

Brevet N°

du 3 août 1982

Titre délivré : 28 FEV. 1983

GRAND-DUCHÉ DE LUXEMBOURG



Monsieur le Ministre
de l'Économie et des Classes Moyennes
Service de la Propriété Intellectuelle
LUXEMBOURG

Demande de Brevet d'Invention

I. Requête

La soc.dite : FIDIA S.p.A., via Ponte Della Fabbrica 12, I - 35031
Abano Terme (Padova), Italie, représentée par M. FREYLINGER Ernest T.
& MEYERS Ernest, ing.cons.en propr.ind., 46 rue du Cimetière, Luxembourg, (2)
agissant en qualité de mandataires

dépose(nt) ce trois août mil neuf cent quatre-vingt-deux (3)
à 15.00 heures, au Ministère de l'Économie et des Classes Moyennes, à Luxembourg :

1. la présente requête pour l'obtention d'un brevet d'invention concernant : (4)
" Procédé de préparation de dérivés d'esters internes de gangliosides
et compositions pharmaceutiques contenant ces dérivés "

2. la délégation de pouvoir, datée de _____ le _____
3. la description en langue française de l'invention en deux exemplaires;
4. _____ / _____ planches de dessin, en deux exemplaires;
5. la quittance des taxes versées au Bureau de l'Enregistrement à Luxembourg,
le vingt-huit juillet mil neuf cent quatre-vingt-deux

déclare(nt) en assumant la responsabilité de cette déclaration, que l'(es) inventeur(s) est (sont) :
Francesco DELLA VALLE, via Cerato 14, I - Padova (5)
et
Aurelio ROMEO, viale Ippocrate 93, I - Roma

revendique(nt) pour la susdite demande de brevet la priorité d'une (des) demande(s) de
(6) brevet déposée(s) en (7) USA
le quatre août mil neuf cent quatre-vingt-un sous le no. 290 106 (8)

au nom de MM. Francesco DELLA VALLE et Aurelio ROMEO (9)

élit(élisent) pour lui (elle) et, si désigné, pour son mandataire, à Luxembourg
46 rue du Cimetière (10)

sollicite(nt) la délivrance d'un brevet d'invention pour l'objet décrit et représenté dans les
annexes susmentionnées, — avec ajournement de cette délivrance à // mois. (11)
Xe l'un des mandataires

II. Procès-verbal de Dépôt

La susdite demande de brevet d'invention a été déposée au Ministère de l'Économie et des
Classes Moyennes, Service de la Propriété Intellectuelle à Luxembourg, en date du :

3 août 1982

à 15.00 heures



Pr. le Ministre
de l'Économie et des Classes Moyennes,
p. d.

A 68007

(1) Nom, prénom, firme, adresse — (2) s'il a lieu «représentée par» agissant en qualité de mandataire — (3) date du dépôt
en toutes lettres — (4) titre de l'invention — (5) noms et adresses — (6) brevet, certificat d'addition, modèle d'utilité — (7)
pays — (8) date — (9) déposant originaire — (10) adresse — (11) 6, 12 ou 18 mois.

Revendication de la priorité d'une demande de
brevet déposée aux USA le 4 août 1981 sous le
no. 290 106

BL-3347/vdw

BREVET D'INVENTION

FIDIA S.p.A.
via Ponte Della Fabbrica 12
I - 35031 Abano Terme (Padova)

" Procédé de préparation de dérivés d'esters internes de
gangliosides et compositions pharmaceutiques
contenant ces dérivés "

PROCEDE DE PREPARATION DE DERIVES D'ESTERS INTERNES DE GANGLIOSIDES
ET COMPOSITIONS PHARMACEUTIQUES CONTENANT CES DERIVES.

La présente invention a pour objet un procédé de préparation de dérivés d'esters internes de gangliosides, et se rapporte à des compositions pharmaceutiques contenant de tels dérivés. Les compositions pharmaceutiques selon la présente invention sont utilisées pour le traitement de troubles du système nerveux résultant d'accidents ou d'affections ayant entraîné une lésion du tissu nerveux.

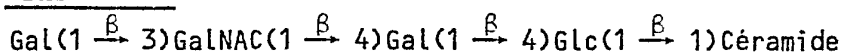
Les gangliosides forment un groupe de glycosphingolipides et présentent une structure dont une partie est un hydrate de carbone auquel est liée une céramide et le résidu d'un acide sialique. La partie correspondant à l'hydrate de carbone comporte au moins un résidu galactose ou glucose et au moins un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

15	une mole d'un acide sialique	{	— une mole de céramide
			— au moins une mole de galactose ou de glucose
			— au moins une mole de N-acétylglucosamine ou de N-acétylgalactosamine

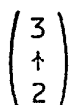
20 dans laquelle tous les résidus sont liés par une liaison glucosidique.

