues de la *lamina propria* avec leurs produits de d'excrétion/sécrétion à type d'IgA sécrétoires, calprotectine, cytokines et autres peptides anti-inflammatoires ou antimicrobiens..... éléments constitutifs de microbiote (bactéries, virus, champignons, bactériophages) et les produits bactériens sécrétés ou non, incluant des
5 métabolites tels que les acides gras à chaîne courte, les bactériocines, et toutes les autres molécules biologiquement actives produites par les bactéries ou d'autres microorganismes du microbiote ; mucus ; débris cellulaires dont les fibres et la cellulose qui proviennent de la partie non digestible des végétaux, lipides, fer, oligoéléments.....]. Les selles représentent, au sens de l'invention, des selles fraîchement produites par un individu en bonne santé. La sélection des
10 donneurs chez les humains et la préparation de selles peuvent être réalisées selon le protocole et les conditions définis dans les recommandations du Groupe Français de Transplantation Fécale (Sokol *et al.*, 2015), dans l'article intitulé « Practical implementation of faecal transplantation » de Kapel N. *et al.*, 2014 et dans les recommandations de l'ANSM (2015).

Dans le mélange de cryoprotecteurs utilisé pour préserver sous forme lyophilisée selon
15 l'invention, la maltodextrine est utilisée avec le tréhalose dans un rapport pouvant varier de 10/90 à 90/10, de préférence entre 30/70 et 50/50, encore préférentiellement entre 35/65 et 45/55, et de manière préférée dans un rapport de 40/60.

Selon un mode de réalisation préféré de l'invention, les cryoprotecteurs présents dans le mélange sont exclusivement la maltodextrine et le tréhalose.

20 Selon un autre mode de réalisation de l'invention, les cryoprotecteurs présents dans le mélange incluent la maltodextrine et le tréhalose ainsi qu'au moins un autre cryoprotecteur choisi parmi le mannitol, le sorbitol, le fructose, le glucose, le maltose, le saccharose, la gélatine, l'amidon, le sérum de veau fœtal et le lait.

25 Un autre objet de l'invention concerne une composition lyophilisée comprenant un microbiote dans son écosystème et un mélange de cryoprotecteurs, ledit mélange de cryoprotecteurs comprenant de la maltodextrine et du tréhalose, utilisés dans un rapport pouvant varier de 10/90 à 90/10, de préférence entre 30/70 et 50/50, encore préférentiellement entre 35/65 et 45/55, et de manière préférée dans un rapport de 40/60.

30 La maltodextrine est un cryoprotecteur polysaccharidique non pénétrant dans les parois cellulaires tandis que le tréhalose est un cryoprotecteur oligosaccharidique pénétrant les parois cellulaires.

Dans la composition de la présente invention, la maltodextrine est utilisée avec le tréhalose dans un rapport pouvant varier de 10/90 à 10/90, de préférence entre 30/70 et 50/50,

encore préférentiellement entre 35/65 et 45/55, et de manière préférée dans un rapport de 40/60.

Selon un mode de réalisation préféré de l'invention, les cryoprotecteurs présents dans la composition sont exclusivement la maltodextrine et le tréhalose.

5 Selon un autre mode de réalisation de l'invention, les cryoprotecteurs présents dans la composition incluent la maltodextrine et le tréhalose ainsi qu'au moins un autre cryoprotecteur choisi parmi le mannitol, le sorbitol, le fructose, le glucose, le maltose, le saccharose, la gélatine, l'amidon, le sérum de veau fœtal et le lait.

10 La composition selon l'invention contient un mélange de MDSE et de cryoprotecteurs dans un rapport de 15 à 35% et de 85 à 65% respectivement, de préférence dans un rapport de 18 à 28% et de 82 à 72%. Ce rapport peut varier en fonction de différents paramètres, notamment le degré d'hydratation de l'échantillon ainsi que sa teneur en lipides, en fibres et en débris cellulaires qui peuvent varier, notamment dans le cas des selles. L'homme du métier saura adapter ce rapport afin d'optimiser la composition à lyophiliser.

15 Ainsi, les inventeurs ont mis en évidence que la lyophilisation d'une composition comprenant des selles et un mélange de cryoprotecteurs, comprenant de la maltodextrine et du tréhalose, permet de conserver la viabilité et la biodiversité du microbiote fécal sur une période prolongée.

20 Par « viabilité du microbiote fécal », on entend, au sens de l'invention, la part du microbiote fécal qui est vivant.

Par « biodiversité du microbiote fécal », on entend, au sens de l'invention, le maintien des populations constituantes pouvant être évalué par la stabilité de groupes de micro-organismes représentatifs au sein du microbiote.

25 Dans un mode de réalisation préféré, la présente invention a pour objet une composition lyophilisée comprenant des selles et un mélange de cryoprotecteurs comprenant la maltodextrine et le tréhalose.

Dans un mode de réalisation préféré dans lequel le MDSE consiste en des selles, lesdites selles représentent 15 à 35% de la composition, par rapport aux cryoprotecteurs.

30 En plus d'assurer le maintien de la charge bactérienne, de sa viabilité et de sa diversité en préservant l'équilibre entre les groupes bactériens dominants appartenant aux phylum des Firmicutes et des Bacteroidetes, la composition selon l'invention présente un avantage sérieux par rapport aux mélanges de souches bactériennes (Allen-Vercoe E. *et al.*, 2013). En effet, la

composition de selles selon l'invention permet de conserver le microbiote fécal dans son écosystème naturel d'origine. Les interactions entre les différents constituants de cette matière complexe sont ainsi préservées et l'individu qui reçoit la TMF bénéficie alors des mêmes avantages que lors d'une transplantation de selles fraîches.

5 Par "écosystème fécal", on entend, au sens de l'invention, tout ce qui compose les selles, c'est-à-dire, non seulement les bactéries, virus, champignons et bactériophages mais aussi les produits bactériens sécrétés ou non, incluant des métabolites tels que les acides gras à chaîne courte, les bactériocines, et toutes les autres molécules biologiquement actives produite par les bactéries ou d'autres microorganisme du microbiote ainsi que les cellules intestinales
10 desquamées ou en apoptose (entérocytes, cellules immunitaires de la *lamina propria*) et leurs produits d'excrétion/sécrétion (IgA sécrétoires, calprotectine, cytokines et autres peptides anti-inflammatoires ou antimicrobiens...), les éléments glucidiques mono- et polysaccharidiques tels les fibres et la cellulose qui proviennent de la partie non digestible des végétaux, résidus protéiques et lipidiques, oligoéléments, le mucus...

