



CONFÉDÉRATION SUISSE  
OFFICE FÉDÉRAL DE LA PROPRIÉTÉ INTELLECTUELLE

⑪ CH 663 617 A5

⑤① Int. Cl.4: C 07 H 13/10  
A 61 K 35/30

**Brevet d'invention délivré pour la Suisse et le Liechtenstein**  
Traité sur les brevets, du 22 décembre 1978, entre la Suisse et le Liechtenstein

// (A 61 K 35/30, 31:72)

⑫ **FASCICULE DU BREVET** A5

⑲ Numéro de la demande: 4572/82

⑦③ Titulaire(s):  
Fidia S.p.A., Abano Terme/Padova (IT)

⑳ Date de dépôt: 28.07.1982

③① Priorité(s): 04.08.1981 US 290106

⑦② Inventeur(s):  
Della Valle, Francesco, Padova (IT)  
Romeo, Aurelio, Roma (IT)

㉔ Brevet délivré le: 31.12.1987

④⑤ Fascicule du brevet  
publié le: 31.12.1987

⑦④ Mandataire:  
Patmed AG, Basel

⑤④ **Procédé de préparation de dérivés d'esters internes de gangliosides et compositions pharmaceutiques contenant ces dérivés.**

⑤⑦ La présente invention a pour objet un procédé nouveau de préparation de dérivés d'esters internes de gangliosides, leur préparation et leur utilisation pharmaceutique.

Ce procédé consiste à faire réagir dans un solvant organique non aqueux un ganglioside ou un mélange de ganglioside ou encore un sel de ganglioside ou d'un mélange de gangliosides et d'une base azotée tertiaire avec un agent de lactonisation afin de produire au moins une liaison lactonique en ces gangliosides.

Ces composés sont destinés à être utilisés pour le traitement de désordres ou troubles du système nerveux.

## REVENDEICATIONS

1. Procédé de préparation de dérivés de ganglioside à ester interne, dans lequel on fait réagir dans un solvant organique non aqueux un ganglioside ou un mélange de gangliosides ou encore un sel de ganglioside, ou un mélange de gangliosides et d'une base azotée tertiaire avec un agent de lactonisation afin de produire au moins une liaison lactonique en ces gangliosides.

2. Procédé selon la revendication 1, dans lequel ledit solvant organique est choisi dans le groupe: diméthylsulfoxyde, diméthylformamide, sulfolane, tétrahydrofuranne, diméthoxyéthane et pyridine.

3. Procédé de préparation de dérivés de ganglioside à ester interne selon la revendication 1 ou 2, dans lequel:

a) le ganglioside, ou mélange de gangliosides, est dissous dans un solvant aprotique;

b) on ajoute au mélange résultant une résine échangeuse d'ions, de sorte que les groupes carboxylates desdits gangliosides sont transformés en groupes carboxyles ou en sels d'amine tertiaire; et

c) on traite ensuite par un carbodiimide afin de créer au moins une liaison lactonique pour obtenir ledit dérivé de ganglioside à ester interne.

4. Procédé pour l'obtention des gangliosides ou mélanges de gangliosides de départ du procédé selon les revendications 1 ou 3, caractérisé en ce que ces gangliosides sont extraits de cervelles de bovins.

5. Procédé selon la revendication 1 ou 3, dans lequel ledit agent de lactonisation est choisi dans le groupe: carbodiimides solubles dans les solvants organiques, sels de 2-chloro-1-méthylpyridinium, éthoxyacétylène et N-éthyl-5-phénylisoxazolium-3'-sulfonate.

6. Procédé selon la revendication 3, dans lequel le carbodiimide est le dicyclohexylcarbodiimide, le benzylisopropylcarbodiimide ou le benzyléthylcarbodiimide.

7. Procédé selon la revendication 1 ou 3, dans lequel ledit dérivé de ganglioside à ester interne est précipité à l'aide d'acétone.

8. Procédé selon la revendication 3, dans lequel ledit sel dudit ganglioside ou mélange de gangliosides est un sel d'amine tertiaire préparé par transformation des groupes carboxylates desdits gangliosides en un de leurs sels d'amine tertiaire au moyen d'un échange d'ions.

9. Procédé selon la revendication 3, dans lequel ledit sel est un sel d'amine tertiaire formé avec du triéthylammonium ou du pyridinium.

10. Procédé selon une des revendications 1 à 3 et 5 à 9, dans lequel la réaction avec un agent de lactonisation produit l'estérification de la totalité des groupes carboxyles dudit dérivé de ganglioside.

11. Composition pour le traitement des troubles du système nerveux périphérique dus à des traumatismes, compressions, dégénération ou toxico-infections, pour stimuler la régénération des nerfs et le rétablissement des fonctions neuromusculaires, ou pour le traitement des troubles du système nerveux central dus à des traumatismes, anoxies, dégénération ou toxico-infections, où la stimulation du développement neuronal est nécessaire pour le rétablissement fonctionnel, ladite composition comprenant, en association avec un support ou diluant pharmaceutiquement acceptable, une quantité efficace d'au moins un dérivé de ganglioside à ester interne obtenu à l'aide du procédé selon une des revendications 1 à 3 et 5 à 10, ledit dérivé de ganglioside renfermant:

a) une partie hydrocarbonée, au moins un céramide et au moins un reste acide;

b) ladite partie hydrocarbonée renfermant au moins un reste N-acétylgalactosamine ou N-acétylglucosamine et au moins un reste glucose ou galactose;

c) ledit reste acide renfermant au moins un acide N-acétylneuraminique ou N-glycolylneuraminique; et

d) le groupement carboxyle d'au moins un desdits restes acides étant estérifié par un groupement hydroxy d'une desdites parties

2

hydrocarbonées ou d'un desdits restes acides, de manière à former un noyau lactonique.

12. Composition selon la revendication 11, dans laquelle:

a) la partie hydrocarbonée desdits dérivés de ganglioside présente la structure:



où:

Gal est un reste de galactose;

GalNAC est un reste de N-acétylgalactosamine; et

Glc est un reste de glucose.

13. Composition selon la revendication 11 ou 12, dans laquelle ledit dérivé de ganglioside comporte au moins un acide N-acétylneuraminique lié à au moins un desdits restes Gal.

14. Composition selon la revendication 11, dans laquelle:

a) au moins un desdits dérivés de ganglioside présente la structure:



où:

Gal est un reste de galactose;

GalNAC est un reste de N-acétylgalactosamine;

Glc est un reste de glucose, et

NANA est un reste d'acide N-acétylneuraminique,

et dans laquelle:

b) NANA est un ester lié à Gal.

15. Composition selon la revendication 11 ou 14, dans laquelle ledit reste acide est de l'acide N-acétylneuraminique.

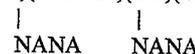
16. Composition selon la revendication 11, dans laquelle la partie hydrocarbonée est constituée par des restes de galactose, glucose et N-acétylgalactosamine.

17. Composition selon la revendication 11, dans laquelle ledit dérivé de ganglioside comprend un mélange de:

a)  $(\text{Gal})(\text{GalNAC})(\text{Gal})(\text{Glc})(\text{céramide})$



b)  $(\text{Gal})(\text{GalNAC})(\text{Gal})(\text{Glc})(\text{céramide})$

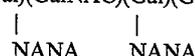


c)  $(\text{Gal})(\text{GalNAC})(\text{Gal})(\text{Glc})(\text{céramide})$



et

d)  $(\text{Gal})(\text{GalNAC})(\text{Gal})(\text{Glc})(\text{céramide})$



où:

Gal représente un reste de galactose;

GalNAC représente un reste de N-acétylgalactosamine;

Glc représente un reste de glucose; et

NANA représente un reste N-acétylneuraminique,

et dans laquelle au moins un desdits restes NANA est estérifié par un groupement hydroxy d'un reste de galactose et/ou d'un reste adjacent à NANA, de manière à former un noyau lactonique.

18. Composition selon une des revendications 11 à 17, dans laquelle ledit dérivé de ganglioside est un produit dont la totalité des groupes carboxyles est estérifiée et qui est constitué par un dérivé de ganglioside à ester interne où le groupement carboxyle est estérifié par un groupement hydroxy d'une desdites parties hydrocarbonées, ou de l'un des restes acides, afin de former un noyau lactonique.

19. Composition selon une des revendications 11 à 18, sous la forme d'une solution injectable.

20. Composition selon une des revendications 11 à 18, qui est associée à un support ou diluée dans un diluant constitué par un mélange de chlorure de sodium et d'un tampon à base de citrate.

21. Composition selon une des revendications 11 à 20, dans laquelle le dérivé de ganglioside représente 2% à 50% en poids.