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-acétyl-neuraminique (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:

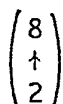
G_{D1b} (16%)



5



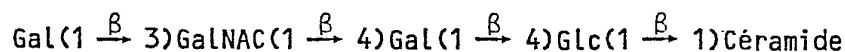
NANA



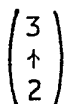
10

NANA

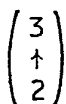
G_{T1b} (19%)



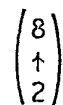
15



NANA



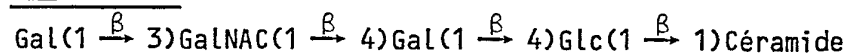
NANA



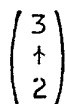
20

NANA

G_{M1} (21%)

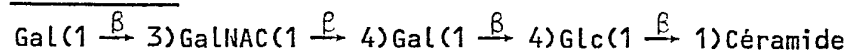


25

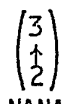


NANA

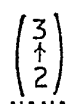
G_{D1a} (40%)



30



NANA



NANA

— schémas dans lesquels :

Glc représente le glucose,

GalNAC représente la N-acétylgalactosamine,

35 Gal représente le galactose,

NANA représente l'acide N-acétyl-neuraminique,

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 —

- 5 [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);
10 Minerva Medica, 69, 3277, (1978);
Minerva Stomat., 27, 177, (1978);
Med. del Lavoro, 68, 296 (1977);
Brain Res. 197, 236, (1980)].

- 15 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 $(Na^+, K^+)ATPase$ [Brain Res., 197, 236, (1980); Leon et al. J. of Neurochem., 37, 350 (1981)].

- 20 Les bourgeons des nerfs stimulés par les gangliosides favorisent alors la 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.

- 25 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 tel que l'enzyme $(Na^+, K^+)ATPase$. De façon spécifique, on a constaté que les dérivés d'esters internes de gangliosides sont particulièrement actifs
30 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
35 $(Na^+, K^+)ATPase$ impliquée dans la conduction du nerf.

Seuls certains des dérivés d'esters internes possibles des gangliosides ont jusqu'à présent été isolés, ceci 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 à 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:

10

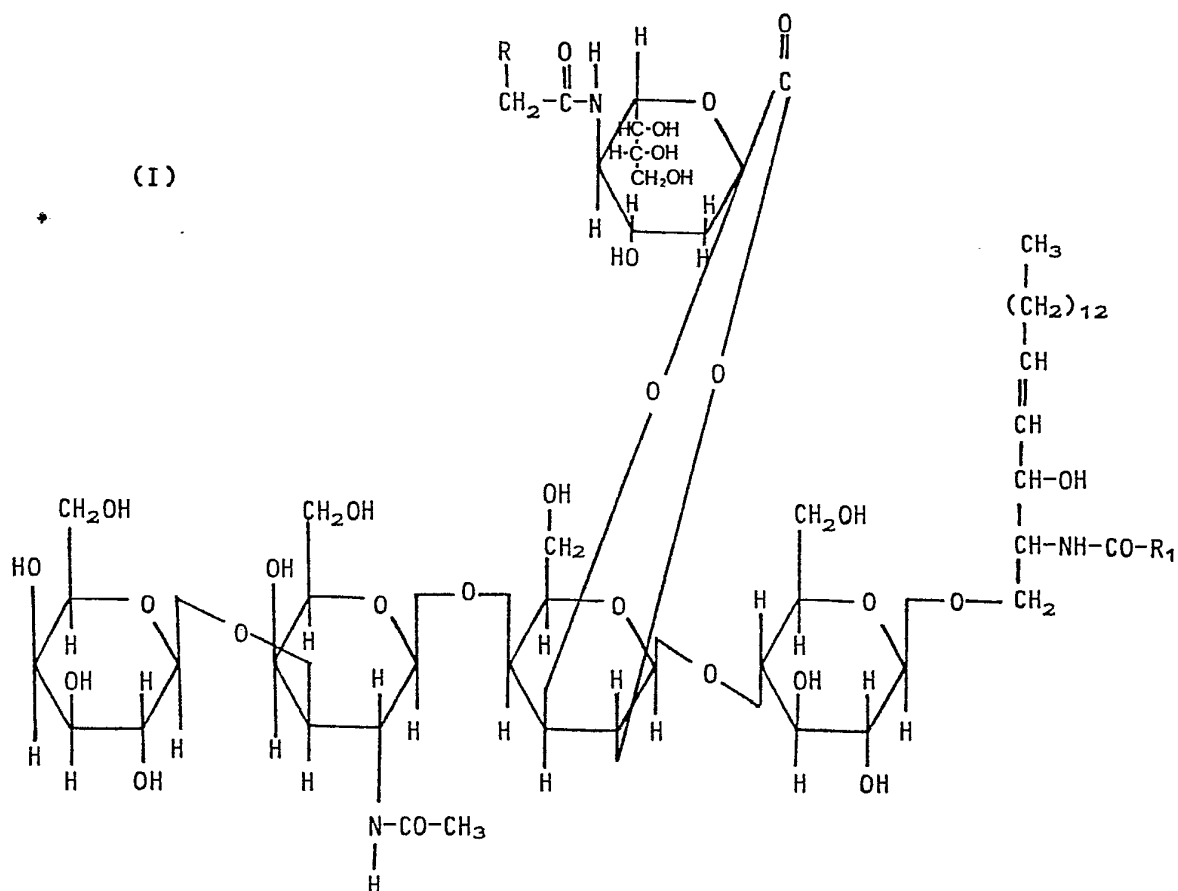
15

20

25

30

(I)