15 La composition de l'invention est particulièrement adaptée à une administration orale.

Elle peut, par exemple, se présenter sous la forme d'une gélule ou d'un comprimé gastro-résistant, de granulés ne nécessitant pas de réhydratation ou d'un spray, en fonction de l'individu à traiter.

20 Selon un mode de réalisation particulier de l'invention, la composition se présente sous forme d'une gélule ou d'un comprimé gastro-résistant. Cette présentation est particulièrement adaptée à une administration chez l'homme. Par « gélule ou comprimé gastro-résistant », on entend, au sens de l'invention, une forme galénique orale résistante aux sucs gastriques et entérosoluble.

25 Ces formulations peuvent en outre contenir un véhicule pharmaceutiquement acceptable afin de rendre la composition appropriée pour une administration chez le sujet à traiter. Ce véhicule est de préférence inerte, et dans tous les cas, de nature à maintenir la viabilité et la diversité du microbiote au sein de son écosystème et à libérer la composition au site approprié.

Ainsi, la présente invention a également pour objet une gélule gastro-résistante comprenant la composition telle que définie précédemment.

30 Dans ce contexte, le développement de gélules gastro-résistantes préparées à partir d'une composition lyophilisée constitue un progrès certain en termes de caractéristiques organoleptiques de la préparation, de disponibilité du matériel à transplanter, de conservation de la préparation et de confort de l'individu à traiter.

La lyophilisation permet d'éliminer l'eau présente dans les selles. En effet, les selles normales contiennent entre 75 et 85% d'eau. Après lyophilisation, 50g de selles correspondent environ à 7,5-12,5g de microbiote lyophilisé auxquels s'ajoutent les cryoprotecteurs.

Comparativement à l'administration de selles selon les modalités classiques, qu'il s'agisse
5 de selles fraîches ou de selles congelées, l'administration sous forme d'un lyophilisat pouvant être inclus dans des gélules gastro-résistantes facilite donc la standardisation de la préparation et son acceptabilité par l'individu à traiter. Ainsi, la morbidité devrait être diminuée et le coût de réalisation réduit quand l'administration sous forme d'un lyophilisat sera bien établie dans la pratique médicale. En effet l'administration de la TMF sous forme d'une préparation lyophilisée
10 ne sera plus associée à des gestes techniques requérant un personnel spécialisé et nécessitant une hospitalisation de jour, comme c'est le cas actuellement pour l'administration par voie naso-duodénale, coloscopique ou rectal de de préparation issues de selles fraîches ou congelées. Comparativement à l'administration de gélules congelées, l'administration sous forme d'un lyophilisat facilitera le processus de fabrication et de stockage, et donc la standardisation de la
15 préparation. En outre, l'utilisation de préparations lyophilisées permet une accessibilité améliorée du matériel nécessaire aux TMF, point crucial pour répondre aux situations d'urgence pouvant être rencontrées, par exemple, dans le cadre de récurrences d'infection à *Clostridium difficile*.

Ainsi, la présente invention a également pour objet une méthode de conservation de selles par lyophilisation comprenant l'utilisation d'un mélange de cryoprotecteurs tel que défini
20 précédemment. Cette méthode permet de conserver les selles lyophilisées au minimum pendant 3 mois et pour une période pouvant aller jusqu'à 7 mois, voire au-delà en assurant le maintien de la viabilité et de la diversité du microbiote comme décrit précédemment.

Les selles conservées lyophilisées selon l'invention peuvent être administrées dans le cadre d'une TMF allogénique ou autologue. En effet, la TMF peut consister en un transfert de
25 selles entre deux individus de la même espèce ou une administration à un individu donneur sain à un temps t et devenu individu à traiter à un temps t+1. Ainsi, un individu en bonne santé pourra disposer ultérieurement de la composition lyophilisée comprenant une préparation de selles issue de son don, au moment où il en aura besoin.

La présente invention a pour autre objet une composition telle que définie
30 précédemment pour son utilisation comme médicament.

La présente invention se rapporte ainsi à la composition ou à la gélule gastro-résistante précédemment décrite pour son utilisation dans le traitement d'une maladie ou d'un trouble lié à un déséquilibre du microbiote intestinal.

En effet, le microbiote intestinal constitue un écosystème en équilibre et qui s'autorégule en permanence. Cet équilibre est sous la menace d'agressions pouvant conduire à sa rupture. La dysbiose se définit comme une perte de diversité ou un déséquilibre du microbiote qui peut résulter de l'excès de micro-organismes délétères et/ou de l'insuffisance relative de micro-organismes bénéfiques à l'hôte. Ainsi, les indications, pour l'utilisation de la composition selon l'invention sont celles qui sont associées à une dysbiose. A ce titre, on peut citer en tant que « maladie ou trouble lié à un déséquilibre du microbiote intestinal », la colite à *Clostridium difficile* et ses récurrences, les maladies inflammatoires chroniques de l'intestin telles que la maladie de Crohn et la rectocolite hémorragique, le syndrome de l'intestin irritable, le portage de bactéries multirésistantes, la constipation, la diarrhée du voyageur les infections digestives les maladies auto-immunes, la diverticulose, le diabète de type 1 et de type 2, le syndrome métabolique, l'obésité, la polyarthrite rhumatoïde, la spondylarthrite ankylosante et les sacroilites, le syndrome de fatigue chronique, l'halitose, l'allergie, l'acné, les insomnies, les dépressions et des maladies neuropsychiatriques telles que par exemple, la maladie de Parkinson et l'autisme.

De manière préférée, la composition de l'invention est utilisée dans le traitement de la colite à *Clostridium difficile*, des maladies inflammatoires chroniques intestinales, du portage des bactéries multirésistantes, du diabète de type 1 et de type 2, du syndrome métabolique, de l'obésité et de l'autisme.

