

①2

DEMANDE DE BREVET D'INVENTION

A1

②2 Date de dépôt : 05.04.90.

③0 Priorité :

④3 Date de la mise à disposition du public de la demande : 11.10.91 Bulletin 91/41.

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

⑥0 Références à d'autres documents nationaux apparentés :

⑦1 Demandeur(s) : LABORATOIRES MAYOLY SPINDLER (S.A.R.L.) — FR.

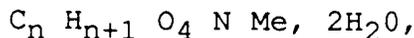
⑦2 Inventeur(s) : Charagnac Jean-Luc.

⑦3 Titulaire(s) :

⑦4 Mandataire : Cabinet Ores.

⑤4 Sels équimolaires d'acide α -amine dicarboxylique et de métal divalent, leur procédé de préparation et leur application pour l'obtention de compositions pharmaceutiques.

⑤7 L'invention est relative à des sels d'acide α -aminé dicarboxylique et de métal divalent, caractérisés en ce qu'ils répondent à la formule brute suivante:



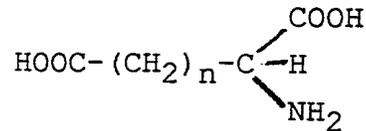
dans laquelle n est supérieur ou égal à 4, et Me représente un atome de métal divalent, ainsi qu'à leur procédé de préparation.

L'invention est également relative à des compositions pharmaceutiques comprenant lesdits sels.



La présente invention est relative à des sels équimolaires d'un acide α -aminé dicarboxylique et d'un métal divalent, à leur procédé de préparation, et à des médicaments comprenant lesdits sels.

5 Les acides α -aminés dicarboxyliques, répondent à la formule générale qui est représentée ci-dessous,



10 A titre d'exemples d'acides α -aminés dicarboxyliques, on citera deux acides α -aminés naturels, l'acide aspartique et l'acide glutamique.

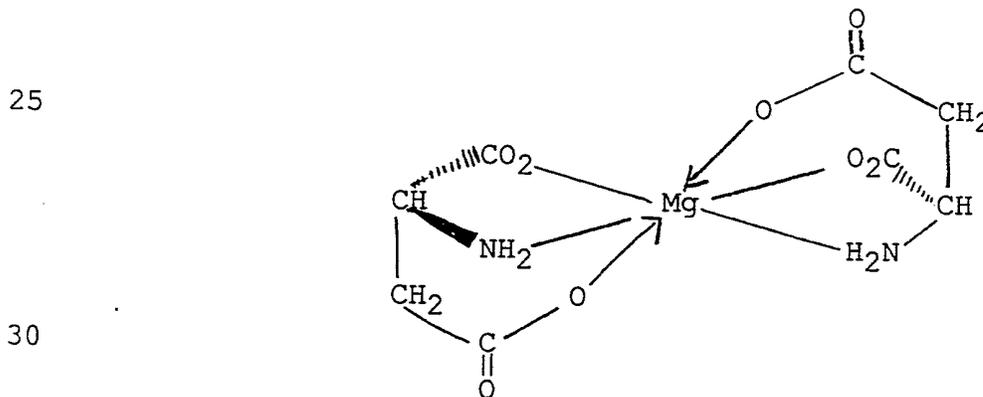
Les acides α -aminés dicarboxyliques possèdent deux fonctions carboxyliques ionisables ; il semble donc théoriquement possible d'obtenir un sel équimolaire d'un métal

15 quement possible d'obtenir un sel équimolaire d'un métal divalent et d'un acide α -aminé dicarboxylique.

Toutefois, les produits commercialement accessibles sont des hémisels de métal divalent dans lesquels le rapport molaire métal divalent/acide α -aminé dicarboxylique est

20 égal à 1/2.

Ceci est probablement dû à l'arrangement octaédrique très privilégié représenté ci-dessous.