dans laquelle

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

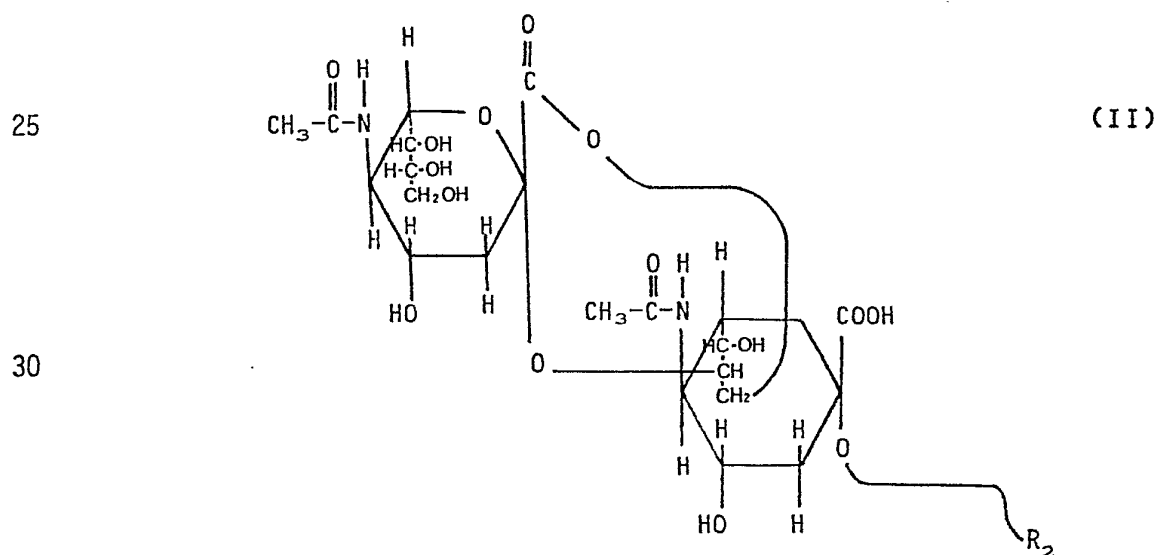
Le dérivé d'ester interne de ganglioside (I) est un exemple d'un dérivé dans lequel le groupe carboxyle de l'acide sialique est lié par un ester à un groupe hydroxyle de l'un des résidus d'hydrates de carbone, plus spécifiquement le galactose. La formation de la liaison d'ester interne en même temps 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:

20

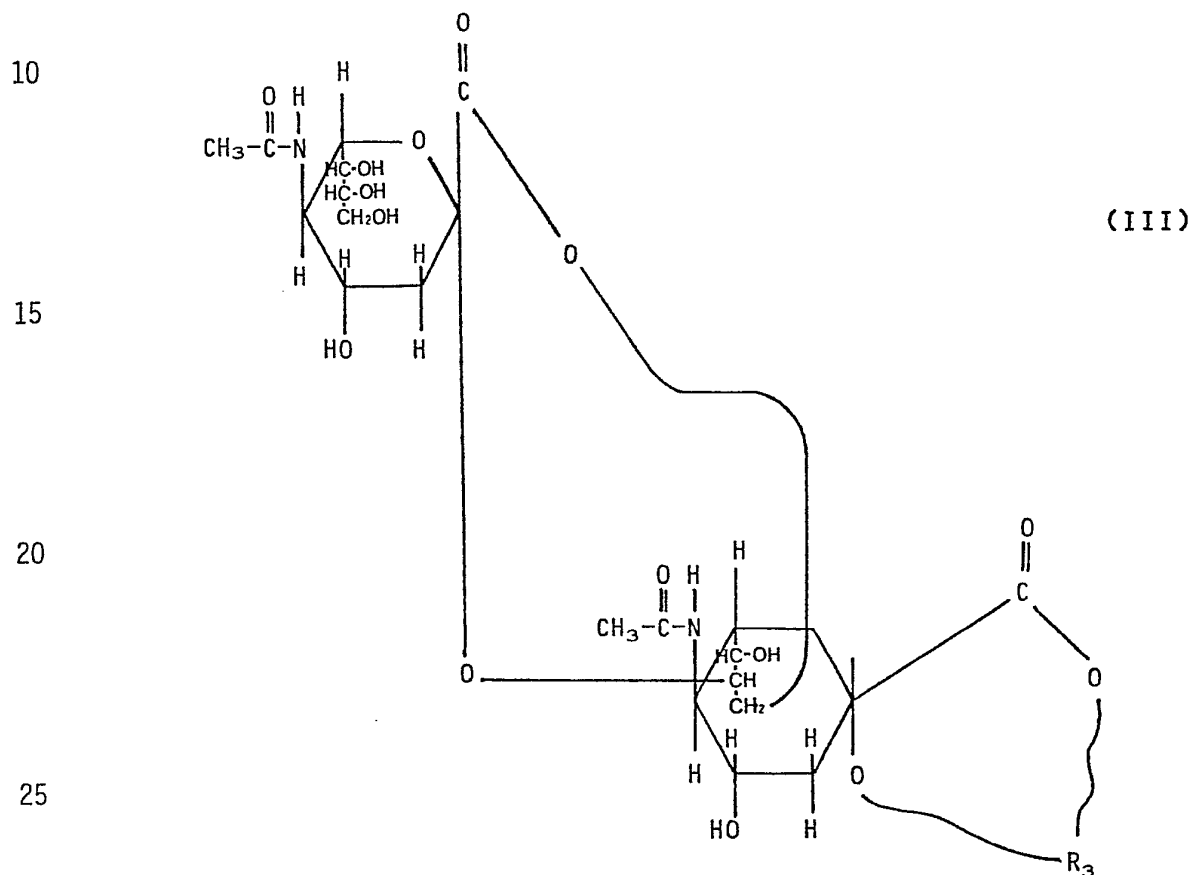


dans laquelle:

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:

5



dans laquelle:

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

35

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 nombreuses 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 une 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.