22. Système pharmaceutique comportant un support ou diluant pharmaceutiquement acceptable et comprenant un premier récipient renfermant un système de solvants, ainsi qu'un second récipient renfermant un excipient solide et une poudre lyophilisée, en quantité suffisante pour le traitement efficace du système nerveux, consistant en au moins un dérivé de ganglioside à ester interne obtenu à l'aide du procédé selon une des revendications 1 à 3 et 5 à 10, ledit dérivé de ganglioside comprenant:

a) une partie hydrocarbonée, au moins un céramide et au moins un reste acide;

b) ladite partie hydrocarbonée comportant au moins un reste de N-acétylgalactosamine ou N-acétylglucosamine et au moins un reste de glucose ou galactose;

c) ledit reste acide renfermant au moins un acide N-acétylneuraminique ou N-glycolylneuraminique; et

d) le groupement carboxyle d'au moins un desdits restes acides étant estérifié par un groupement hydroxy d'une des parties hydrocarbonées ou d'un desdits restes acides, afin de former un noyau lactonique;

les contenus respectifs desdits récipients étant destinés à être mélangés pour former une solution de traitement.

23. Système pharmaceutique selon la revendication 22, dans lequel ledit premier récipient renferme du chlorure de sodium et un tampon à base de citrate.

24. Système pharmaceutique selon la revendication 22, dans lequel ledit excipient solide est constitué de glycine.

25. Système pharmaceutique selon la revendication 22 ou 23, dans lequel ledit excipient solide est constitué de mannitol.

26. Système pharmaceutique selon la revendication 22, dans lequel ledit second récipient renferme ledit dérivé de ganglioside dans une proportion 10% à 90% en poids.

27. Système pharmaceutique selon une des revendications 22 à 26, dans lequel la partie hydrocarbonée desdits dérivés de ganglioside présente la structure:



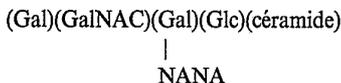
où:

- Gal est un reste de galactose;
- GalNAC est un reste de N-acétylgalactosamine; et
- Glc est un reste de glucose.

28. Système pharmaceutique selon la revendication 27, dans lequel ledit dérivé de ganglioside comporte au moins un acide N-acétylneuraminique lié à au moins un des restes Gal.

29. Système pharmaceutique selon une des revendications 22 à 26, dans lequel:

a) au moins un desdits dérivés de ganglioside présente la structure:



où:

- Gal est un reste de galactose;
- GalNAC est un reste de N-acétylgalactosamine;
- Glc est un reste de glucose; et
- NANA est un reste N-acétylneuraminique,

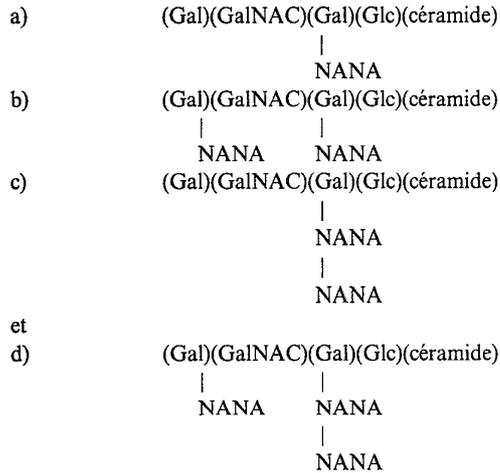
et dans laquelle:

b) NANA est un ester lié à Gal.

30. Système pharmaceutique selon la revendication 29, dans lequel ledit reste acide est de l'acide N-acétylneuraminique.

31. Système pharmaceutique selon une des revendications 22 à 27, dans lequel ladite partie hydrocarbonée est constituée par des restes de galactose, glucose et N-acétylgalactosamine.

32. Système pharmaceutique selon une des revendications 22 à 27, dans lequel ledit dérivé de ganglioside comprend un mélange de:



où:

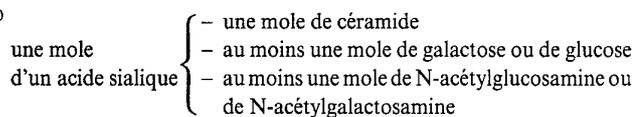
- Gal représente un reste de galactose;
- GalNAC représente un reste de N-acétylgalactosamine;
- Glc représente un reste de glucose; et
- NANA représente un reste N-acétylneuraminique,

et dans lequel au moins un desdits restes NANA est estérifié par un groupement hydroxy d'un reste de galactose et/ou d'un reste voisin de NANA, afin de former un noyau lactonique.

33. Système pharmaceutique selon une des revendications 22 à 32, dans lequel ledit dérivé de ganglioside est un produit dont la totalité des carboxyles est estérifiée et qui est constitué par un dérivé de ganglioside à ester interne dans lequel le groupement carboxyle est estérifié par un groupement hydroxy d'une des parties hydrocarbonées ou par un des restes acides, de manière à former un noyau lactonique.

La présente invention a pour objet un procédé de préparation de dérivés d'esters internes de gangliosides. Elle se rapporte également à des compositions pharmaceutiques contenant de tels dérivés pour le traitement des troubles du système nerveux dus à des traumatismes, compressions, dégénération ou toxico-infections, pour stimuler la régénération des nerfs et le rétablissement des fonctions neuromusculaires, ou pour le traitement des troubles du système nerveux central dus à des traumatismes, anoxies, dégénération ou toxico-infections, où la stimulation du développement neuronal est nécessaire pour le rétablissement fonctionnel. Elle a également pour objet un système pharmaceutique comportant un support ou diluant pharmaceutiquement acceptable et comprenant un premier récipient renfermant un système de solvants, ainsi qu'un second récipient renfermant un excipient solide et une poudre lyophilisée, en quantité suffisante pour le traitement efficace du système nerveux.

Les gangliosides forment un groupe de glycosphingolipides et présentent une structure dont une partie est un hydrate de carbone auquel sont liés un céramide et le résidu d'un acide sialique. La partie correspondant à l'hydrate de carbone comporte au moins un résidu galactose ou glucose et au moins un résidu N-acétylglucosamine ou N-acétylgalactosamine. La structure générale d'un ganglioside peut donc être représentée par la formule suivante:

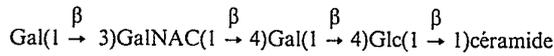


65 dans laquelle tous les résidus sont liés par une liaison glucosidique.

De nombreux gangliosides ont été identifiés et on a constaté qu'ils sont particulièrement abondants dans les tissus nerveux, notamment dans les tissus du cerveau. Différentes études ont montré

que les acides sialiques trouvés en la plus grande proportion dans les gangliosides sont l'acide N-acétylneuraminique (NANA) et, à un degré moindre, l'acide N-glycolylneuraminique. Parmi les nombreux gangliosides qui ont été identifiés, les gangliosides suivants, définis par leurs symboles internationaux, se sont révélés être présents en proportions significatives dans les mélanges de gangliosides extraits des tissus de cervelles de bovins.

■  $G_{D1b}$  (16%)

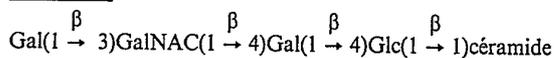


NANA



NANA

■  $G_{T1b}$  (19%)



NANA

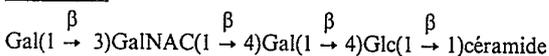


NANA



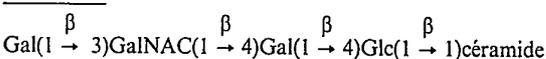
NANA

■  $G_{M1}$  (21%)



NANA

■  $G_{D1a}$  (40%)



NANA



NANA

schémas dans lesquels:

- Glc représente le glucose,
- GalNAC représente la N-acétylgalactosamine,
- Gal représente le galactose,
- NANA représente l'acide N-acétylneuraminique,

et les pourcentages entre parenthèses indiquent la quantité de chaque ganglioside trouvé dans le mélange de gangliosides extraits de tissus de cervelles de bovins.

Il est connu que les gangliosides jouent un rôle important dans le système nerveux, et il a été récemment possible de démontrer que les gangliosides sont utiles dans le traitement de troubles du système nerveux périphérique et du système nerveux central. [«Acta psychiat. Scand.», 55, 102 (1977); «Eur. Med. Phys.», 13, 1 (1977);

«Ric. Sci. Educ. Perm.», 9, 115 (1978); «Adv. Exp. Biol.», 71, 275 (1976); «Electromyogr. Clin. Neurophysiol.», 19, 353 (1979); «Minerva Medica», 69, 3277 (1978); «Minerva Stomat.», 27, 177 (1978); «Med. del Lavoro», 68, 296 (1977); «Brain Res.», 197, 236 (1980).]

L'action thérapeutique des gangliosides semble essentiellement consister en un phénomène de bourgeons stimulants du tissu nerveux et d'activation des enzymes de membrane intervenant dans la conduite des stimuli nerveux, par exemple de l'enzyme  $(\text{Na}^+, \text{K}^+)\text{ATPase}$  [«Brain Res.», 197, 236 (1980); Leon *et al.*, «J. of Neurochem.», 37, 350 (1981)].