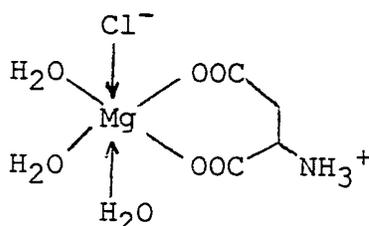
Des recherches ont été faites dans le but d'augmenter le rapport métal divalent/acide α -aminé dicarboxylique, dans le but de se rapprocher du rapport théorique 1/1.

On trouve ainsi dans l'art antérieur une méthode permettant d'obtenir un sel d'aspartate "enrichi en magnésium" (Brevet Allemand 3 238 118, au nom de VERLA PHARM.)

5 Ce Brevet décrit la préparation en une étape, à partir d'aspartate d'un métalloyde (en l'occurrence MgO) et d'un métalhalogène (le chlorure de magnésium), d'un chlorhydrate d'aspartate de magnésium.

La structure tridimensionnelle avancée pour ce sel est représentée ci-dessous :

10



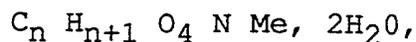
15

La présente invention s'est fixé pour but l'obtention de sels d'acide α -aminé dicarboxylique et de métal divalent, qui, contrairement aux sels d'acide α -aminé dicarboxylique et de métal divalent de l'art antérieur, associent ces deux constituants en proportions équimolaires, ce qui permet d'obtenir des sels plus concentrés en métal divalent que ceux connus dans l'art antérieur. En outre, contrairement à ceux décrits dans le Brevet Allemand 3 238 118, les sels conformes à la présente invention ne contiennent aucune molécule d'halogène.

20

25

La présente invention a pour objet un sel d'acide α -aminé dicarboxylique et de métal divalent, caractérisé en ce qu'il répond à la formule brute suivante :



30

dans laquelle n est supérieur ou égal à 4, et Me représente un atome de métal divalent.

Selon un mode de réalisation préféré de la présente invention, n est égal à 4.

Selon un autre mode de réalisation préféré de la présente invention, n est égal à 5.

35

Selon encore un autre mode de réalisation préféré de la présente invention le métal divalent est le magnésium.

La présente Invention a également pour objet un procédé de préparation d'un sel équimolaire d'acide α -aminé dicarboxylique et de métal divalent, lequel procédé est caractérisé en ce qu'il comprend une étape dans laquelle

5 on procède à la déprotonation de l'acide α -aminé dicarboxylique en milieu hétérogène, en présence d'un hydroxyde du métal divalent.

Selon un mode de mise en oeuvre préféré du procédé conforme à l'invention, l'hydroxyde de métal divalent est

10 en excès molaire par rapport à l'acide α -aminé dicarboxylique.

Selon un mode de mise en oeuvre préféré du procédé conforme à l'invention, l'acide α -aminé dicarboxylique est l'acide glutamique.

15 Selon un autre mode de mise en oeuvre préféré du procédé conforme à l'invention, l'acide α -aminé dicarboxylique est l'acide aspartique.

Selon encore un autre mode de mise en oeuvre préféré du procédé conforme à l'invention, l'hydroxyde de métal

20 divalent est l'hydroxyde de magnésium.

Le procédé conforme à l'invention utilise un protocole simple, et le produit obtenu ne contient, comme contaminant éventuel, qu'un excès d'hydroxyde, qui est facilement éliminé, par exemple par filtration.

25 Le sel d'aspartate obtenu peut être précipité par l'addition d'acétone, mais il est également possible de supprimer cette dernière étape en séchant la solution par atomisation, après élimination de l'excès d'hydroxyde . Il apparaîtra clairement à l'homme de l'art que d'autres

30 procédés de séchage, par exemple la lyophilisation, peuvent également être utilisés.

La présente Invention a en outre pour objet des compositions pharmaceutiques caractérisées en ce qu'elles contiennent un sel équimolaire d'acide α -aminé dicarboxylique et de métal divalent, seul ou en association avec

35 un autre principe actif.