PROCEDE DE PREPARATION

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

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)].

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 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 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.

Le procédé selon la présente invention consiste à faire réagir des gangliosides avec un réactif de lactonisation dans un solvant organique non-aqueux sous conditions anhydres. Des solvants organiques convenables susceptibles d'être utilisés dans la présente invention sont notamment les

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-méthyl-pyridinium, 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 5g de ce mélange sont dissous dans 50 ml de DMSO. Ensuite, 4g 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 1,5g 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 4,6g 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 cm^{-1} .

5 — Chromatographie en couche mince: Effectuée sur des plaques de silica gel, 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 finaux dépasse la valeur R_f du mélange des composés de départ.

10 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 Na_2CO_3 à 60°C durant 1 heure, les liaisons esters sont clivées, et le mélange original des gangliosides de départ
15 peut être obtenu.

EXEMPLE 2

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

20 Ce produit, rendu anhydre sous vide élevé, est dissout (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-méthyl-pyridinium
25 (dont l'anion peut, par exemple, consister en iodure, toluène-4-sulfonate, trifluorométhane sulfonate, etc.), sous agitation continue et maintien à température constante de 45°C .

Cette réaction est effectuée durant 18 heures à 45°C .

30 Le réactif en excès est séparé par filtration et le mélange est concentré dans un courant d'azote; le résidu est redissout 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 7,9g (89,7% du rendement théorique du produit recherché).

35 — Chromatographie en couche mince: Effectuée sur des plaques de gel de silice, le système solvant consistant en un mélange chloroforme/méthanol/ 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 finaux 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 Na_2CO_3 à 60°C durant 1 heure, les liaisons estérées sont clivées, et le mélange original des gangliosides de départ
5 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 cm^{-1} .

EXEMPLE 3

10 8g de GM_1 (sel sodé) sont dissous dans 80 ml d'eau distillée, et passés dans une colonne remplie de 10g de Dowex 50 w $\times$ 8 (forme triéthylammoniée, 100 à 200 mesh, soit 0,29 à 0,15cm).

Ce produit, rendu anhydre sous vide élevé, est dissout (à l'aide d'un bain de sonication) dans 200 ml de tétrahydrofurane anhydre contenant 4 ml de triéthylamine.
15

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

Cette réaction est effectuée durant 18 heures à 45°C.

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

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

Ce produit est analysé par:

— Chromatographie en couche mince: Effectuée sur plaques de silica gel, le système solvant consistant en un mélange chloroforme/méthanol/ CaCl_2 à 0,3% (55/45/10); la valeur R_f du produit final (0,70) dépassant la valeur de R_f (0,65) du composé de départ.
30

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 Na_2CO_3 à 60°C durant 1 heure, la liaison
35 ester est clivée et le ganglioside original est récupéré.

— Le spectre infrarouge de l'ester interne de GM_1 , effectué sur des pellets de KBr, présente la raie typique d'absorption de l'ester à 1750 cm^{-1} .

EXEMPLE 4

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

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

Ce mélange est maintenu au reflux durant 3 heures; la colonne de reflux est refroidie à -10°C et est pourvue d'une valve d'anhydrification.

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

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

Ce produit est analysé par:

15 — Chromatographie en couche mince: Effectuée sur plaques de silica gel, le système solvant consistant en un mélange chloroforme/méthanol/ 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 finaux dépasse la valeur R_f du mélange des composés de départ.

20 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 Na_2CO_3 à 60°C durant 1 heure, les liaisons estérées sont clivées, et le ganglioside original est récupéré.

25 — 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 cm^{-1} .

EXEMPLE 5

30 8,0g de GM_1 (sel sodé) sont dissous dans 80 ml d'eau distillée, et passés dans une colonne remplie de 10g de Dowex 50 w $\times$ 8 (forme pyridinium, 100 à 200 mesh soit 0,29 à 0,15cm).

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

35 Ce mélange est maintenu au reflux durant 3 heures; la colonne de reflux est refroidie à -10°C et est pourvue d'une valve d'anhydrification.

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

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

Ce produit est analysé par:

— Chromatographie en couche mince: Effectuée sur plaques de silica gel, le système solvant consistant en un mélange chloroforme/méthanol/ 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 Na_2CO_3 à 60°C durant 1 heure, la liaison ester est clivée et le ganglioside original est récupéré.

— Le spectre infrarouge de l'ester interne de GM_1 , effectué sur des pellets KBr, présente la raie d'absorption typique de l'ester à 1750 cm^{-1} .

EXEMPLE 6

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

Ce produit, rendu anhydre sous vide élevé, est dissout dans 200 ml de pyridine anhydre et est ajouté à une suspension de 5,52g (10 mM) du réactif Zwitterionique de Woodward [N-ethyl-5-phenylisoxazolium-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 dissout dans 90 ml d'un mélange chloroforme/méthanol 1/1 et précipité dans 450 ml d'acétone.