Les bourgeons des nerfs stimulés par les gangliosides favorisent alors les régénération et reconstitution du tissu nerveux endommagé.

D'autres études ont porté sur la découverte de composés qui peuvent être plus efficaces que les gangliosides dans le traitement des troubles du système nerveux.

On a pu constater, conformément à la présente invention, que certains dérivés de gangliosides sont plus actifs que les gangliosides eux-mêmes pour stimuler la formation des bourgeons sur les nerfs et activer les enzymes de membrane intervenant dans la transmission par conduction du stimulus nerveux telle l'enzyme  $(\text{Na}^+, \text{K}^+)\text{ATPase}$ . De façon spécifique, on a constaté que les dérivés d'esters internes de gangliosides sont particulièrement actifs pour le traitement de troubles du système nerveux et sont plus actifs que les gangliosides dont ils proviennent originellement. Des tests *in vitro* et *in vivo* ont montré que les dérivés d'esters internes sont supérieurs aux gangliosides dont ils proviennent pour la stimulation du bourgeonnement des nerfs et l'activation de l'enzyme de membrane  $(\text{Na}^+, \text{K}^+)\text{ATPase}$  impliquée dans la conduction du nerf.

Seuls certains des dérivés d'esters internes possibles des gangliosides ont jusqu'à présent été isolés, cela uniquement en de très faibles proportions, dans les tissus du cerveau.

Les esters internes des gangliosides sont formés par la réaction entre le radical carboxyle du résidu de l'acide sialique et un groupe hydroxyle de l'un des résidus d'hydrates de carbone ou d'un autre acide sialique contigu de la même molécule de ganglioside [«J. of Neurochemistry», 34, 1351 (1980); «Bull. of Molecular Biology and Medicine», 3, 170 (1978)].

A titre d'exemples possibles, on peut citer un dérivé d'ester interne d'un ganglioside que l'on représente par la structure suivante:

( Voir page suivante )

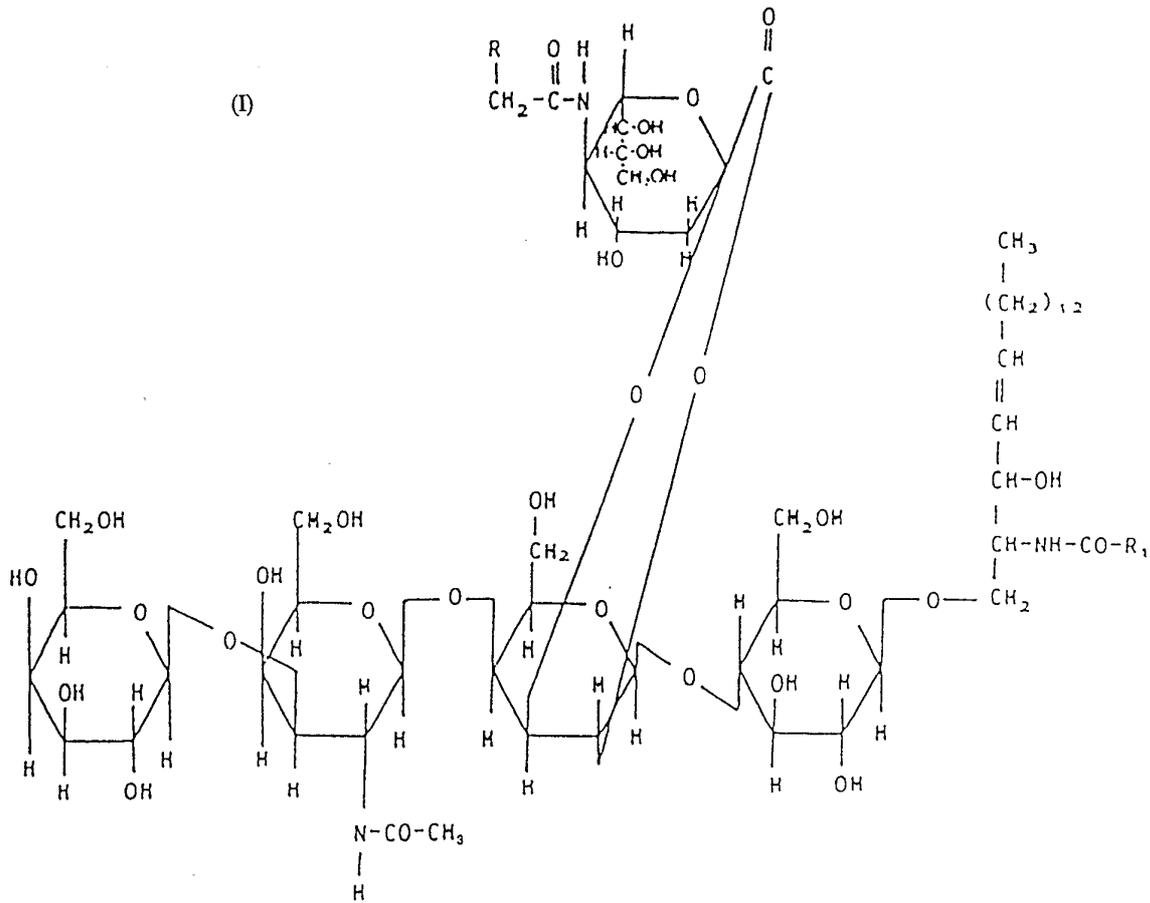
dans laquelle:

- R dans le résidu de l'acide sialique et H ou OH, et
- $R_1$  dans le groupe céramide est un acide gras, tel qu'un acide oléique, stéarique ou linoléique.

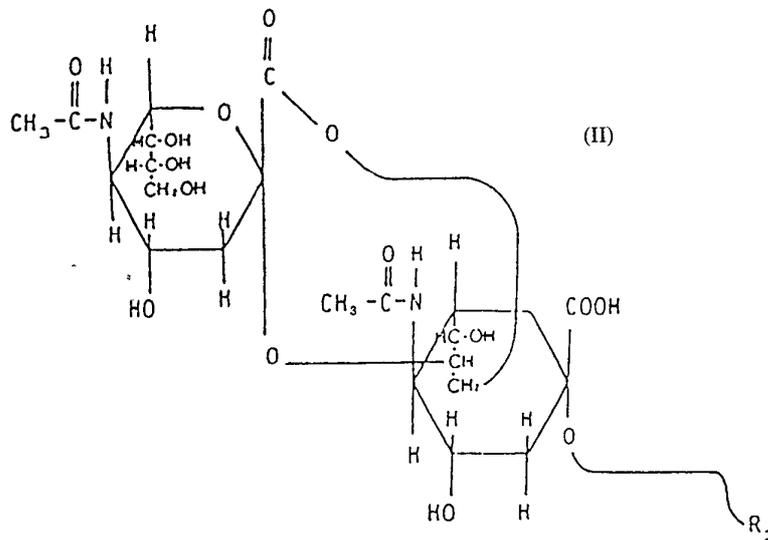
Le dérivé d'ester interne de ganglioside (I) est un exemple d'un dérivé dans lequel le groupe carboxyle de l'acide sialique est lié par un ester à un groupe hydroxyle de l'un des résidus d'hydrates de carbone, plus spécifiquement le galactose. La formation de la liaison d'ester interne en même temps que de la liaison glucosidique normale entre l'acide sialique et le résidu d'hydrate de carbone crée un cycle lactonique comprenant de façon typique cinq ou six atomes, caractéristique de la structure des dérivés des esters internes du ganglioside.

Alors que la formule (I) a été donnée à titre d'exemple, il faut noter que d'autres cycles lactoniques comprenant 5 ou plus de 5 atomes dans la structure du cycle peuvent être formés lorsque le groupe carboxyle de l'ester de l'acide sialique se lie au groupe hydroxyle d'un résidu d'hydrate de carbone.

Ainsi qu'il a été indiqué ci-dessus, les dérivés de l'ester interne des gangliosides peuvent également être formés lorsque le groupe carboxyle de l'ester de l'acide sialique se fixe sur un acide sialique voisin auquel il est lié par la fonction glucosidique dans le ganglioside parent de départ.



Une telle structure peut être représentée par la formule suivante:



dans laquelle:

$R_2$  représente le résidu d'hydrate de carbone qui est lié par une fonction glucosidique au résidu d'acide sialique.