Les hémisels d'acide α -aminé dicarboxylique (en particulier d'acide glutamique et d'acide aspartique) et de métal divalent connus dans l'art antérieur sont utilisés dans le traitement des états d'asthénie fonctionnelle.

5 Ils sont considérés comme constituant une forme qui favorise particulièrement l'absorption par l'organisme des acides α -aminés dicarboxyliques aussi bien que des métaux divalents qui y sont associés .

10 Les sels équimolaires d'acide α -aminé dicarboxylique et de métal divalent conformes à l'invention en instance sont utilisables dans les mêmes indications que les hémisels; ils possèdent en outre sur ces derniers l'avantage de permettre, à quantité égale de sel, l'administration d'une plus grande proportion de métal divalent Les Inven-
15 teurs ont en outre constaté que le sel équimolaire d'aspartate et de magnésium obtenu conformément à l'Invention possédait un effet anxiolytique léger.

Le terme "anxiolytique" se rapporte, en pharmacologie, à une classe de médicaments ayant comme point commun leur
20 utilisation thérapeutique pour réduire l'anxiété ; en général, les anxiolytiques ont un effet sédatif à faible dose, et hypnotique à dose plus élevée ; certains d'entre eux ont en outre un effet myorelaxant. Parmi les substances couramment utilisées comme anxiolytiques, on
25 citera, à titre indicatif, les benzodiazépines, les carbamates, le clométiazole, les dérivés du diphénylméthane.

Selon un mode de réalisation préféré des compositions pharmaceutiques conformes à l'invention, elles contiennent un sel équimolaire d'acide aspartique et de
30 magnésium.

Selon un autre mode de réalisation préféré des compositions pharmaceutiques conformes à l'invention, elles contiennent un sel équimolaire d'acide glutamique et de
35 magnésium.

Les Inventeurs ont en outre mis en évidence, une synergie d'action inattendue entre un sel équimolaire d'acide α -aminé dicarboxylique et de métal divalent conforme à l'invention, en particulier un sel d'acide aspartique et de magnésium, et des anxiolytiques tels que les benzodiazépines ; cette synergie se manifeste par une potentialisation importante autant que surprenante des effets, en particulier sédatifs, des anxiolytiques considérés lorsqu'ils sont associés à un sel conforme à l'invention. Les compositions résultant de cette association permettent donc de réduire considérablement, pour un effet équivalent, la dose d'anxiolytique administrée.

Selon encore un autre mode de réalisation préféré des compositions pharmaceutiques conformes à l'invention, elles contiennent, en tant que principe actif, un sel équimolaire d'acide α -aminé dicarboxylique et de métal divalent en association avec un anxiolytique.

Selon une disposition préférée de ce mode de réalisation, le sel équimolaire d'acide α -aminé dicarboxylique et de métal divalent est un sel équimolaire d'acide aspartique et de magnésium.

Selon encore une disposition préférée de ce mode de réalisation, l'anxiolytique est une benzodiazépine.

La présente Invention sera mieux comprise à l'aide du complément de description qui va suivre, qui se réfère à des exemples d'obtention d'un sel équimolaire d'acide α -aminé dicarboxylique et de métal divalent conforme à l'invention, et à la démonstration de son activité pharmacologique.

Il doit être bien entendu, toutefois, que ces exemples de préparation, tests et études pharmacologiques sont donnés uniquement à titre d'illustration de l'objet de l'invention, dont ils ne constituent en aucune manière une limitation.

I) PREPARATION DE SELS EQUIMOLAIRES D'ACIDES α -AMINES
DICARBOXYLIQUES ET DE METAUX DIVALENTS CONFORMES A
L'INVENTION

Exemple 1 - Préparation d'un sel équimolaire de magnésium
et d'acide aspartique

A/ - PROTOCOLE EXPERIMENTAL

L'acide aspartique (10g) et l'hydroxyde de magnésium (6g)
sont mis en suspension dans 50 ml d'eau distillée, puis,
sous agitation magnétique, le mélange est chauffé à 90°C
(température du bain) pendant 24 heures.