La composition ou la gélule gastro-résistante selon l'invention peut en outre être utilisée en relai d'un traitement antibiotique oral, tel que le métronidazole ou la vancomycine (traitement de première intention dans les infections à *Clostridium difficile*) en particulier pour le traitement des récurrences de colite à *Clostridium difficile*, où les individus sont devenus insensibles à un traitement répété par antibiotiques.

Une composition de selles lyophilisées selon l'invention est destinée à être administrée à un humain ou un animal.

Dans un contexte où les plans d'action sur l'antibiothérapie visant à limiter le risque de développement des bactéries multi-résistantes se développent, l'utilisation d'une telle composition lyophilisée constitue une alternative de choix en médecine vétérinaire, en particulier dans les élevages biologiques. Ainsi, la composition lyophilisée selon l'invention peut être utilisée chez l'humain, mais aussi chez les animaux tels que le porc, le bœuf, le poulet, le chien, le chat, le cheval, les oiseaux et les reptiles. La TMF étant une méthode utilisée de manière empirique depuis longtemps et en développement en médecine vétérinaire, l'administration de selles sous forme lyophilisée est à l'évidence de nature à faciliter sa mise en œuvre.

Pour faciliter une administration chez l'animal, une composition lyophilisée de MDSE peut être préparée sous la forme de granulés ne nécessitant pas de réhydratation ou de spray. L'homme du métier saura adapter la forme galénique de sorte à la rendre la plus appropriée possible en fonction de l'animal à traiter.

5 Un autre objet de la présente invention concerne un procédé de préparation d'une composition lyophilisée selon l'invention, comprenant les étapes suivantes :

- recueil du MDSE, en particulier de selles;
- dilution du MDSE avec un mélange de cryoprotecteurs tel que défini précédemment ;
- lyophilisation du mélange obtenu à l'étape précédente et obtention de la composition

10 lyophilisée.

Selon un mode de réalisation particulier, la lyophilisation peut être réalisée en appliquant une température de congélation allant de -20°C à -80°C, pendant une durée allant de plusieurs dizaines de minutes à plusieurs heures. Dans un mode de réalisation préférée, l'étape de congélation est réalisée à -80°C pendant 30 min. L'homme du métier saura adapter ces

15 conditions.

Dans un mode de réalisation particulier, la présente invention a trait à un procédé de préparation d'une gélule gastro-résistante comprenant une composition lyophilisée selon l'invention, comprenant les étapes suivantes:

- préparation d'une composition lyophilisée ;
- 20 - remplissage de l'enveloppe de la gélule gastro-résistante avec ledit mélange lyophilisé ;
- éventuellement ajout d'un ou de plusieurs excipients pulvérulents facilitant l'écoulement du lyophilisat pour un bon remplissage de la gélule ;
- mise en gélule.

Des modes de réalisation particuliers sont décrits dans les exemples qui suivent. Ils ont

25 pour seul objectif d'illustrer l'invention et de permettre sa compréhension et ne doivent en aucun cas être considérés comme limitatifs.

DESCRIPTION DES FIGURES

Figure 1: Représentation des principaux groupes bactériens et levures retrouvés après culture

30 dans les selles natives et après dilution en NaCl 9‰ ou dans le mélange de cryoprotecteurs maltodextrine à 6,7% / tréhalose à 10% (MT). Les résultats présentés sont ceux de la selle 3.

Figure 2: Représentation de la charge bactérienne viable après reconstitution du lyophilisat en fonction de la nature du cryoprotecteur : maltodextrine 5% (M), tréhalose à 5% (T5), tréhalose à 10% (T10), mélange maltodextrine à 6,7% / tréhalose à 10% (MT) ou lait (L).

5 **Figure 3:** Représentation de l'évolution de la charge bactérienne au cours du temps en fonction de la nature du cryoprotecteurs : tréhalose à 5% (T5), tréhalose à 10% (T10) et mélange maltodextrine 6,7%/tréhalose à 10% (MT). J0 représente la pré-lyophilisation ; M0, la post-lyophilisation ; M4, 4 mois post-lyophilisation et M7, 7 mois post-lyophilisation.

10 **Figure 4:** Représentation du pourcentage d'EOS à M0 en fonction de la nature du cryoprotecteur : maltodextrine à 5% (M), tréhalose à 5% (T5), tréhalose à 10% (T10), mélange maltodextrine à 6,7% / tréhalose à 10% (MT). J0 représente la pré-lyophilisation ; M0, la post-lyophilisation.

Figure 5: Représentation des principaux groupes bactériens retrouvés dans la selle native et dans les lyophilisats immédiatement après préparation (M0) en fonction de la nature du cryoprotecteur utilisé : tréhalose à 5% (T5), tréhalose à 10% (T10) et mélange maltodextrine à 6,7% / tréhalose à 10% (MT). Les résultats présentés sont ceux de la selle 3.

15 **Figure 6:** Représentation des principaux groupes bactériens retrouvés dans la selle native et dans les lyophilisats après préparation en fonction de la nature du cryoprotecteur utilisé : tréhalose à 5% (T5), tréhalose à 10% (T10) et mélange maltodextrine à 6,7%/tréhalose à 10% (MT). Les résultats sont présentés immédiatement après lyophilisation et après stockage à 4°C pendant 3 mois (+3) et 8 mois (+8) . Les résultats présentés sont ceux de la selle 3.

20

EXEMPLES

1. Matériels et Méthodes

1.1. Prélèvements fécaux

25 La sélection des conditions de lyophilisation a été réalisée à partir de l'étude de 3 selles provenant de volontaires sains indépendants et placées immédiatement après émission en présence d'un système GENbagAnaer® mis dans le pot de prélèvement pour incubation. La transmission au laboratoire a été réalisée immédiatement après émission, dans un délai inférieur à 1 heure. Une fraction de chaque selle est conservée sous GENbagAnaer® comme témoin pour analyse immédiate.

30 1.2. Choix des cryoprotecteurs

Les cryoprotecteurs utilisés pour cette étude sont les suivants :

- le glycérol à 10% (G).
- le lait écrémé et pasteurisé en poudre reconstitué à 10% (L).