Un autre dérivé de l'ester interne de ganglioside possible peut être représenté par la formule suivante:

(Voir page suivante)

dans laquelle:

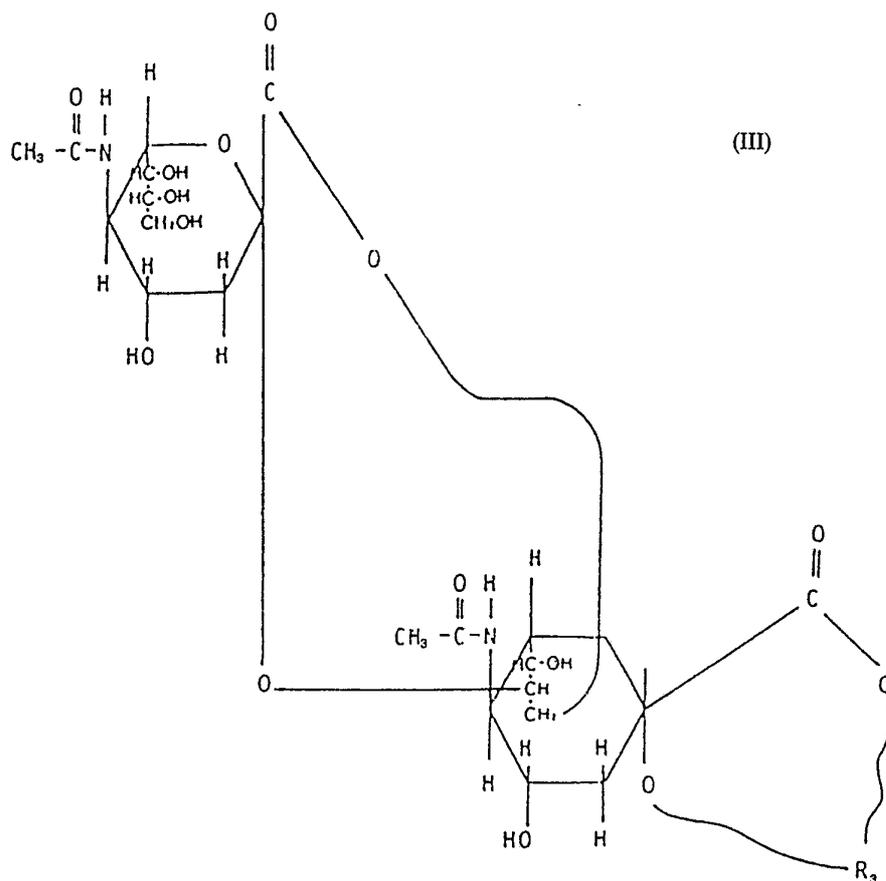
$R_3$  représente le résidu de l'hydrate de carbone auquel l'acide sialique voisin est lié par un ester.

La formule (III) représente alors un dérivé d'ester interne de ganglioside dans lequel un acide sialique est lié par une liaison d'ester à un acide sialique voisin qui est lui-même lié par un ester à un résidu d'hydrate de carbone. Il est par conséquent évident que de nombreux

60 variations des dérivés décrits ci-dessus peuvent être obtenues, de sorte que les dérivés de l'ester interne des gangliosides sont en général formés d'un résidu d'hydrate de carbone, d'au moins un céramide et d'au moins un résidu d'acide sialique, un ou plusieurs des acides sialiques étant liés par un ester à un résidu d'hydrate de carbone et/ou un ou plusieurs des acides sialiques étant liés par une liaison ester à un acide sialique voisin.

De nombreux dérivés d'esters internes de gangliosides sont donc possibles, et ceux qui sont décrits ci-dessus ne sont donnés qu'à titre d'exemples non limitatifs.

La présente invention a pour objet un procédé de préparation de dérivés de ganglioside à ester interne, dans lequel on fait réagir dans un solvant organique non aqueux un ganglioside ou un mélange de



gangliosides ou encore un sel de ganglioside, ou un mélange de gangliosides et d'une base azotée tertiaire avec un agent de lactonisation afin de produire au moins une liaison lactonique en ces gangliosides.

La présente invention a également pour objet une composition pour le traitement des troubles du système nerveux périphérique dus à des traumatismes, compressions, dégénération ou toxico-infections, pour stimuler la régénération des nerfs et le rétablissement des fonctions neuromusculaires, ou pour le traitement des troubles du système nerveux central dus à des traumatismes, anoxies, dégénération ou toxico-infections, où la stimulation du développement neuronal est nécessaire pour le rétablissement fonctionnel, ladite composition comprenant, en association avec un support ou diluant pharmaceutiquement acceptable, une quantité efficace d'au moins un dérivé de ganglioside à ester interne, ledit dérivé de ganglioside renfermant:

- a) une partie hydrocarbonée, au moins un céramide et au moins un reste acide;
- b) ladite partie hydrocarbonée renfermant au moins un reste N-acétylgalactosamine ou N-acétylglucosamine et au moins un reste glucose ou galactose;
- c) ledit reste acide renfermant au moins un acide N-acétylneuraminique ou N-glycolylneuraminique; et
- d) le groupement carboxyle d'au moins un desdits restes acides étant estérifié par un groupement hydroxy d'une desdites parties hydrocarbonées ou d'un desdits restes acides, de manière à former un noyau lactonique.

La présente invention a encore pour objet un système pharmaceutique comportant un support ou diluant pharmaceutiquement acceptable et comprenant un premier récipient renfermant un système de solvants, ainsi qu'un second récipient renfermant un excipient solide et une poudre lyophilisée, en quantité suffisante pour le traitement efficace du système nerveux, consistant en au moins un dérivé de ganglioside à ester interne, ledit dérivé de ganglioside comprenant:

- a) une partie hydrocarbonée, au moins un céramide et au moins un reste acide;
  - b) ladite partie hydrocarbonée comportant au moins un reste de N-acétylgalactosamine ou N-acétylglucosamine et au moins un reste de glucose ou galactose;
  - c) ledit reste acide renfermant au moins un acide N-acétylneuraminique ou N-glycolylneuraminique; et
  - d) le groupement carboxyle d'au moins un desdits restes acides étant estérifié par un groupement hydroxy d'une des parties hydrocarbonées ou d'un desdits restes acides, afin de former un noyau lactonique;
- 45 les contenus respectifs desdits récipients étant destinés à être mélangés pour former une solution de traitement.

#### Procédés de préparation

Certains procédés antérieurs de préparation des dérivés d'esters internes de gangliosides sont connus et consistent en les suivants:

1. La formation des esters internes par simple contact des gangliosides avec une solution d'acide acétique ou trichloroacétique [Sphingolipids, Sphingolipidoses and Allied Disorders, «Adv. Exp. Med. Biol.», 19, 95 (1972), «J. Neurochem.», 28, 1133 (1977)].

55 Conformément à cette méthode, il est nécessaire d'opérer en présence de proportions très élevées d'acide acétique/ganglioside, et une telle transformation des gangliosides ne peut être obtenue.

Pour cette raison, une étape de purification finale est nécessaire et est en général réalisée par une résine d'échange ionique, telle que 60 la résine Sephadex®.

2. La réaction d'un carbodiimide soluble dans l'eau avec des gangliosides dans un milieu aqueux [«Carbohydr. Res.», 41, 344 (1975)].

Par cette méthode, il n'est également pas possible d'obtenir une 65 complète transformation des gangliosides du fait que la réaction est réalisée en milieu aqueux. L'emploi de cette méthode conduit à de très faibles rendements, et une purification finale de l'ester interne est nécessaire.

La présente invention a pour objet une méthode nouvelle et perfectionnée de préparation de dérivés d'esters internes de gangliosides conduisant à de hauts rendements en les dérivés recherchés.

La présente invention a pour objet un procédé de préparation de dérivés de ganglioside à ester interne, dans lequel on fait réagir dans un solvant organique non aqueux un ganglioside ou un mélange de gangliosides, ou encore un sel de ganglioside ou de mélange de gangliosides avec une base azotée tertiaire avec un agent de lactonisation afin de produire au moins une liaison lactonique dans lesdits dérivés de ganglioside à ester interne. Des solvants organiques convenables susceptibles d'être utilisés dans la présente invention sont des solvants aprotiques de la liste formée par diméthylsulfoxyde (DMSO), diméthylformamide (DMF), sulfolane, tétrahydrofurane, diméthoxyéthane et pyridine ou leurs mélanges.

Des réactifs de lactonisation convenables consistent en des carbodiimides solubles dans des solvants organiques tels que dicyclohexylcarbodiimide, benzylisopropylcarbodiimide, benzyléthylcarbodiimide, sels de 2-chloro-1-méthylpyridinium, éthoxyacétylène et réactif de Woodward consistant en N-éthyl-5-phénylisoxazolium-3'-sulfonate.

Alors que les méthodes de l'art antérieur de réaction des gangliosides avec un carbodiimide dans un milieu aqueux conduisent à de très faibles rendements en les dérivés d'esters internes, on a constaté que le procédé selon la présente invention qui consiste à faire réagir des gangliosides dans un milieu non aqueux conduit à des rendements très élevés, c'est-à-dire à des rendements pratiquement quantitatifs en les dérivés d'esters internes recherchés, dont les proportions sont supérieures à celles que l'on a pu obtenir avec les méthodes de l'art antérieur. Les composés de gangliosides de départ utilisés dans le procédé selon la présente invention sont extraits du tissu de la cervelle de mammifères, et plus précisément de bovins.

Les exemples suivants représentent des procédés conformes à la présente invention de préparation de dérivés d'esters internes de gangliosides.