La solubilité de l'hydroxyde de magnésium dans l'eau
étant très faible, on a utilisé ce réactif en excès et
chauffé ce mélange pour améliorer le rendement de la
réaction.

Néanmoins, la très grande solubilité de l'aspartate de
magnésium obtenu a pour effet de déplacer l'équilibre de
la réaction dans le sens de la production de ce sel.

Après refroidissement du mélange, l'excès d'hydroxyde est
éliminé par filtration sur papier WATMAN n° 5. Le sel
d'acide aspartique et de magnésium est précipité en addi-
tionnant au goutte à goutte un volume égal d'acétone
(environ 50 ml).

Par maintien à 4°C pendant 2 heures, le précipité forme
une pâte. On élimine le surnageant, puis on rince avec un
peu d'acétone. Après redissolution, dans une quantité
minimale d'eau, l'on procède à la lyophilisation, à
l'issue de laquelle on récupère une poudre blanche très
légèrement jaune.

Ce produit est hygroscopique et doit être stocké à l'abri
de l'humidité.

20g du produit obtenu sont solubles dans 100 ml d'eau à
20 °C . En solution, le composé est stable à température
ambiante, le pH est de 9,8.

Une solution à 2% dans l'acide chlorhydrique 2N possède
un pouvoir rotatoire de + 17°,9 ce qui indique que le
produit n'est pas un mélange racémique.

B/ - COMPOSITION ET STRUCTURE DU COMPOSE OBTENU

. Microanalyse : sur $C_4H_5NMg \cdot 2H_2O$

	Pourcentages théoriques	Pourcentages observés
5 C	25,1	25,85
H	4,74	4,94
N	7,31	7,2

Ce composé est hygroscopique et s'hydrate rapidement à l'air. Cette propriété peut expliquer la légère différence entre les pourcentages observés et les pourcentages théoriques. Un dosage fiable de l'oxygène est impossible en présence de magnésium. La microanalyse indique que la réaction est complète et qu'on n'isole pas d'acide aspartique sous sa forme de départ.

15 Dosage du magnésium: Il est réalisé par complexométrie :
Pourcentage théorique : 12,69% (p/p) ; pourcentage observé : 11,8% (p/p).

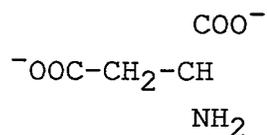
(A titre de comparaison le pourcentage en poids de magnésium des hémisels de magnésium et d'acide aspartique connus dans l'art antérieur est de 6,6%)

. RMN du proton (200 MHz, D_2O) - (Figure 1)

On observe 2 massifs à 2,4 ppm et 3,4 ppm dont l'intensité correspond respectivement à 2 protons et 1 proton.

25 Attribution :

2,4



30

3,4

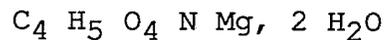
Les protons de l'amine sont échangeables et n'apparaissent pas. La proximité du centre asymétrique rend théoriquement différents les 2 protons de méthylène : on a donc réalisé une RMN du proton à haut champ

(400 MHz, D₂O) (Figure 2) afin d'obtenir une meilleure résolution des massifs.

Le massif à 2,4 ppm est alors effectivement résolu en une paire de double de doublet, révélant un couplage Gem.J = 18Hz entre les 2 protons du méthylène et une constante de couplage avec le proton du carbone adjacent (J = 2Hz et J = 5Hz).

Le signal à 3,4 ppm, superposition des petites constantes de couplage J = 2Hz et J = 5Hz n'est pas convenablement résolu.

La structure microcristalline du produit obtenu ne permet pas l'obtention de données cristallographiques par les rayons X. Sur la base de la teneur en magnésium, des résultats de la RMN du proton et de la microanalyse, il est toutefois possible de déterminer la formule brute du sel obtenu, qui est :



ce qui correspond bien à un sel équimolaire d'aspartate et de magnésium dihydraté ASPMg,2H₂O

II) DEMONSTRATION DE L'ACTIVITE PHARMACOLOGIQUE DES COMPOSES CONFORMES A L'INVENTION

A). - EFFET ANXIOLYTIQUE DE L' α - β -ASPARTATE DE MAGNESIUM
EXEMPLE 2: Effet de l' α - β -aspartate de magnésium en prise unique sur le comportement exploratoire en enceinte non anxigène et anxigène, et la coordination motrice chez la souris.