- la maltodextrine, à la concentration de 5% (M).
 - le tréhalose, aux concentrations de 5% (T5) et 10% (T10).
 - le mélange constitué de maltodextrine à une concentration de 6,7% et de Tréhalose à une concentration de 10%, soit dans un rapport 40/60(MT).
- 5 - une solution de NaCl à une concentration de 9‰, utilisée en tant que contrôle car habituellement employée pour diluer le matériel fécal frais.
- Chaque solution a été conditionnée en pots stériles et conservée à +4°C jusqu'à utilisation.

1.3. Préparation du lyophilisat fécal

10 Les selles ont été diluées 10 fois dans la solution de cryoprotection et homogénéisées à l'aide d'un homogénéiseur de type Ultraturax® équipé d'une tige à usage unique. Les suspensions ont été déposées dans des flacons à lyophilisation sous un volume de 3 ml correspondant à 300 mg de selle native.

15 Pour chaque condition testée, et pour chacune des 3 selles analysées, un flacon de suspension a été immédiatement placé en présence d'un système GENbagAnaer® afin d'évaluer l'effet des différents cryoprotecteurs sur la viabilité des bactéries du microbiote de chaque selle diluée et non lyophilisée.

20 Les flacons restants sont placés immédiatement à -80°C. Après 30 minutes de congélation, les flacons sont placés dans le lyophilisateur (FreeZone® 6 Liter, Freeze Dry System, Model 77530, Labconco Corporation, Kansas City, MO, USA) dont le piège est déjà refroidi pour une durée de 24h sous cycle automatique. A l'issue de cette période de lyophilisation, les flacons sont bouchés sous vide puis sertis à l'aide de capsules en aluminium.

25 Pour chaque selle et chaque condition de cryoconservation, une série de flacons est transmise au laboratoire de microbiologie pour analyse du microbiote et 2 séries sont conservées à 4°C pour des études de stabilité à 3-4 mois et 7-8 mois.

1.4. Etudes *in vitro* de la viabilité du microbiote en fonction des conditions de lyophilisation

30 La première étape de l'étude microbiologique a porté sur l'analyse des selles diluées non lyophilisées pour tester l'effet de la dilution en présence des différents cryoprotecteurs sur le maintien de la diversité du microbiote et de sa viabilité. Pour cela, une aliquote des dilutions réalisées en milieu Lait à 10% (L), glycérol 10% (G), maltodextrine 5% (M), tréhalose 5% (T), tréhalose 10% (T10) et mélange maltodextrine 6,7% et de tréhalose 10%, soit un rapport 40/60 (MT) a été placée immédiatement après la préparation du lyophilisat fécal sous anaérobiose et les cultures microbiennes ont été réalisées immédiatement.

La deuxième étape du travail a porté sur l'étude des lyophilisats. Les analyses ont été réalisées dans la semaine suivant la préparation puis après 3-4 mois et 7-8 mois de stockage à 4°C. Chaque lyophilisat est reconstitué avec 3 ml d'eau stérile peptonée, ce qui correspond au volume de selle diluée présent initialement dans chaque flacon.

- 5 Pour l'analyse du microbiote aérobie et anaérobie strict, les selles non lyophilisées et les lyophilisats reconstitués ont été dilués de 10 en 10 et ensemencés sur différents milieux sélectifs et non sélectifs (Rougé *et al.*, 2010). Les milieux incubés en aérobie et en cabinet anaérobie (N₂/CO₂/H₂ :80/10/10) à 37°C sont indiqués dans le tableau 1.

10 Tableau 1 : Milieux utilisés pour l'analyse du microbiote par culture

Eléments du microbiote recherchés	Base gélosée	Incubation/lecture
Anaérobies totales	Colombia + cystéine (Cc) + sang + néomycine (100 mg/ml)	37°C Cabinet anaérobie Lecture et dénombrement à 48h et 5 jours
<i>Bacteroidessp.</i> , <i>Prevotellasp.</i>	Cc + sang + kanamycine (100 mg/ml) + vancomycine (7 mg/ml)	
<i>Clostridium difficile</i>	Cc + sang + mélange <i>Clostridium difficile</i> (CLO-M Biomérieux)	
Autres <i>Clostridium</i>	CC + mupirocine (100 mg/ml) + lait entier (5ml) + rouge neutre (40 mg/ml)	
<i>Bifidobacteriumsp.</i>	WCB (Wilkins-Chalgren for Bifidobacteria) + mupirocine (100 mg/ml)	
<i>Lactobacillussp.</i>	MRS (Gélose de Man, Rosaga, Sharpe)	
Aérobies totales	Trypcase soja	
Entérobactéries	Drigalski	
<i>Enterococcussp.</i>	Enterococcosel	
<i>Staphylococcussp.</i>	Chapman 110	
Levures	Sabouraud Chloramphenicol	

- 15 La quantification des bactéries extrêmement sensibles à l'oxygène (EOS) telles que les bactéries du groupe *Clostridium leptum*, a été réalisée par culture différentielle en présence ou absence d'oxygène. Pour cela, les échantillons de la selle fraîche (T0) et les différents échantillons lyophilisés réhydratés dans l'eau peptonée ont été successivement dilués dans un milieu de

culture très riche non sélectif (YBHI (milieu cœur-cerveille enrichi en extrait de levure) complété en cellobiose, maltose et cystéine). Ce milieu a été mis au point pour permettre la culture de bactéries extrêmement difficiles à cultiver de type *Faecalibacterium prausnitzii*. Une fois des dilutions *ad hoc* effectuées en anaérobiose stricte, leur capacité à résister ou non à la présence d'oxygène a été évaluée par culture sur 2 boîtes en parallèle, une étant soumise à une atmosphère aérobie pendant 60 minutes et l'autre non. Cette méthode, permet d'évaluer le pourcentage de bactéries viables anaérobies strictes au sein des différents échantillons, à différents temps après la lyophilisation.