#### Exemple 1:

Un mélange de gangliosides est obtenu par extraction de cervelles de bovins et 5 g de ce mélange sont dissous dans 50 ml de DMSO. Ensuite, 4 g d'une résine de type styrénique anhydre (acide sulfonique, passant au tamis d'ouverture de maille de 0,29 cm à 0,15 cm, sous forme protonée) sont ajoutés au mélange et le système résultant est agité durant 30 minutes à température ambiante. Ce traitement par une résine d'échange ionique convertit la totalité des groupes carboxyliques du ganglioside en groupes carboxyliques (-COOH). La conversion totale des groupes carboxyliques est confirmée par une méthode d'analyse physique appropriée, par exemple par absorption atomique. La résine est alors filtrée sous vide et la solution est traitée par 1,5 g de dicyclohexylcarbodiimide et maintenue au repos durant une heure. La dicyclohexylurée qui précipite est éliminée par filtration et la solution restante est traitée par 100 ml d'acétone, ce qui provoque la précipitation des dérivés de l'ester interne de ganglioside. Ce procédé conduit à l'obtention de 4,6 g d'ester interne (environ 90 à 95% de la valeur théorique).

La présence des dérivés de l'ester interne est confirmée par spectroscopie infrarouge et par chromatographie en couche mince:

— Spectroscopie infrarouge: effectuée sur des pellets de KBr; la liaison ester/lactone produit une raie à  $1750\text{ cm}^{-1}$ .

— Chromatographie en couche mince: effectuée sur des plaques de Silicagel, le solvant étant formé par le mélange  $\text{CHCl}_3/\text{MeOH}/\text{CaCl}_2$  à 0,3% (55/45/10, en volume); la valeur de  $R_f$  du mélange des esters internes est comprise entre 0,7 et 0,85. La valeur  $R_f$  des produits finalement obtenus dépasse la valeur  $R_f$  du mélange des composés de départ. Les résultats de la chromatographie montrent, donc, l'absence de toute matière de départ dans les produits de la réaction. Par traitement à l'aide d'une solution 0,1N de  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  à  $60^\circ\text{C}$  durant 1 heure, les liaisons esters sont clivées, et le mélange original des gangliosides de départ peut être obtenu.

#### Exemple 2:

9 g d'un mélange de gangliosides (sel de sodium) sont dissous dans 80 ml d'eau distillée et passés dans une colonne remplie de 20 g de Dowex 50w x 8 (forme triéthylammoniée, 100 à 200 mesh, soit 0,29 à 0,15 cm).

Ce produit, rendu anhydre sous vide élevé, est dissous (à l'aide d'un bain de sonication) dans 200 ml de tétrahydrofurane anhydre contenant 8 ml de triéthylamine.

Cette solution est lentement ajoutée à 600 ml de tétrahydrofurane anhydre (4 heures) contenant 40 mM de sel de 2-chloro-1-méthylpyridinium (dont l'anion peut, par exemple, consister en iodure, toluène-4-sulfonate, trifluorométhane sulfonate, etc.), sous agitation continue et maintien à température constante à  $45^\circ\text{C}$ .

Cette réaction est effectuée durant 18 heures à  $45^\circ\text{C}$ .

Le réactif en excès est séparé par filtration et le mélange est concentré dans un courant d'azote; le résidu est redissous dans 90 ml d'un mélange de chloroforme/méthanol 1/1 et précipité dans 450 ml d'acétone. Le produit est enfin séché sous un vide élevé.

On obtient ainsi 7,9 g (89,7% du rendement théorique du produit recherché).

— Chromatographie en couche mince: effectuée sur des plaques de gel de silice, le système solvant consistant en un mélange chloroforme/méthanol/ $\text{CaCl}_2$  à 0,3% (55/45/10); la valeur de  $R_f$  du mélange d'esters internes est comprise entre 0,7 et 0,85. La valeur  $R_f$  des produits finalement obtenus dépasse la valeur  $R_f$  du mélange des composés de départ. Les résultats de la chromatographie montrent, par conséquent, l'absence de toute matière de départ dans les produits de réaction. Par traitement à l'aide d'une solution 0,1N de  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  à  $60^\circ\text{C}$  durant 1 heure, les liaisons estérées sont clivées, et le mélange original des gangliosides de départ peut être obtenu.

— Le spectre infrarouge des esters internes du mélange de gangliosides, effectué sur des pellets KBr, présente la raie typique d'absorption de l'ester à  $1750\text{ cm}^{-1}$ .

#### Exemple 3:

8 g de  $\text{GM}_1$  (sel sodé) sont dissous dans 80 ml d'eau distillée et passés dans une colonne remplie de 10 g de Dowex 50w x 8 (forme triéthylammoniée, 100 à 200 mesh, soit 0,29 à 0,15 cm).

Ce produit, rendu anhydre sous vide élevé, est dissous (à l'aide d'un bain de sonication) dans 200 ml de tétrahydrofurane anhydre contenant 4 ml de triéthylamine.

Cette solution est lentement ajoutée à 600 ml de tétrahydrofurane anhydre (4 heures) contenant 20 mM de sel de 2-chloro-1-méthylpyridinium (où l'anion peut, par exemple, consister en iodure, toluène-4-sulfonate, trifluorométhane sulfonate, etc.), sous agitation continue et maintien à température constante de  $45^\circ\text{C}$ .

Cette réaction est effectuée durant 18 heures à  $45^\circ\text{C}$ .

Le réactif en excès est séparé par filtration et le mélange est concentré dans un courant d'azote; le résidu est redissous dans 80 ml d'un mélange chloroforme/méthanol 1/1 et précipité dans 400 ml d'acétone. Le produit est enfin séché sous un vide élevé.

On obtient ainsi 7,0 g (88,4% du rendement théorique du produit recherché).

Ce produit est analysé par:

— Chromatographie en couche mince: effectuée sur plaques de Silicagel, le système solvant consistant en un mélange chloroforme/méthanol/ $\text{CaCl}_2$  à 0,3% (55/45/10); la valeur  $R_f$  du produit final (0,70) dépassant la valeur  $R_f$  (0,65) du composé de départ. Les résultats de la chromatographie montrent, par conséquent, l'absence de toute matière de départ dans les produits de réaction. Par traitement à l'aide d'une solution 0,1N de  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  à  $60^\circ\text{C}$  pendant 1 heure, la liaison ester est clivée et le ganglioside original est récupéré.

— Le spectre infrarouge de l'ester interne de  $\text{GM}_1$ , effectué sur des pellets de KBr, présente la raie typique d'absorption de l'ester à  $1750\text{ cm}^{-1}$ .

*Exemple 4 :*

9 g d'un mélange de gangliosides (sel sodé) sont dissous dans 80 ml d'eau distillée et passés dans une colonne remplie de 20 g de Dowex 50w × 8 (forme pyridinium, 100 à 200 mesh, soit 0,29 à 0,15 cm).

Ce produit, rendu anhydre sous vide élevé, est dissous dans 800 ml de tétrahydrofurane anhydre et 4,2 g (60 mM) d'éthoxyacétylène.

Ce mélange est maintenu au reflux durant 3 heures; la colonne de reflux est refroidie à  $-10^{\circ}\text{C}$  et est pourvue d'une valve d'anhydrification.

Après l'élimination des solvants et de l'excès d'éthoxyacétylène, le résidu est dissous dans 80 ml d'un mélange chloroforme/méthanol 1/1 et précipité dans 400 ml d'acétone.

On obtient ainsi 8,1 g (92,0% du rendement théorique du produit recherché).

Ce produit est analysé par :

— Chromatographie en couche mince: effectuée sur plaques de Silicagel, le système solvant consistant en un mélange chloroforme/méthanol/ $\text{CaCl}_2$  à 0,3% (55/45/10); la valeur  $R_f$  du mélange d'esters internes est comprise entre 0,7 et 0,85. La valeur  $R_f$  des produits finalement obtenus dépasse la valeur  $R_f$  du mélange des composés de départ. Les résultats de la chromatographie montrent, par conséquent, l'absence de toute matière de départ dans les produits de réaction. Par traitement à l'aide d'une solution 0,1N de  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  à  $60^{\circ}\text{C}$  durant 1 heure, les liaisons estérées sont clivées, et le ganglioside original est récupéré.

— Le spectre infrarouge des esters internes du mélange de gangliosides, effectué sur des pellets KBr, présente la raie d'absorption typique des esters à  $1750\text{ cm}^{-1}$ .

*Exemple 5 :*

8,0 g de  $\text{GM}_1$  (sel sodé) sont dissous dans 80 ml d'eau distillée et passés dans une colonne remplie de 10 g de Dowex 50w × 8 (forme pyridinium, 100 à 200 mesh, soit 0,29 à 0,15 cm).

Ce produit, rendu anhydre sous vide élevé, est dissous dans 800 ml de tétrahydrofurane anhydre et 2,1 g (30 mM) d'éthoxyacétylène.