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

Ce produit est analysé par:

— Chromatographie en couche mince: Effectuée sur plaques de silica gel, le système solvant consistant en un mélange chloroforme/méthanol/ 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 finaux 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 Na_2CO_3 à 60°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 cm^{-1} .

EXEMPLE 7

8g de GM₁ (sel sodé) sont dissouts dans 80 ml d'eau distillée, et passés sur une colonne remplie de 10g de Dowex 50 w × 8 (forme pyridinium, 100 à 200 mesh) 0,29 à 0,15cm.

5 Ce produit, rendu anhydre sous vide élevé, est dissout dans 200 ml de pyridine anhydre, et est ajouté à une suspension de 1,26g (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.

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

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

Ce produit est analysé par:

15 — Chromatographie en couche mince: Effectuée sur plaques de silica gel, le système solvant consistant en un mélange chloroforme/méthanol/CaCl₂ à 0,3% (55/45/10); la valeur R_f du produit final (0,70) dépasse la valeur R_f (0,65) du composé de départ.

20 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 Na₂CO₃ à 60°C durant 1 heure, la liaison ester est clivée et le ganglioside original est récupéré.

— Le spectre infrarouge de l'ester interne de GM₁, effectuée sur des pellets KBr, présente la raie d'absorption typique de l'ester à 1750 cm⁻¹.



PROPRIETES PHARMACOLOGIQUES

Quoique certains dérivés d'esters internes de gangliosides et des méthodes d'obtention de ces dérivés ont 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 post-opératoire 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 cellules phéocromocytome (PC₁₂).
- 2 — Activité (Na⁺K⁺)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 PC₁₂ —

• 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 PC₁₂ dérivant du sous-clone 1A fourni par le Dr P. Calissano

[C.N.R. — Laboratorio di Biologia Cellulare — Roma, Italy] —

["Gangliosides in Neurological and Neuromuscular Function, Development

and Repair", Ed. by 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 PC₁₂ en même temps que le facteur de croissance du nerf (NGF) (un inducteur spécifique de différenciation PC₁₂ 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 CO₂) 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 foetal (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 neurones. L'addition de NGF (50 ng/ml) produit l'arrêt de la prolifération des cellules, la formation de neurones 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 5ème 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 7ème et 9ème 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 7ème jour et au 9ème jour.





TABEAU I

Effet des dérivés de gangliosides sur le bourgeonnement neuronal de cellules PC₁₂.

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

2 — Effet des dérivés de gangliosides sur l'activité $(Na^+,K^+)ATPase$ de la membrane neuronale —

La capacité de gangliosides ou de dérivés d'esters internes de gangliosides à activer l'enzyme $(Na^+,K^+)ATPase$ 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 cervelle de rat (Fraction P_2).

Le procédé utilisé pour préparer la fraction P_2 dérive de celui de Morgan et al, Biochem. Biophys. Acta 241, 737 (1971). (Toutes les opérations sont effectuées à 0-4°C; les valeurs $\times g$ étant les moyennes des forces centrifuges). Des rats mâles adultes de race Sprague Dawley (provenant de Charles RIVER), pesant 150 à 175g chacun) sont décépités 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 tour/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 mM 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 (du 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 centrifugée 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_2 " 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'homogénéiseur en verre Téflon précité, puis est immédiatement utilisé pour le test. Afin d'éviter des erreurs résultant du stockage, des fractions fraîches de P_2 sont toujours préparées préalablement à l'emploi.

Les préparations de fraction de P_2 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
 5 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,
 10 — 5 mM de $MgCl_2$,
 — 10 mM de KCl,
 — 2 mM de sel monopotassique de phospho(enol)pyruvate (PEP) (ajusté à pH 7,4),
 — 3 mM d'ATP,
 — 50 mM de TRIS-HCl (à pH 7,4),
 15 — 0,33 mM de NADH,
 — 30 $\mu g/ml$ de pyruvate-kinase (PK), et
 — 10 $\mu g/ml$ de lactate-déhydrogénase (LDH),
 pour atteindre un volume final de 3 ml et un pH final de 7,2.
 La réaction est mise en oeuvre par addition de 50 à 75 μg (sous forme de
 20 protéine) de la fraction P_2 . L'activité $(Na^+, K^+)ATPase$ est obtenue par
 la différence entre l'ATPase totale et l'ATPase dépendante Mg^{2+} déterminée
 en présence de 3×10^{-5} M d'ouabaïne. La durée requise pour chaque test
 individuel est de 3 à 5 minutes.

L'activité ATPase est exprimée dans le système d'Unités Internationales
 25 ($\mu moles$ 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

30 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 $(Na^+, K^+)ATPase$, et se sont révélés être
 35 bien plus efficaces que les gangliosides dans les mêmes conditions de
 concentration molaire.

Handwritten signature

TABLEAU II

Effet des dérivés de gangliosides sur l'ATPase (Na^+ , K^+) de la membrane neuronale.

Composé	Durée d'incubation	Température d'incubation	Concentration (nM)	% d'augmentation de l'activité (Na^+ , K^+)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", Athens, August 28 - September 1 (1979) (Communication)] —

10 [("Satellite Meeting on Biochemical and Pharmacological Implications of Gangliosides Functions", Cortona, August 28 - 31 (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", Athens, August 28 - September 1 (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 Biomédica Neuroaverager 1172 OTE;
25 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).