10 2. Résultats

2.1. Effet des différents cryoprotecteurs sur la diversité et la viabilité du microbiote avant lyophilisation.

Une dilution de la selle dans les différents cryoprotecteurs évalués, et notamment le mélange d'intérêt MT, n'a pas eu d'impact significatif sur la charge bactérienne, ni sur l'équilibre des principaux genres cultivables du microbiote, comparativement à la selle native ou à la selle diluée en NaCl à 9‰ (correspondant à la préparation utilisée pour la TMF avec selles fraîches) (Figure 1). Les groupes majoritaires du microbiote restent viables.

2.2. Effet de la lyophilisation sur la viabilité du microbiote en fonction des cryoprotecteurs utilisés

La charge bactérienne totale a été évaluée dans la semaine suivant la lyophilisation, soit à M0. Les résultats sont présentés sur la Figure 2. Les trois cryoprotecteurs testés, à savoir une solution de tréhalose à 5% (T5), une solution de tréhalose à 10% (T10) et un mélange maltodextrine 6,7% / tréhalose 10% (TM) permettent d'assurer une stabilité supérieure à 90% de la charge bactérienne totale des espèces cultivables lors de la lyophilisation ; ce résultat correspond à une perte d'environ 1 log par rapport à la charge existante dans une selle native ou une selle diluée en NaCl à 9‰ avant lyophilisation.

Cette charge bactérienne totale, mesurée jusqu'à 7 mois post-lyophilisation a peu évolué (Figure 3).

De plus, ces 3 cryoprotecteurs permettent une préservation efficace des bactéries EOS lors de la lyophilisation (Figure 4).

2.3. Effet de la lyophilisation sur la diversité du microbiote en fonction des différents cryoprotecteurs utilisés

Parmi les 3 cryoprotecteurs testés ci-dessus, le mélange cryoprotecteur, maltodextrine à 6,7% / tréhalose à 10%, (soit dans une proportion 40/60) est celui qui donne les meilleurs résultats quant au maintien en vie des principaux genres constitutifs du microbiote fécal, malgré une diminution de certains genres anaérobies stricts d'environ 1 à 2 log pour la selle 3 (Figure 5) (et jusqu'à 4 log pour les autres selles – résultats non présentés). A l'inverse, le glycérol à 10% se révèle peu protecteur, que ce soit sur les genres aérobies ou les genres anaérobies (résultat non montré).

Les genres anaérobies stricts (*Clostridium* sp. et *Bacteroides* sp.) restent dominants lorsque l'étude est réalisée dans la semaine suivant la lyophilisation (Figure 6). La conservation à 4°C du lyophilisat n'a que peu de répercussion avec une perte supplémentaire de l'ordre de 1,5 log pour les *Bacteroides* sp. après 3 mois de conservation à 4°C et une perte d'1 log à 8 mois pour les *Clostridium* sp (figure 6). Dans tous les cas, les genres dominants du microbiote restent en état de dominance au cours de la conservation.

Les résultats obtenus avec la selle 2, riche en *Bifidobacterium* sp. ont montré la stabilité de ce groupe, jusqu'à 6 mois post-lyophilisation dans le mélange MT (résultat non montré).

Pris dans leur ensemble, ces résultats démontrent que le mélange MT est celui qui permet la meilleure préservation du microbiote fécal lyophilisé, aussi bien en termes de viabilité que de diversité et ce pour une durée pouvant aller jusqu'à 6 mois après lyophilisation.

BIBLIOGRAPHIE

- Allen-Vercoe E, Petrof EO. Artificial stool transplantation: progress towards a safer, more effective and acceptable alternative. *Expert Rev Gastroenterol Hepatol* 2013;7:291-3.
- ANSM. Rapport. La transplantation de microbiote fécal et son encadrement dans les essais cliniques, Mars 2014, mise à jour juin 2015.
- Béal C and Fonseca F. Freezing of probiotic bacteria. P. 179-212. *Advances in probiotic technology*. Eds Foerst P. and Sativarangkna C. 2015, CRC Press, Boca Raton, USA.
- Borody T, Fischer M, Mitchell S, Campbell J. Fecal microbiota transplantation in gastrointestinal disease: 2015 update and the road ahead. *Expert Rev Gastroenterol Hepatol*. 2015;9:1379-91.
- Carvalho A.S., Silva J., Ho P., Texeira P., Malcata F.X. and Gibbs P. Relevant factors for the preparation of freeze-dried lactic acid bacteria. *Int. Dairy J* 2004, 14: 835-47.

- Debast SB, Bauer MP, Kuijper EJ. European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases: update of the treatment guidance document for *Clostridium difficile* infection. Clin Microbiol Infect 2014;20Suppl 2:1-26.
- 5 Hamilton MJ, Weingarden AR, Sadowsky MJ, KhorutsA. Standardized frozen preparation for transplantation of fecal microbiota for recurrent *Clostridium difficile* infection. Am J Gastroenterol2012;107:761-7.
- Kapel N, Thomas M, Corcos O, Mayeur C, Barbot-Trystram L, Bouhnik Y, Joly F. Practical implementation of faecal transplantation. Clinical Microbiology and Infection2014;20:1098-105.
- 10 Kelly CR, Kahn S, Kashyap P, Laine L, Rubin D, Atreja A, Moore T, Wu G. Gastroenterology.2015 Jul;149(1): 223-37.
- Rougé C, Goldenberg O, Ferraris L, Berger B, Rochat F, Legrand A, Göbel UB, Vodovar M, Voyer M, Rozé JC, Darmaun D, Piloquet H, Butel MJ, De La Cochetière MF. Investigation of the intestinal microbiota in preterm infants using different methods. Anaerobe 2010;16:362-370.
- 15 Sokol H, Galperine T, Kapel N, Bourlioux P, Seksik P, Barbut F, Scanzi J, Chast F, Batista R, Joly F, Joly AC, Collignon A, Guery B, Beaugerie L, pour le GroupeFrançais de Transplantation Féciale (GFTF). Transplantation de microbiote fécal dans le cadre des infections à *Clostridium difficile* récidivantes : recommandations pour la pratique clinique courante. Hepato Gastro 201 ; 22:278-90.
- 20 Surawicz CM, Brandt LJ, Binion DG, et al. Guidelines for diagnosis, treatment, and prevention of *Clostridium difficile* infections. Am J Gastroenterol 2013;108:478-98.
- Van Nood E, Vrieze A, Nieuwdorp M, Fuentes S, Zoetendal EG, de Vos WM, Visser CE, Kuijper EJ, Bartelsman JF, Tijssen JG, Speelman P, Dijkgraaf MG, Keller J. Duodenal infusion of donor feces for recurrent *Clostridium difficile*. N Engl J Med 2013;368:407-15.
- 25 Vrieze A, de Groot PF, Kootte RS, Knaapen M, van Nood E, Nieuwdorp M. Fecal transplant: a safe and sustainable clinical therapy for restoring intestinal microbial balance in human disease. Best Pract Res Clin Gastroenterol 2013;27:127-37.
- 30 Youngster I, Sauk J, Pindar C, Wilson RG, Kaplan JL, Smith MB, Alm EJ, Gevers D, Russell GH, Hohmann EL. Fecal microbiota transplant for relapsing *Clostridium difficile* infection using a frozen inoculum from unrelated donors: a randomized, open-label, controlled pilot study. Clin Infect Dis 2014a;58:1515-22
- Youngster I, Russell GH, Ziv-Baran T, Sauk J, Hohmann EL. Oral, capsulized, frozen fecal microbiota transplantation for relapsing *Clostridium difficile* infection.JAMA. 2014b;312:1772-8.