Etude du comportement exploratoire:

Le principe de cette étude est basé sur le fait qu'une souris placée pour la première fois dans un environnement nouveau manifeste une activité motrice très vive afin d'explorer ce lieu, quel qu'il soit ; l'étude cinétique de l'activité motrice montre que cette dernière est maximum dans les 5 premières minutes puis décroît de façon notable de telle sorte qu'entre 5 et 15 minutes (c'est-à-dire en 10 minutes) les scores sont égaux à ceux notés dans les 5 premières minutes.

Les scores d'activité sont fonction de la surface à explorer. Ils sont également fonction de deux motivations contradictoires : la curiosité et la crainte. Il faut enfin savoir que lorsque la surface offerte permet une activité "horizontale" (marche) la curiosité paraît l'emporter ; par contre lorsque la surface est réduite et conduit à une activité "verticale" (redressements le long des parois d'un cylindre) il semble que la crainte anxieuse soit davantage présente et conduise à une activité soit diminuée, soit cyclique, et apparemment sans focalisation.

Cet état d'anxiété est confirmé par la présence d'une défécation et d'une miction que nous qualifions d'émotionnelles.

15 Etude de la coordination motrice:

Le test dit du "rota-rod" permet de juger le tonus musculaire et la coordination motrice de souris placées sur une tige tournant à vitesse constante.

1) PROTOCOLE EXPERIMENTAL

20 Ces études ont été réalisées chez des souris mâles, de souche NMRI-Han, réparties au hasard en lots de 15 souris (séries traitées) et 20 souris (série contrôle).

1.1) Motilité spontanée

La motilité a été mesurée à l'aide d'un actimètre "type Dews" (Brit. J. Pharmacol. 1953, 8 : 46). Les animaux sont placés un par un dans une enceinte rectangulaire en matière plastique transparente (mesures intérieures : L = 24 cm, l = 15 cm, h = 9,5 cm), couverte par un grillage métallique et traversée par deux faisceaux infrarouges perpendiculaires situés à 2 cm au-dessus du plancher (médiannes de l'enceinte) ; ces deux faisceaux viennent frapper deux cellules photo-électriques reliées à un compteur d'impulsions déclenché à chaque fois que l'animal coupe un des faisceaux. Les actimètres ont été placés dans une pièce non insonorisée mais en dehors de tout bruit aigu, à une température de l'ordre de 21°C.

L'activité motrice a été mesurée au cours des 5 premières minutes (exploration non anxiogène) puis entre 5 et 15 minutes (activité basale non anxiogène).

1.2) Motilité dans des conditions anxiogènes

5 Au sortir de l'actimètre, les souris sont placées dans un cylindre en verre (hauteur 30 cm, diamètre 9 cm)

L'exploration anxiogène a été mesurée par le nombre de redressements au cours de la première minute passée dans le cylindre, l'activité basale anxiogène étant considérée
10 dans la même enceinte, entre 1 et 3 minutes.

Enfin, l'effet à l'égard des manifestations dites émotionnelles est mesuré sur la miction et la défécation au cours des 3 minutes passées dans le cylindre et permet le calcul d'une DA 50 dite "anti-émotionnelle".