30 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 d'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. Ceci permet de déterminer les conditions de base qu'il faut appliquer à l'animal.

5 Les animaux sont alors traités ultérieurement avec des composés, et 30 min après, à nouveau ils sont 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.

10 • Résultats

Les résultats des essais comparatifs sur le taux de récupération de l'électrorétinogramme sont résumés dans le Tableau III, ci-avant. †

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

UTILISATION THERAPEUTIQUE

Les dérivés d'esters internes de gangliosides de la présente invention
20 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
25 dus à des causes toxi-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 toxi-infectieuses, dégénératives, anoxiques ou traumatiques en vue de la stimulation du bourgeonnement
30 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 isohosmotiques. 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 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.

25



→

TABLEAU IV

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

■ Préparation No. 1 - une ampoule de 2 ml contient:

10

- 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

15

■ Préparation No. 2 - une ampoule de 2 ml contient:

20

- 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

25

■ Préparation No. 3 - une ampoule de 4 ml contient:

30

- 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 qui y est 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 contenu 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 la forme de solutions.

TABLEAU V

Exemples de préparation extemporanée de compositions pharmaceutique

25

■ Préparation n° 1

- a. 2 ml de lyophilisat contient
- substance active 5 mg
 - glycine 30 mg
- b. une ampoule de 2 ml contient:
- chlorure de sodium 16 mg
 - tampon à base de citrate dans du pyrogène distillé exempt d'eau q.s.a. 2 ml

30

■ Préparation n°2

35

- a. 3 ml de lyophilisat contient
- substance active 5 mg
 - mannitol 40 mg
- b. une ampoule de 2 ml contient:
- chlorure de sodium 16 mg
 - tampon à base de citrate dans du pyrogène distillé exempt d'eau q.s.a. 2 ml

40

TABLEAU V (suite)

...

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

REVENDEICATIONS

1.- Procédé de préparation de dérivés d'un ester interne de ganglioside consistant:

5 (a) à dissoudre dans un solvant aprotique un ganglioside ou un mélange de gangliosides provenant d'un mammifère;

(b) à convertir les groupes carboxyliques desdits gangliosides en des groupes carboxyliques ou en leurs sels par action d'une résine échangeuse d'ions;

10 (c) à traiter le ganglioside ou mélange de gangliosides résultant par un réactif de lactonisation pour former au moins une liaison lactonique dans lesdits dérivés d'ester interne de ganglioside.

2.- Procédé selon la revendication 1, caractérisé en ce que ledit mélange de gangliosides de l'étape (a) a été obtenu à partir d'une cervelle de bovin.

15 3.- Procédé selon la revendication 1, caractérisé en ce que le solvant aprotique est choisi dans le groupe comprenant le diméthyl sulfoxyde, le diméthylformamide, le sulfolane, le tétrahydrofuranne, le diméthoxyéthane et la pyridine.

20 4.- Procédé selon la revendication 1, caractérisé en ce que le réactif de lactonisation est choisi dans le groupe comprenant les carbodiimides solubles dans les solvants organiques, les sels de 2-chloro-1-méthyl-pyridinium, l'éthoxyacétylène et le N-éthyl-5-phénylisoxazolium-3'-sulfonate.

25 5.- Procédé selon la revendication 1, caractérisé en ce que ledit carbodiimide est le dicyclohexylcarbodiimide, le benzylisopropylcarbodiimide ou le benzyléthylcarbodiimide.

6.- Procédé selon la revendication 1, caractérisé en ce que le dérivé d'ester interne de ganglioside obtenu dans l'étape (c) est précipité à l'aide d'acétone.

30 7.- A titre de médicament, une composition pharmaceutique pour le traitement de troubles ou lésions du système nerveux périphérique provenant de causes toxi-infectieuses, compressives, dégénératives 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 toxi-infectieuses, dégénéra-
35 tives, anoxiques ou traumatiques, en vue de la stimulation du bourgeonnement neuronal pour la récupération fonctionnelle, qui comprend un

support ou diluant acceptable du point de vue pharmaceutique et une quantité efficace pour le traitement du système nerveux d'au moins un dérivé d'ester interne de ganglioside, ce dérivé de ganglioside comprenant:

(a) une partie à base d'hydrate de carbone, au moins une céramide
5 et au moins un résidu d'acide;

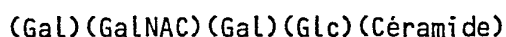
(b) ladite partie à base d'hydrate de carbone comprend au moins un résidu de N-acétylgalactosamine ou de N-acétylglucosamine et au moins un résidu de glucose ou de galactose;

(c) ledit résidu d'acide comprend au moins un acide N-acétyl-neuraminique ou N-glycolylneuraminique; et
10

(d) le groupe carboxyle d'au moins un desdits résidus d'acides est lié par une liaison ester à un groupe hydroxy de l'un desdits hydrates de carbone ou d'un desdits résidus d'acide pour former un noyau lactonique.