Ce mélange est maintenu au reflux durant 3 heures; la colonne de reflux est refroidie à  $-10^{\circ}\text{C}$  et est pourvue d'une valve d'anhydrification.

Après l'élimination des solvants et de l'excès d'éthoxyacétylène, le résidu est dissous dans 80 ml d'un mélange chloroforme/méthanol 1/1 et précipité dans 400 ml d'acétone.

On obtient ainsi 7,2 g (91,0% du rendement théorique du produit recherché).

Ce produit est analysé par :

— Chromatographie en couche mince: effectuée sur plaques de Silicagel, le système solvant consistant en un mélange chloroforme/méthanol/ $\text{CaCl}_2$  à 0,3% (55/45/10); la valeur  $R_f$  du produit final (0,70) dépasse la valeur  $R_f$  (0,65) du produit de départ. Les résultats de la chromatographie montrent, par conséquent, l'absence de toute matière de départ dans les produits de réaction. Par traitement à l'aide d'une solution 0,1N de  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  à  $60^{\circ}\text{C}$  durant 1 heure, la liaison ester est clivée et le ganglioside original est récupéré.

— Le spectre infrarouge de l'ester interne de  $\text{GM}_1$ , effectué sur des pellets KBr, présente la raie d'absorption typique de l'ester à  $1750\text{ cm}^{-1}$ .

*Exemple 6 :*

9 g d'un mélange de gangliosides (sel sodé) sont dissous dans 80 ml d'eau distillée et passés dans une colonne remplie de 20 g de Dowex 50w × 8 (forme pyridinium, 100 à 200 mesh, soit 0,29 à 0,15 cm).

Ce produit, rendu anhydre sous vide élevé, est dissous dans 200 ml de pyridine anhydre et est ajouté à une suspension de 5,52 g (10 mM) du réactif Zwitterionique de Woodward [N-éthyl-5-phényl-

isoxazolium-3'-sulfonate, Woodward *et al.*, «J. Am. Chem. Soc.», 83, 1010-1012 (1961)] dans 200 ml de pyridine anhydre. Ce mélange réactionnel est agité durant 10 jours à température ambiante.

Après filtration de l'excès de réactif et complète élimination du solvant, le résidu est dissous dans 90 ml d'un mélange chloroforme/méthanol 1/1 et précipité dans 450 ml d'acétone.

On obtient ainsi 7,2 g (81,8% du rendement théorique du produit recherché).

Ce produit est analysé par :

— Chromatographie en couche mince: effectuée sur plaques de Silicagel, le système solvant consistant en un mélange chloroforme/méthanol/ $\text{CaCl}_2$  à 0,3% (55/45/10); la valeur  $R_f$  du mélange d'esters internes est comprise entre 0,7 et 0,85. La valeur  $R_f$  des produits finalement obtenus dépasse la valeur  $R_f$  du mélange des composés de départ. Les résultats de la chromatographie montrent, par conséquent, l'absence de toute matière de départ dans les produits de réaction. Par traitement à l'aide d'une solution 0,1N de  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  à  $60^{\circ}\text{C}$  durant 1 heure, les liaisons esters sont clivées, et le ganglioside original est récupéré.

— Le spectre infrarouge des esters internes du mélange de gangliosides, effectué sur des pellets KBr, présente la raie d'absorption typique de l'ester à  $1750\text{ cm}^{-1}$ .

*Exemple 7 :*

8 g de  $\text{GM}_1$  (sel sodé) sont dissous dans 80 ml d'eau distillée et passés sur une colonne remplie de 10 g de Dowex 50w × 8 (forme pyridinium, 100 à 200 mesh, soit 0,29 à 0,15 cm).

Ce produit, rendu anhydre sous vide élevé, est dissous dans 200 ml de pyridine anhydre et est ajouté à une suspension de 1,26 g (5 mM) du réactif Zwitterionique de Woodward [N-éthyl-5-phényl-isoxazolium-3'-sulfonate] dans 200 ml de pyridine anhydre. Ce mélange réactionnel est agité durant 10 jours à température ambiante.

Après filtration de l'excès de réactif et complète élimination du solvant, le résidu est dissous dans 80 ml d'un mélange chloroforme/méthanol 1/1 et précipité dans 400 ml d'acétone.

On obtient ainsi 6,3 g (79,5% du rendement théorique du produit recherché).

Ce produit est analysé par :

— Chromatographie en couche mince: effectuée sur plaques de Silicagel, le système solvant consistant en un mélange chloroforme/méthanol/ $\text{CaCl}_2$  à 0,3% (55/45/10); la valeur  $R_f$  du mélange d'esters internes est comprise entre 0,7 et 0,85. La valeur  $R_f$  du produit final (0,70) dépasse la valeur  $R_f$  (0,65) du composé de départ. Les résultats de la chromatographie montrent, par conséquent, l'absence de toute matière de départ dans les produits de réaction. Par traitement à l'aide d'une solution 0,1N de  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  à  $60^{\circ}\text{C}$  durant 1 heure, la liaison ester est clivée et le ganglioside original est récupéré.

— Le spectre infrarouge de l'ester interne de  $\text{GM}_1$ , effectué sur des pellets KBr, présente la raie d'absorption typique de l'ester à  $1750\text{ cm}^{-1}$ .

*Propriétés pharmacologiques*

Quoique certains dérivés d'esters internes de gangliosides et des méthodes d'obtention de ces dérivés aient été discutés dans l'art antérieur, on ne connaît aucune description antérieure relative à l'activité biologique ou, éventuellement, à l'usage pharmaceutique des dérivés d'esters internes. Cependant, la présente invention a permis de constater que les dérivés d'esters internes de gangliosides ont une très forte activité dans le traitement de troubles du système nerveux et, en fait, ont une activité bien plus forte que celle des gangliosides eux-mêmes. Les dérivés d'esters internes de gangliosides peuvent être employés pour traiter une certaine variété de troubles nerveux et, notamment, des troubles du système nerveux central et périphérique, résultant de maladies ou d'accidents. Les composés peuvent également être employés en thérapie postopératoire après des opérations chirurgicales qui ont affecté les nerfs, telles que par exemple des opérations sur hémorroïdes.

Les propriétés pharmacologiques supérieures de dérivés d'esters internes de gangliosides qui sont l'objet de la présente invention peuvent être déterminées par comparaison avec des gangliosides à l'aide des essais suivants:

1. Bourgeonnement neuronal sur une ligne de cellule phéochromocytomes (PC<sub>12</sub>).
2. Activité (Na<sup>+</sup>,K<sup>+</sup>)ATPase de la membrane neuronale.
3. Récupération de l'électrorétinogramme après éblouissement.

1. *Effet des dérivés d'esters internes de gangliosides sur le bourgeonnement neuronal PC<sub>12</sub>*

*Matières et méthodes*

Les bourgeons ou le bourgeonnement neuronal peuvent être considérés comme une différenciation neuronale localisée, et le mécanisme biochimique à l'aide duquel les molécules de gangliosides produisent l'effet précipité peut être étudié par évaluation sur un modèle de culture de cellules *in vitro* (cellule PC<sub>12</sub>) dérivant du sous-clone 1A fourni par le D<sup>r</sup> P. Calissano [C.N.R., Laboratorio di Biologia Cellulare, Rome, Italie, «Gangliosides in Neurological and Neuromuscular Function, Development and Repair», éd. par M. M. Rapport and A. Gorio, Raven Press, New York (1981)]. Dans ce modèle, des gangliosides ou dérivés des esters internes de gangliosides sont ajoutés au milieu de culture PC<sub>12</sub> en même temps que le facteur de croissance du nerf (NGF) (un inducteur spécifique de différenciation PC<sub>12</sub> pour stimuler le bourgeonnement neuronal). Le bourgeonnement neuronal, stimulé par les gangliosides, peut alors être comparé à celui qui est stimulé par les dérivés d'esters internes de gangliosides.

De façon spécifique, les cellules (100 000/plaque) sont maintenues à 37° C dans un incubateur de type Heraeus (95% d'air humidifié et 5% de CO<sub>2</sub>) et plaquées sur une culture d'un tissu revêtu de collagène, 60 mm de plaques dites «Integrid Falcon», en présence du milieu de culture suivant:

- 85% de RPM 1640 (Gibco),
- 10% d'un sérum de cheval inactivé à la chaleur (Gibco),
- 5% de sérum de veau fœtal (Gibco),
- 50 U/ml de pénicilline, et
- 25 mg/l de streptomycine.

Le milieu est changé toutes les 48 heures.

Dans de telles conditions, les cellules se divisent mais ne forment pas de neurons. L'addition de NGF (50 ng/ml) produit l'arrêt de la prolifération des cellules, la formation de neurons et se différencie dans les 5 à 10 jours. Cet effet est déterminé par comptage du nombre de cellules comportant des neurones à partir du 5<sup>e</sup> jour et ensuite tous les 2 jours.