15 1.3) Effet sur le tonus musculaire

La DA 50 s'exprime par la dose qui provoque en moins de 3 minutes la chute de 50 p. 100 des souris placées sur une tige en bois tournant à une vitesse de 16 tours/min (diamètre 1,7 cm). Ce test qui permet de juger de la
20 coordination motrice des souris est adapté de la technique décrite par N.W. DUNHAN and T.S. MIYA (J. Am. Pharm. Assoc. 1957, 46 : 208)

1.4) Répartition des souris et posologie

25 Quatre-vingt souris ont été réparties de la façon suivante :

Séries d'animaux	Doses mg.kg ⁻¹ P.O	Nombre
Contrôle	0	20
30 α - β -aspartate de magnésium	175	15
	350	15
	700	15
	1400	15

Les doses ont été calculées selon une progression géométrique de base 700 (correspondant au 1/10 de la DL 50) et de raison 2, soit respectivement 175, 350, 700 et 1400 mg.kg⁻¹.

5 Toutes les administrations ont été réalisées par voie intra-gastrique, sous un volume constant (20 ml.kg⁻¹), à partir de solutions aqueuses.

Les animaux contrôles ont reçu un même volume d'eau distillée.

10 Les traitements sont réalisés 60 minutes avant le test.

2.) RESULTATS

2.1) Enceinte non anxiogène (actimètre)

Les valeurs moyennes sont rapportées sur le tableau 1.

15 L'activité motrice spontanée d'exploration (0-5 min) est relativement importante chez les souris témoins puisque l'on relève en moyenne 91 coupures des faisceaux lumineux. Cette activité décline ensuite en fonction du temps puisqu'entre 5 et 15 min (activité basale non anxiogène), c'est-à-dire dans un laps de temps deux fois plus important, le nombre de faisceaux infra rouges interrompus n'est que de 128. Sur l'ensemble de la période d'observation (0-15 min), le nombre des faisceaux infra-rouges franchis a été de 184 (tableau 1).

20 L'administration préalable de α - β -aspartate de magnésium n'entraîne pas de variation franche proportionnelle à la posologie de l'activité motrice des souris. On observe, 25 seulement en présence de 700 mg.kg⁻¹ P.O., une augmentation statistiquement significative tant de l'activité exploratoire (0-5 min) que de l'activité basale non 30 anxiogène (5-15 min) (tableau 2).

Compte tenu de ces résultats, il est donc illusoire de chercher à calculer une DA 50.

2.2) Enceinte anxiogène (cylindre de verre)

Les valeurs moyennes sont rapportées sur le tableau 2.

35 Les redressements qui traduisent l'exploration des souris contrôles placées dans le cylindre de verre sont maximum

au cours de la première minute (15) puis déclinent progressivement au cours du temps : 8 au cours de la 2ème minute et 7 au cours de la 3ème (tableau 3). Plus les souris sont anxieuses, moins le nombre de redressements est important au cours de la première minute. Par contre, la miction et la défécation sont plus abondantes et traduisent l'aspect émotionnel du comportement "anxieux". Ce comportement s'observe chez 17 souris sur 20, soit 85 p. 100 dans la série contrôle.

L'administration préalable de α - β -aspartate de magnésium aux doses de 700 et 1400 mg.kg⁻¹, augmente significativement le nombre de redressements, en particulier au cours de la 2ème minute suivant l'introduction dans le cylindre (tableau 4). Ceci va de pair, à la dose de 700 mg.kg⁻¹ avec une diminution très importante du nombre des souris présentant une défécation et une miction émotionnelles (27 %). Ce pourcentage est également plus faible que chez les témoins aux deux doses les plus faibles : 175 mg.kg⁻¹ (40 %) et 350 mg.kg⁻¹ (53 %) mais est paradoxalement plus élevé à celle de 1400 mg.kg⁻¹ (73 %).

La DA 50 calculée à partir de ces pourcentages est égale à : 577 mg.kg⁻¹ avec des limites de confiance au niveau de probabilité 5 p. 100 égales à :

limite inférieure : 160 mg.kg⁻¹

limite supérieure : 2082 mg.kg⁻¹

2.3) Tonus musculaire

Cinq des 20 souris témoins chutent de la tige tournante au cours des 3 minutes d'observation (25 %). Après ingestion de α - β -aspartate de magnésium, ce pourcentage est plus faible (13 %) à dose faible (175 mg.kg⁻¹) mais franchement plus élevé (de 53 à 60 %) aux 3 autres doses.