8.- Composition pharmaceutique selon la revendication 7, caractérisée
15 en ce que:

(a) la partie hydrate de carbone desdits dérivés de gangliosides présente la structure:



dans laquelle:

20 Gal est un résidu de galactose,
GalNAC est un résidu de N-acétylgalactosamine, et
Glc est un résidu de glucose.

9.- Composition selon la revendication 7 ou 8, caractérisée en ce que ledit dérivé de ganglioside présente au moins un acide N-acétyl-neuraminique
25 lié à au moins un desdits résidus Gal.

10.- Composition selon la revendication 7, caractérisée en ce que:

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



30



dans laquelle:

Gal est un résidu de galactose,
GalNAC est un résidu de N-acétylgalactosamine,
Glc est un résidu de glucose, et
35 NANA est un résidu d'acide N-acétylneuraminique,

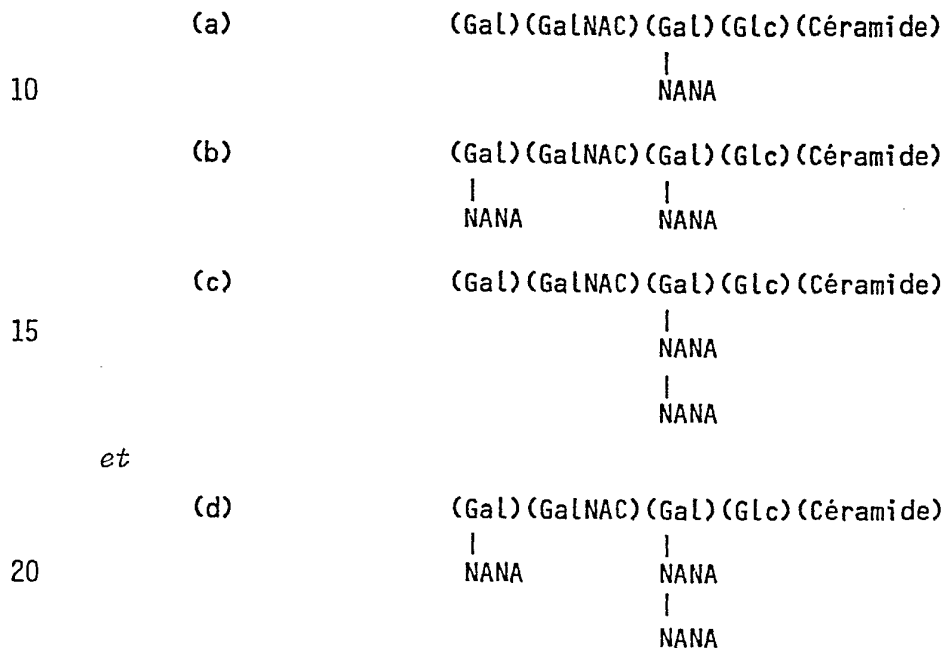
et

(b) ledit NANA est un ester lié audit Gal.

11.- Procédé selon la revendication 7 ou 10, caractérisé en ce que ledit résidu d'acide consiste en acide N-acétyl-neuraminique.

12.- Composition selon la revendication 7, caractérisée en ce que la partie hydrate de carbone consiste en des résidus de galactose, de glucose et de N-acétylgalactosamine.

13.- Composition selon la revendication 7, caractérisée en ce que ledit dérivé de ganglioside consiste en un mélange de:



étant entendu que:

Gal représente un résidu de galactose,
 GalNAC représente un résidu de N-acétylgalactosamine,
 25 Glc représente un résidu du glucose, et
 NANA représente un résidu d'acide N-acétyl-neuraminique,
 et en ce qu'au moins un desdits résidus NANA est lié par une liaison ester à un groupe hydroxy d'un résidu de galactose et/ou d'un résidu NANA adjacent pour former un noyau lactonique.

30 14.- Composition pharmaceutique selon l'une quelconque des revendications 7 à 13, caractérisée en ce qu'elle est sous forme d'une solution injectable.

15.- Composition pharmaceutique selon l'une quelconque des revendications 7 à 14, dans laquelle ledit support ou diluant est un mélange de chlorure de sodium et d'un tampon à base de citrate.

16.- Composition pharmaceutique selon l'une quelconque des revendications 7 à 15, caractérisée en ce que ledit dérivé du ganglioside est présent en une quantité comprise entre environ 2 et environ 50% en poids.

17.- A titre de médicament nouveau, une préparation extemporanée à base d'une composition pharmaceutique destinée au traitement de troubles ou lésions du système nerveux périphérique provenant de causes toxi-infectieuses, compressives, dégénératives 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 toxi-infectieuses, dégénératives, anoxiques ou traumatiques, en vue de la stimulation du bourgeonnement neuronal pour la récupération fonctionnelle, qui consiste en un premier conteneur contenant un système solvant et en un deuxième conteneur contenant un excipient solide et une poudre lyophilisée, en une proportion efficace pour le traitement du système nerveux, d'au moins un dérivé d'ester interne de ganglioside, lesdits dérivés de ganglioside comprenant:

(a) une partie à base d'hydrate de carbone, au moins une céramide et au moins un résidu d'acide;

(b) ladite partie à base d'hydrate de carbone comprend au moins un résidu de N-acétylgalactosamine ou de N-acétylglucosamine et au moins un résidu de glucose ou de galactose;

(c) ledit résidu d'acide comprend au moins un acide N-acétyl-neuraminique ou N-glycolneuraminique; et

(d) le groupe carboxyle d'au moins un desdits résidus d'acides est lié par une liaison ester à un groupe hydroxy de l'un desdits hydrates de carbone ou d'un desdits résidus d'acides pour former un noyau lactonique, le contenu desdits récipients étant mélangé pour former ladite composition pharmaceutique.