Les gangliosides et leurs dérivés (1 mM) sont ajoutés au milieu de culture simultanément avec NGF, et leur effet est déterminé au 7<sup>e</sup> et 9<sup>e</sup> jours par comptage du nombre de cellules contenant des bourgeons neuronaux.

*Résultats*

Les résultats des essais comparatifs sur le bourgeonnement neuronal sont résumés dans le tableau I ci-après.

Les résultats obtenus montrent que les dérivés d'esters internes de gangliosides selon la présente invention ont la capacité de stimuler le bourgeonnement neuronal et se révèlent être plus actifs que les gangliosides pour produire cet effet, à la fois au 7<sup>e</sup> jour et au 9<sup>e</sup> jour.

Tableau I

Effet des dérivés de gangliosides sur le bourgeonnement neuronal de cellules PC<sub>12</sub>

Composé	Ligne de cellule	Milieu	Concentration	Pourcentage du nombre de cellules comportant des bourgeons	
				après 7 jours	après 9 jours
Témoin	PC <sub>12</sub>	85% RPM 1640 10% de sérum de cheval inactivé à la chaleur 5% de sérum de veau fœtal 50 U/ml de pénicilline 25 mg/ml de streptomycine		31	35,7
Gangliosides	PC <sub>12</sub>	85% RPM 1640 10% de sérum de cheval inactivé à la chaleur 5% de sérum de veau fœtal 50 U/ml de pénicilline 25 mg/ml de streptomycine	1 mM	49,5	62,3
Esters internes de gangliosides	PC <sub>12</sub>	85% RPM 1640 10% de sérum de cheval inactivé à la chaleur 5% de sérum de veau fœtal 50 U/ml de pénicilline 25 mg/ml de streptomycine	1 mM	56,3	69,2

2. *Effet des dérivés de gangliosides sur l'activité (Na<sup>+</sup>,K<sup>+</sup>)ATPase de la membrane neuronale*

La capacité de gangliosides ou de dérivés d'esters internes de gangliosides à activer l'enzyme (Na<sup>+</sup>,K<sup>+</sup>)ATPase de la membrane peut être déterminée *in vitro* sur une préparation de membrane neuronale («J. of Neurochem.», cité ci-dessus).

*Matières et méthodes*

a) Préparation d'une fraction mitochondrique brute d'une cerelle de rat (fraction P<sub>2</sub>)

Le procédé utilisé pour préparer la fraction P<sub>2</sub> dérive de celui de Morgan *et al.*, «Biochem. Biophys. Acta», 241, 737 (1971). (Toutes les opérations sont effectuées à 0-4° C, les valeurs × g étant les moyennes des forces centrifuges.) Des rats mâles adultes de race Sprague Dawley (provenant de Charles River), pesant 150 à 175 g chacun, sont décapités et leurs cervelles rapidement retirées et lavées à l'aide d'une solution isotonique glacée. Après excision du cérébellum, les cervelles sont homogénéisées par 12 va-et-vient d'un homogénéiseur en verre Téflon, fonctionnant à l'aide d'un moteur (jeu radial prévu 0,25 mm; 800 tours/min), faisant emploi de 4 volumes

de la solution d'homogénéisation (0,32 mole de sucrose, contenant 1 mM d'un tampon de phosphate de potassium et 0,1 nM d'EDTA bisodé, pH 7,27). L'homogénat est dilué à 10% (poids en volume) et la solution homogénéisée est filtrée à travers quatre couches d'un tamis en tissu (type utilisé pour la filtration du fromage) et centrifugée à une valeur de  $1000 \times g$  durant 15 minutes.

Le pellet résultant est lavé à l'aide du même volume qu'au départ de solution homogénéisée, et centrifugé ainsi qu'il est indiqué ci-dessus. Les surnageants combinés sont centrifugés à  $17\,500 \times g$  durant 25 min (ces conditions gravitationnelles sont employées afin d'obtenir le maximum d'enrichissement des extrémités de nerfs de la fraction) et le pellet est lavé à quatre reprises par 9 volumes (à chaque fois) d'une solution homogénéisée, puis centrifugé ( $17\,500 \times g$  durant 25 min). Le pellet final, que l'on appelle «Fraction P<sub>2</sub>», contient, en tant que constituant majeur, des mitochondries non cassées et des extrémités de nerfs. Le pellet final est resuspendu de façon homogène dans un volume approprié d'une solution homogénéisée à l'aide de l'homogénéisateur en verre Téflon précité, puis est immédiatement utilisé pour le test. Afin d'éviter des erreurs résultant du stockage, des fractions fraîches de P<sub>2</sub> sont toujours préparées préalablement à l'emploi.

Les préparations de fraction de P<sub>2</sub> présentent une teneur en gangliosides de  $33,9 \pm 2,8$  (S.D.) nmoles liées à NeuAc/mg de protéine.

#### b) Test ATPase

L'activité ATPase est déterminée par spectrophotométrie selon la méthode de Wallick *et al.* [«J. Pharm. Exptl. Therap.», 189, 434 (1974)].

Le mélange réactionnel, à moins qu'il ne soit indiqué autrement, est formé de:

— 50 mM de sucrose

— 0,2 mM d'EDTA bisodé (ajusté à un pH de 7,4)  
 — 100 mM de NaCl  
 — 5 mM de MgCl<sub>2</sub>  
 — 10 mM de KCl  
 — 2 mM de sel monopotassique de phospho(énol)pyruvate (PEP) (ajusté à pH 7,4)  
 — 3 mM d'ATP  
 — 50 mM de TRIS-HCl (à pH 7,4)  
 — 0,33 mM de NADH  
 — 30 µg/ml de pyruvate-kinase (PK) et  
 — 10 µg/ml de lactate-déhydrogénase (LDH)

pour atteindre un volume final de 3 ml et un pH final de 7,2.

La réaction est mise en œuvre par addition de 50 à 75 µg (sous forme de protéine) de la fraction P<sub>2</sub>. L'activité (Na<sup>+</sup>,K<sup>+</sup>)ATPase est obtenue par la différence entre l'ATPase totale et l'ATPase dépendante Mg<sup>2+</sup> déterminée en présence de  $3 \times 10^{-5}$  M d'ouabaine. La durée requise pour chaque test individuel est de 3 à 5 minutes.

L'activité ATPase est exprimée dans le système d'Unités internationales (µmoles ATP hydrolysées/mg de protéine/minute).

L'activité des dérivés de gangliosides (50 nM) est déterminée avant l'incubation sur les membranes neuronales à 37° C durant deux heures.

#### Résultats

Les résultats des tests comparatifs d'activité ATPase sont résumés dans le tableau II ci-après.

Les résultats obtenus montrent que les dérivés d'esters internes de gangliosides selon la présente invention ont la capacité d'activer l'enzyme de membrane neuronale (Na<sup>+</sup>,K<sup>+</sup>)ATPase, et se sont révélés être bien plus efficaces que les gangliosides dans les mêmes conditions de concentration molaire.

Tableau II  
Effet des dérivés de gangliosides sur l'ATPase (Na<sup>+</sup>,K<sup>+</sup>) de la membrane neuronale

Composé	Durée d'incubation	Température d'incubation	Concentration (nM)	% d'augmentation de l'activité (Na <sup>+</sup> ,K <sup>+</sup> )ATPase
Témoin	120 min	37° C	—	100
Gangliosides	120 min	37° C	50	142
Esters internes de gangliosides	120 min	37° C	50	174

### 3. Effet des dérivés de gangliosides sur la récupération de l'électro-rétinogramme endommagé par éblouissement

La capacité des gangliosides ou des dérivés d'esters internes de gangliosides d'accélérer la récupération de l'activité électrique rétinale peut être évaluée après occasionnement de dommages physiques (éblouissement) à des lapins. Dans ce modèle, les gangliosides ou les dérivés d'esters internes de gangliosides sont administrés par voie parentérale (intraveineuse) [«Int. Symposium on the Neurochemistry of the Retina», Athènes, 28 août - 1<sup>er</sup> septembre (1979) (Communication); «Satellite Meeting on Biochemical and Pharmacological Implications of Gangliosides Functions», Cortona, 28-31 août (1975) (Communications)].

#### Méthodes et matières

Des lapins de Nouvelle-Zélande, dont le poids est de l'ordre de 1,9 à 2 kg, sont employés [«Int. Symp. on the Neurochemistry of the Retina», Athènes, 28 août - 1<sup>er</sup> septembre (1979)].

L'anesthésie de la cornée est induite par une application topique de 0,4% de novésine. L'électrorétinogramme est enregistré par application d'une électrode cornéale (selon Henkes) fixée à un dispositif à succion douce. L'électrode de référence est formée d'une aiguille insérée de façon sous-cutanée dans la zone frontale.