RENDICATIONS MODIFIEES

1. Utilisation d'un mélange de cryoprotecteurs pour la conservation d'un microbiote dans son écosystème sous forme lyophilisée, caractérisée en ce que ledit mélange de cryoprotecteurs comprend de la maltodextrine et du tréhalose dans un rapport compris entre 35/65 et 45/55.
2. Utilisation selon l'une des revendications 1 ou 2 dans laquelle le microbiote dans son écosystème consiste en des selles.
3. Composition lyophilisée comprenant un microbiote dans son écosystème et un mélange de cryoprotecteurs, caractérisée en ce que ledit mélange de cryoprotecteurs comprend de la maltodextrine et du tréhalose, utilisés dans un rapport compris entre 35/65 et 45/55.
4. Composition selon la revendication 3 dans laquelle (i) le microbiote dans son écosystème consiste en des selles, (ii) le rapport entre la quantité de selles et le mélange de cryoprotecteurs est compris entre 15 à 35% et 85 à 65% respectivement et (iii) la maltodextrine et le tréhalose sont utilisés dans un rapport de 40/60.
5. Gélule gastro-résistante comprenant une composition lyophilisée telle que définie à l'une des revendications 3 ou 4.
6. Composition selon la revendication 4 ou gélule gastro-résistante selon la revendication 6, pour son utilisation dans le traitement d'une maladie ou d'un trouble liés à un déséquilibre du microbiote intestinal choisi parmi la colite à *Clostridium difficile*, les maladies inflammatoires chroniques intestinales, le portage des bactéries multirésistantes, le diabète de type 1 et de type 2, le syndrome métabolique, l'obésité et l'autisme.
7. Composition ou gélule selon la revendication 6, pour son utilisation en relai d'un traitement antibiotique oral, en cas de récurrences d'infections à *Clostridium difficile*.
8. Procédé de préparation d'une gélule gastro-résistante telle que définie dans la revendication 6, comprenant les étapes suivantes :
 - a. recueil d'un microbiote dans son écosystème à préserver ;
 - b. dilution dudit microbiote dans son écosystème avec un mélange de cryoprotecteurs comprenant de la maltodextrine et du tréhalose dans un rapport compris entre 35/65 et 45/55;
 - c. lyophilisation du mélange obtenu à l'étape b. ;
 - d. remplissage de l'enveloppe de la gélule gastro-résistante avec ledit mélange lyophilisé ;
 - e. mise en gélule.

9. Procédé selon la revendication 8 dans lequel ledit microbiote dans son écosystème consiste en des selles, et le mélange de cryoprotecteurs consiste en un mélange de maltodextrine et de tréhalose dans un rapport de 40/60.