La DA 50 calculée à partir de ces pourcentages, comme décrit par J.T. LITCHFIELD et F. WILCOXON (J. Pharm. Exp. Ther. 1949, 96 : 99-113) est égale à 612 mg.kg⁻¹ avec des

limites de confiance au niveau de probabilité 5 p. 100 égales à :

limite inférieure : 343 mg.kg⁻¹

limite supérieure : 1091 mg.kg⁻¹

5 CONCLUSIONS

Au terme de cette étude, on peut dire que l' α - β -aspartate de magnésium exerce une activité anti-émotionnelle avec une DA 50 égale à 577 mg.kg⁻¹ P.O., qu'elle s'accompagne d'un maintien, voire d'un accroissement de l'activité exploratoire dans ces enceintes anxiogène et non anxiogène, et d'une réduction du tonus musculaire (DA 50 = 612 mg.kg⁻¹).

On peut donc conclure que l' α - β -aspartate de magnésium possède des propriétés tranquillisantes mineures sans effet sédatif, mais s'accompagnant d'une légère hypotonie musculaire, pour une dose d'environ 600 mg.kg⁻¹ qui représente environ le 1/10 de la DL 50.

15 **EXEMPLE 3 : Effet de l' α - β -aspartate de magnésium en administration réitérée, sur le comportement exploratoire et la coordination motrice chez la souris**

20 PROTOCOLE EXPERIMENTAL

Il est identique à celui décrit dans l'exemple précédent. Cent quarante cinq souris ont été réparties de la façon suivante :

25	Séries d'animaux	Doses mg.kg ⁻¹ P.O	Nombre
	Contrôle	0	20
30	α - β -aspartate de magnésium	10,95	15
		21,9	15
		43,8	15
		87,5	15
		175	15
		350	15
		700	15

Les doses ont été calculées selon une progression géométrique de base 700 (correspondant au 1/10 de la DL 50) et de raison 2, soit respectivement 10,95 ; 21,9 ; 43,8 ; 87,5 ; 175 ; 350 ; 700 mg/kg. Toutes les administrations ont été réalisées par voie intragastrique, sous un volume constant (20 ml/kg), à partir de solutions aqueuses pendant 15 jours consécutifs. Les animaux contrôles ont reçu un même volume d'eau distillée. Les derniers traitements ont été réalisés 60 minutes avant le test.

10 2) RESULTATS

2.1) Enceinte non anxiogène (actimètre)

Les valeurs moyennes sont rapportées sur le tableau III. L'activité motrice spontanée d'exploration (0-5 min) est relativement importante chez les souris témoins puisque 15 l'on relève en moyenne 88 coupures des faisceaux lumineux. Cette activité décline ensuite en fonction du temps puisqu'entre 5 et 15 min (activité basale non anxiogène), c'est-à-dire dans un laps de temps deux fois plus important, le nombre de faisceaux infra rouges interrompus 20 n'est que de 112. Sur l'ensemble de la période d'observation (0-15 min), le nombre des faisceaux infra-rouges franchis a été de 201 .

L'administration réitérée (13 jours) d' α - β -aspartate de magnésium entraîne, comparativement aux contrôles, une 25 élévation significative tant de l'activité exploratoire (0-5 min) que de l'activité basale non anxiogène (5-15 mn). Cet effet, particulièrement net aux doses de 43,8 et 350 mg/kg, semble être propre à l'administration d' α - β -aspartate de magnésium mais non proportionnel à la 30 dose. La durée de l'imprégnation (13 jours) avant le test peut expliquer cette absence de proportionnalité dose/effet. Le calcul d'une DA 50 est dans ces conditions impossible.

2.2) Enceinte anxiogène (cylindre de verre)

Les valeurs moyennes sont rapportées dans le tableau IV.