18.- Préparation à base d'une composition pharmaceutique selon la revendication 17, caractérisé en ce que le premier conteneur contient du chlorure de sodium et un tampon à base de citrate.

19.- Préparation à base d'une composition pharmaceutique selon la revendication 17, caractérisé en ce que l'excipient solide est de la glycine.

20.- Préparation à base d'une composition pharmaceutique selon la revendication 17 ou 19, caractérisé en ce que l'excipient solide est du mannitol.

21.- Préparation à base d'une composition pharmaceutique selon la revendication 17, caractérisé en ce que le second conteneur contient ledit dérivé du ganglioside en une quantité comprise entre environ 10 et environ 90% en poids.

22.-Préparation à base d'une composition pharmaceutique selon l'une quelconque des revendications 17 à 21, caractérisé en ce que:

(a) la partie hydrate de carbone desdits dérivés de gangliosides présente la structure:

5 (Gal)(GalNAC)(Gal)(Glc)(Céramide)

dans laquelle:

Gal est un résidu de galactose,

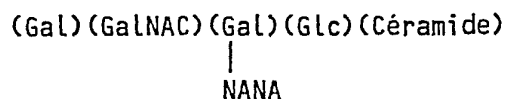
GalNAC est un résidu de N-acétylgalactosamine, et

Glc est un résidu de glucose.

10 23.- Préparation à base d'une composition pharmaceutique selon la revendication 22, caractérisé en ce que ledit dérivé de ganglioside présente au moins un acide N-acétyl-neuraminique lié à au moins un desdits résidus Gal.

24.- Préparation à base d'une composition pharmaceutique selon l'une quelconque des revendications 17 à 21, caractérisé en ce que:

15 (a) au moins un desdits dérivés de gangliosides présente la structure:



dans laquelle:

20 Gal est un résidu de galactose,

GalNAC est un résidu de N-acétylgalactosamine,

Glc est un résidu de glucose,

NANA est un résidu d'acide N-acétylneuraminique,

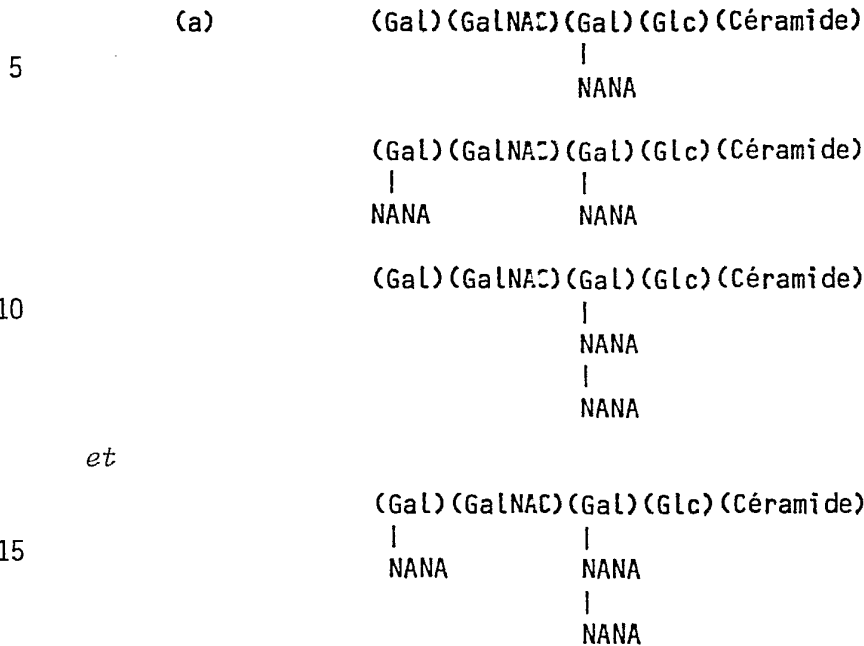
et

25 (b) ledit NANA est un ester lié audit Gal.

25.- Préparation à base d'une composition pharmaceutique selon la revendication 14, caractérisé en ce que ledit résidu d'acide consiste en acide N-acétylneuraminique.

30 26.- Préparation à base d'une composition pharmaceutique selon l'une quelconque des revendications 17 à 21, caractérisé en ce que la partie hydrate de carbone consiste en des résidus de galactose, de glucose et de N-acétyl-galactosamine.

27.- Préparation à base d'une composition pharmaceutique selon l'une quelconque des revendications 17 à 21, caractérisé en ce que ledit dérivé de ganglioside consiste en un mélange de:



étant entendu que:

- Gal représente un résidu de galactose,
 20 GalNAC représente un résidu de N-acétylgalactosamine,
 Glc représente un résidu de glucose, et
 NANA représente un résidu d'acide N-acétyl-neuraminique,
 et en ce qu'au moins un desdits résidus NANA est lié par une liaison ester
 à un groupe hydroxy d'un résidu de galactose et/ou d'un résidu NANA adjacent
 25 pour former un noyau lactonique.