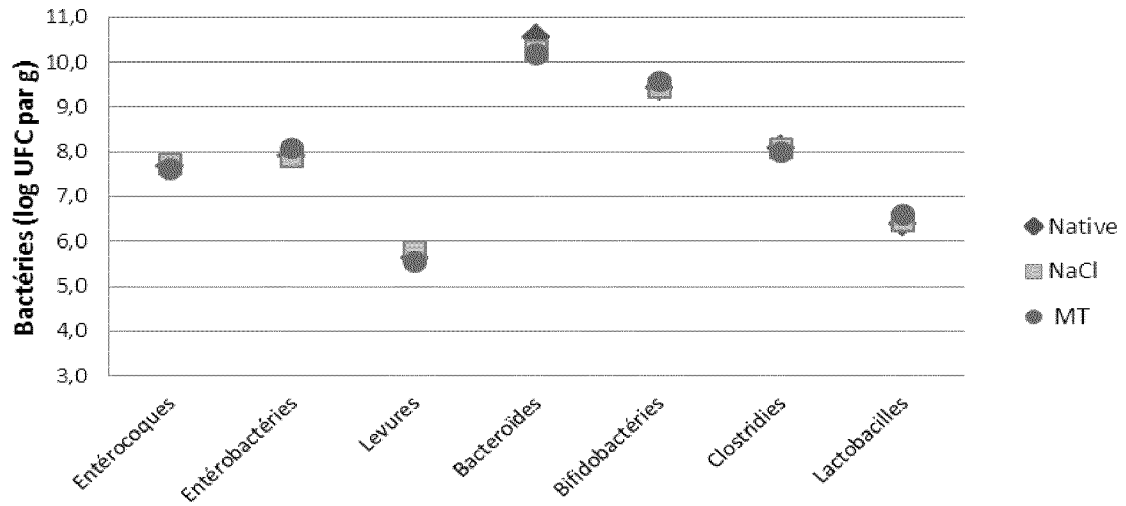


Figure 1

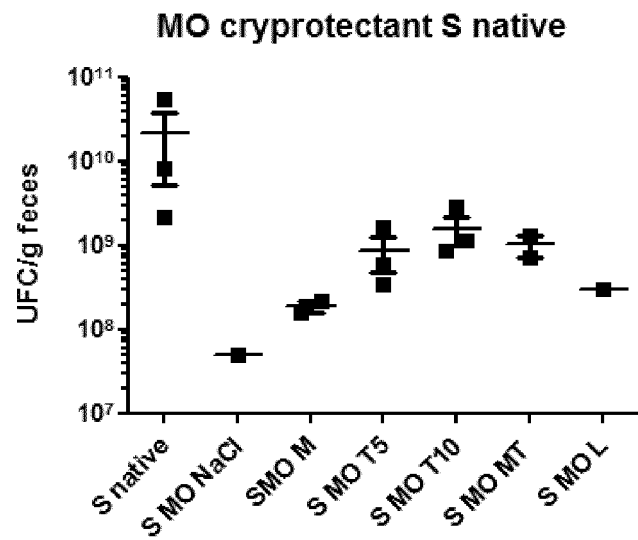


Figure 2

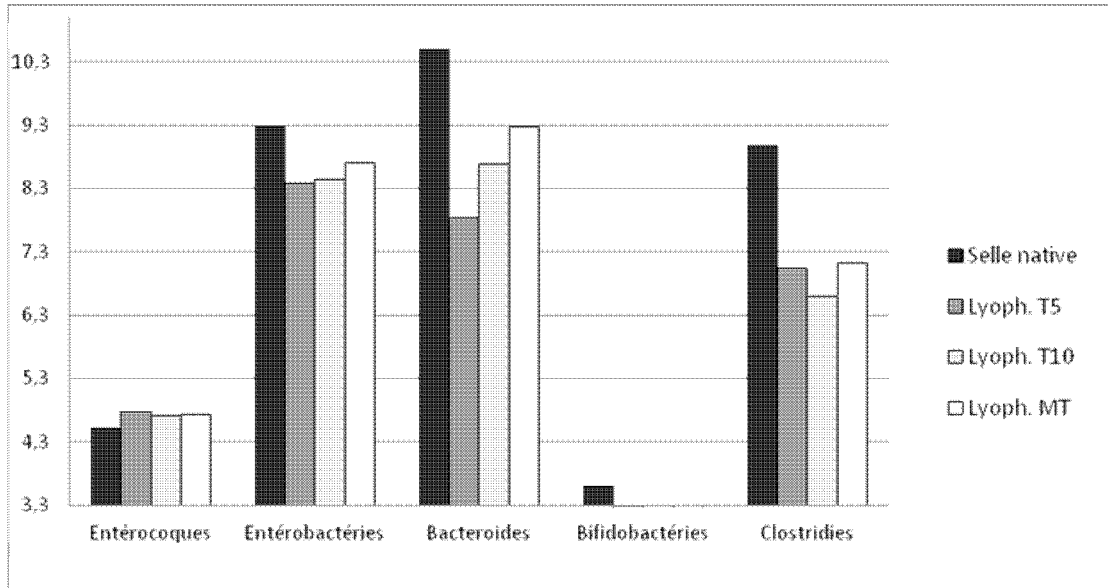


Figure 5

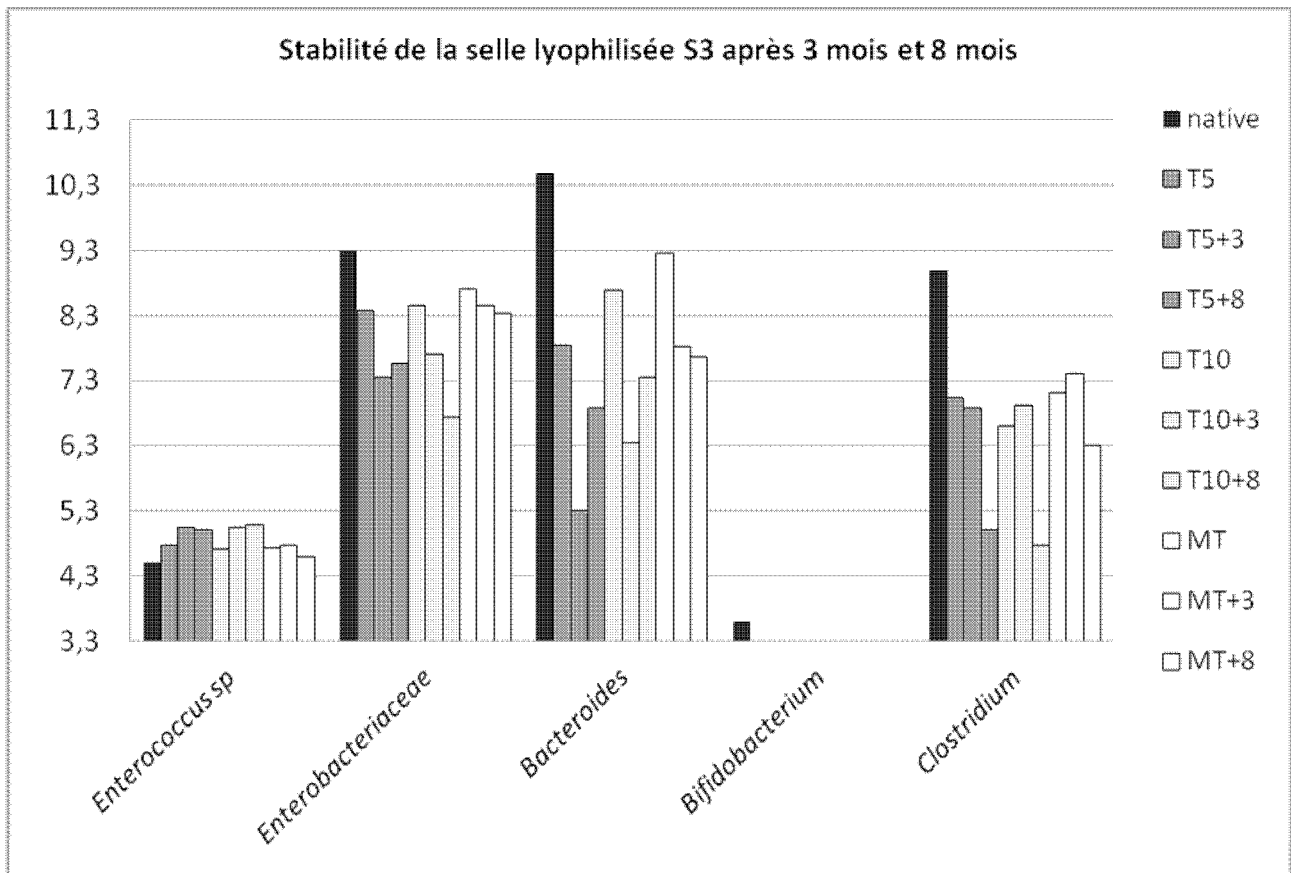


Figure 6

RAPPORT DE RECHERCHE

articles L.612-14, L.612-53 à 69 du code de la propriété intellectuelle

OBJET DU RAPPORT DE RECHERCHE

L'I.N.P.I. annexe à chaque brevet un "RAPPORT DE RECHERCHE" citant les éléments de l'état de la technique qui peuvent être pris en considération pour apprécier la brevetabilité de l'invention, au sens des articles L. 611-11 (nouveau) et L. 611-14 (activité inventive) du code de la propriété intellectuelle. Ce rapport porte sur les revendications du brevet qui définissent l'objet de l'invention et délimitent l'étendue de la protection.

Après délivrance, l'I.N.P.I. peut, à la requête de toute personne intéressée, formuler un "AVIS DOCUMENTAIRE" sur la base des documents cités dans ce rapport de recherche et de tout autre document que le requérant souhaite voir prendre en considération.

CONDITIONS D'ETABLISSEMENT DU PRESENT RAPPORT DE RECHERCHE

Le demandeur a présenté des observations en réponse au rapport de recherche préliminaire.

Le demandeur a maintenu les revendications.

Le demandeur a modifié les revendications.

Le demandeur a modifié la description pour en éliminer les éléments qui n'étaient plus en concordance avec les nouvelles revendications.

Les tiers ont présenté des observations après publication du rapport de recherche préliminaire.

Un rapport de recherche préliminaire complémentaire a été établi.

DOCUMENTS CITES DANS LE PRESENT RAPPORT DE RECHERCHE

La répartition des documents entre les rubriques 1, 2 et 3 tient compte, le cas échéant, des revendications déposées en dernier lieu et/ou des observations présentées.

Les documents énumérés à la rubrique 1 ci-après sont susceptibles d'être pris en considération pour apprécier la brevetabilité de l'invention.

Les documents énumérés à la rubrique 2 ci-après illustrent l'arrière-plan technologique général.

Les documents énumérés à la rubrique 3 ci-après ont été cités en cours de procédure, mais leur pertinence dépend de la validité des priorités revendiquées.