Les appareils suivants sont utilisés:

un amplificateur de courant alternatif de marque Tektronics 5A22N (10 Hz filtres à courant continu);  
 un analyseur Biomedica Neuroaverager 1172 OTE;  
 un appareil d'enregistrement à lignes XY, de type L800 Linseis;  
 un photostimulateur Biomedica 1273 OTE.

La photostimulation est effectuée à l'aide de cinq éclairs de 0,2 watt/seconde, pendant une durée de 10 secondes et 0,5 hertz de fréquence. La durée de base de l'enregistrement est de 100 ms (pré-réglage = 5).

Les animaux sont maintenus dans une enceinte sombre durant 30 min pour s'adapter aux conditions d'obscurité, d'air, de température et de bruit constant.

Les déterminations suivantes sont effectuées:

1. Trois contrôles de base, toutes les 15 min, sont effectués sur tous les animaux. La moyenne des ondes a + b (pic à pic) est calculée.

2. Les animaux sont alors soumis à un éblouissement durant 20 secondes par utilisation d'une lampe Schott Mainz KL150B, disposée à une distance de 1 cm de l'électrode de cornée.

Tableau III

Effet des dérivés de gangliosides sur la récupération de l'électrorétinogramme

Composé	Animaux	Dosage i.v.	% de récupération ERG par rapport au témoin		
			20 min	40 min	60 min
Gangliosides	Lapin	33 nmoles/kg	+ 5	+ 9,0	+ 13,0
Esters internes de gangliosides	Lapin	33 nmoles/kg	+ 8	+ 12,7	+ 20,5

Après cette période, la récupération de l'électrorétinogramme (ERG) est déterminée par mesure de l'amplitude d'ERG à 20, 40 et 60 minutes après la période d'éblouissement. Cela permet de déterminer les conditions de base qu'il faut appliquer à l'animal.

Les animaux sont alors traités ultérieurement avec des composés et, 30 min après, ils sont à nouveau soumis à un éblouissement, et on enregistre ERG dans les conditions identiques à celles indiquées ci-dessus.

Les composés sont administrés à raison de 33 nmoles/kg par injection intraveineuse.

#### Résultats

Les résultats des essais comparatifs sur le taux de récupération de l'électrorétinogramme sont résumés dans le tableau III ci-dessus.

Les résultats ainsi obtenus montrent que les dérivés de l'ester interne de la présente invention augmentent la récupération de l'électrorétinogramme et montrent qu'une plus grande activité est obtenue pour les gangliosides pour tous les essais effectués.

#### Utilisation thérapeutique

Les dérivés d'esters internes de gangliosides de la présente invention peuvent être utilisés en tant que médicaments pour différentes thérapies de traitement du système nerveux, notamment du traitement des troubles nerveux périphériques et des pathologies du système nerveux central. Plus particulièrement, les dérivés d'esters internes de gangliosides peuvent être utilisés dans le traitement de troubles du système nerveux périphérique dus à des causes toxico-infectieuses, dégénératives, compressives ou traumatiques, en vue de la stimulation de la régénération nerveuse et la récupération de la fonction neuromusculaire ou le traitement de désordres du système nerveux central provenant de causes toxico-infectieuses, dégénératives, anoxiques ou traumatiques en vue de la stimulation du bourgeonnement neuronal pour la récupération fonctionnelle.

Ces troubles ou lésions ont, jusqu'à présent, été traités à l'aide des gangliosides; cependant, les tests décrits ci-dessus montrent que les dérivés d'esters internes de gangliosides ont une activité bien supérieure à celle des gangliosides eux-mêmes.

Les composés des esters internes de gangliosides selon la présente invention peuvent être utilisés en tant que médicaments dans des préparations pharmaceutiques administrées aux humains ou aux animaux par voie intramusculaire, sous-cutanée ou intradermique, par injection intraveineuse ou infusion. Les préparations peuvent être des solutions des composés ou encore une poudre lyophilisée des composés associés à un ou plusieurs supports ou diluants pharmaceutiquement acceptables et contenus dans des milieux tamponnés, à un pH défini, et dans des fluides physiologiques iso-osmotiques. Le dosage administré dépendra de l'effet recherché et des zones d'administration choisies. Par exemple (ce qui n'est pas limitatif), la dose peut être comprise entre 0,05 et 5 mg du composé actif par kilo de poids par jour, à raison de doses unitaires entre 0,05 et 2 mg/kg de poids du corps.

Les compositions thérapeutiques selon la présente invention sont en général préparées à l'aide d'un mélange de différents dérivés d'esters internes de gangliosides, mais peuvent être également préparées de façon à ne contenir qu'un seul de ces dérivés actifs isolés.

Par exemple, à titre illustratif, le tableau IV ci-après montre certaines préparations de compositions pharmaceutiques susceptibles d'être utilisées et préparées sous la forme d'une solution pour le traitement de troubles ou de désordres du système nerveux.

Les préparations consignées dans ce tableau IV peuvent être directement administrées aux animaux ou humains par n'importe laquelle des voies précitées. En addition, les compositions peuvent contenir d'environ 2% à environ 50% en poids de substance active.

Tableau IV

Exemples de solutions injectables de la composition pharmaceutique selon l'invention

Préparation N° 1 – une ampoule de 2 ml contient :

— substance active	5 mg
— chlorure de sodium	16 mg
— tampon à base de citrate ayant un pH 6 dans du pyrogène distillé exempt d'eau	q.s.p. 2 ml

Préparation N° 2 – une ampoule de 2 ml contient :

— substance active	50 mg
— chlorure de sodium	16 mg
— tampon à base de citrate ayant un pH 6 dans du pyrogène distillé exempt d'eau	q.s.p. 2 ml

Préparation N° 3 – une ampoule de 4 ml contient :

— substance active	100 mg
— chlorure de sodium	32 mg
— tampon à base de citrate ayant un pH 6 dans du pyrogène distillé exempt d'eau	q.s.p. 4 ml

Encore à titre d'exemple illustratif, le tableau V montre certaines préparations à base d'une composition pharmaceutique, susceptibles d'être faites extemporanément pour le traitement de lésions ou troubles du système nerveux. Ces systèmes à base de composition pharmaceutique sont préparés extemporanément à l'aide des deux volumes.

Dans le premier conteneur, la substance active introduite contient environ 10 à 90% en poids d'une poudre lyophilisée de la substance active en même temps qu'un excipient convenable du point de vue pharmaceutique tel que glycine et mannitol.

Dans le deuxième conteneur est introduit un deuxième solvant contenant la quantité requise de solvant, tel que chlorure de sodium et tampon à base de citrate.

Juste avant l'administration, les contenus des deux conteneurs sont mélangés et la poudre à base de substance active lyophilisée se dissout rapidement pour produire une solution injectable. La préparation de composition pharmaceutique comprenant un premier conteneur contenant la poudre lyophilisée de substance active est la composition pharmaceutique qui est utilisée de préférence dans le cadre de la présente invention, car la substance active à base de dérivés d'esters internes de gangliosides est plus stable dans cet état que lorsqu'elle est sous forme de solutions.

Tableau V

Exemple de préparation extemporanée  
de compositions pharmaceutiques

Préparation N° 1		5 Préparation N° 4	
a) 2 ml de lyophilisat contiennent:		a) une ampoule de lyophilisat de 3 ml contient:	
— substance active	5 mg	— substance active	50 mg
— glycine	30 mg	— mannitol	20 mg
b) une ampoule de 2 ml contient:		b) une ampoule de 3 ml contient:	
— chlorure de sodium	16 mg	— chlorure de sodium	24 mg
— tampon à base de citrate		— tampon à base de citrate	
dans du pyrogène distillé exempt d'eau	q.s.a. 2 ml	dans du pyrogène distillé exempt d'eau	q.s.a. 3 ml
Préparation N° 2		15 Préparation N° 5	
a) 3 ml de lyophilisat contiennent:		a) une fiole de lyophilisat de 5 ml contient:	
— substance active	5 mg	— substance active	100 mg
— mannitol	40 mg	— glycine	50 mg
b) une ampoule de 2 ml contient:		b) une ampoule de 4 ml contient:	
— chlorure de sodium	16 mg	— chlorure de sodium	32 mg
— tampon à base de citrate		— tampon à base de citrate à pH 6	
dans du pyrogène distillé exempt d'eau	q.s.a. 2 ml	dans du pyrogène distillé exempt d'eau	q.s.a. 4 ml
Préparation N° 3		25 Préparation N° 6	
a) une ampoule de lyophilisat de 3 ml contient:		a) une fiole de lyophilisat de 5 ml contient:	
— substance active	50 mg	— substance active	100 mg
— glycine	25 mg	— mannitol	40 mg
b) une ampoule de 3 ml contient:		b) une ampoule de 4 ml contient:	
— chlorure de sodium	24 mg	— chlorure de sodium	32 mg
— tampon à base de citrate		— tampon à base de citrate à pH 6	
dans du pyrogène distillé exempt d'eau	q.s.a. 3 ml	dans du pyrogène distillé exempt d'eau	q.s.a. 4 ml