Aucun document n'a été cité en cours de procédure.

1. ELEMENTS DE L'ETAT DE LA TECHNIQUE SUSCEPTIBLES D'ETRE PRIS EN CONSIDERATION POUR APPRECIER LA BREVETABILITE DE L'INVENTION

SEMYONOV D ET AL: "Microencapsulation of Lactobacillus paracasei by spray freeze drying", FOOD RESEARCH INTERNATIONAL, ELSEVIER APPLIED SCIENCE, BARKING, GB, vol. 43, no. 1, 1 janvier 2010 (2010-01-01), pages 193-202, XP026813715, ISSN: 0963-9969 [extrait le 2009-09-27]

WO 2007/070052 A2 (OXTHERA INC [US]; SIDHU HARMEET [US]; KAUL POONAM [US]) 21 juin 2007 (2007-06-21)

WO 2013/142792 A1 (ADVANCED BIONUTRITION CORP [US]) 26 septembre 2013 (2013-09-26)

WO 2008/035332 A1 (TECHNION RES & DEV FOUNDATION [IL]; KARMAT COATING IND LTD [IL]; SHIMO) 27 mars 2008 (2008-03-27)

TIAN HONGLIANG ET AL: "Freeze-dried, Capsulized Fecal Microbiota Transplantation for Relapsing Clostridium difficile Infection", JOURNAL OF CLINICAL GASTROENTEROLOGY UNITED STATES, USA, vol. 49, no. 6, 1 juillet 2015 (2015-07-01), pages 537-538, XP009189478, ISSN: 1539-2031, DOI: 10.1097/MCG.0000000000000330

BORODY THOMAS J ET AL: "Fecal Microbiota Transplantation: Expanding Horizons for Clostridium difficile Infections and Beyond", ANTIBIOTICS, vol. 4, no. 3, 1 janvier 2015 (2015-01-01), pages 254-266, XP009189481,

YOUNGSTER ILAN ET AL: "Oral, capsulized, frozen fecal microbiota transplantation for relapsing Clostridium difficile infection", JAMA : THE JOURNAL OF THE AMERICAN MEDICAL ASSOCIATION, AMERICAN MEDICAL ASSOCIATION, UNITED STATES, vol. 312, no. 17, 5 novembre 2014 (2014-11-05), pages 1772-1778, XP009189475, ISSN: 1538-3598, DOI: 10.1001/JAMA.2014.13875

LIN ENMOORE ET AL: "Twelve Week Storage Trial of Microbial Viability in Lyophilized and Frozen Fecal Microbiota Preparations", GASTROENTEROLOGY, ELSEVIER, PHILADELPHIA, PA, vol. 148, no. 4, Suppl.1, 1 mai 2014 (2014-05-01), page S962, XP009189480, ISSN: 0016-5085

WO 2012/016287 A2 (BORODY THOMAS J [AU]) 9 février 2012 (2012-02-09)

WO 2014/152484 A1 (UNIV MINNESOTA [US]) 25 septembre 2014 (2014-09-25)

2. ELEMENTS DE L'ETAT DE LA TECHNIQUE ILLUSTRANT L'ARRIERE-PLAN TECHNOLOGIQUE GENERAL

NEANT

3. ELEMENTS DE L'ETAT DE LA TECHNIQUE DONT LA PERTINENCE DEPEND DE LA VALIDITE DES PRIORITES

NEANT