Les redressements qui traduisent l'exploration des souris contrôles placées dans le cylindre de verre sont maximum
5 au cours de la première minute (13) puis déclinent progressivement au cours du temps : 10 au cours de la 2ème minute et 7 au cours de la 3ème. Plus les souris sont anxieuses, moins le nombre de redressements est important au cours de la première minute. Par contre, la miction et
10 la défécation sont plus abondantes et traduisent l'aspect émotionnel du comportement "anxieux". Ce comportement s'observe chez 20 souris sur 25, soit 80 p. 100 dans la série contrôle.

L'administration réitérée d' α - β -aspartate de magnésium
15 provoque chez la souris une tendance à l'augmentation du nombre de redressements traduisant une réduction de l'anxiété. Cet effet, cependant, n'est pas proportionnel à la dose puisqu'on l'observe à différents moments de durée de 3 minutes du test et pour des doses aussi différentes que 700 ou 10,95 mg/kg. Le comportement mictionnel et défécatoire est en revanche plus révélateur de l'effet
20 du traitement. En effet si 20 % des animaux contrôle ne semblent pas présenter de comportement anxiogène, l'administration d' α - β -aspartate de magnésium élève cette valeur à 40 % pour la dose de 10,95 et 21,9 mg/kg, à 60 %
25 pour la dose de 43,8 mg/kg, à 66,7 % pour la dose de 87,5 mg/kg et à 73,3 % pour la dose de 175 mg/kg. Les deux doses de 350 et 700 mg/kg entraînent un pourcentage respectif de 60 et 66,7 %, soit un léger infléchissement de l'effet. Ces résultats, en revanche, permettent le
30 calcul d'une DA 50, basé sur le nombre de sujets ne présentant pas de comportement anxieux. Ce calcul donne pour l' α - β -aspartate de magnésium la dose de 27,81 mg/kg (administration réitérée sur 13 jours) avec comme limite supérieure 68,66 mg/kg et comme limite inférieure
35 11,26 mg/kg.

2.3) Tonus musculaire

La recherche d'un effet relaxant musculaire de l' α - β -aspartate de magnésium est rapportée dans le tableau V.

5 Dans le groupe contrôle, 5 souris sur 25 chutent de la tige tournante au cours des 3 minutes d'observation (20 %). L'administration réitérée d' α - β -aspartate de magnésium provoque une légère élévation de ce pourcentage sans que l'on puisse détecter une relation dose/effet. On
10 note un effet relaxant musculaire croissant de la dose de 10,95 mg/kg (26,6 %) à la dose de 43,8 mg/kg (46,6 %) puis un plateau lorsque les doses sont augmentées. Le calcul d'une DA 50 n'est, sur ce test, pas possible du fait de l'absence notable d'effet/dose.

15 CONCLUSION

Dans l'exemple précédent a été mise en évidence une activité tranquilisante mineure ou anti-émotionnelle de l' α - β -aspartate de magnésium en administration unique pour des doses comprises entre 500 et 600 mg/kg. La réitération
20 tion de l'administration de l' α - β -aspartate de magnésium pendant 13 jours a permis non pas d'exacerber cette activité anxiolytique, mais de réduire considérablement les doses qui dans le cadre de l'enceinte anxiogène sont de l'ordre de 30 mg/kg (DA 50 = 27,8 mg/kg).

25 Au terme de cette étude on peut conclure à la présence d'une activité tranquilisante mineure de l' α - β -aspartate de magnésium. Cette activité est étroitement conditionnée, aux doses utilisées, par le caractère réitéré de l'administration.

30 EXEMPLE 4 - Effet anxiolytique mineur de l' α - β -aspartate de magnésium : mise en évidence par le test des 4 plaques

En 1968, J.R. BOISSIER et al. (EUR. J. Pharmacol. 4 : 145) ont proposé une méthode rapide de screening pour des tranquilisants mineurs : le test dit des 4 plaques qui
35 est basé sur un apprentissage suppressif. Ce test classique permet de mettre en évidence l'effet du

α - β -aspartate de magnésium sur le comportement anxieux de la souris.

1) PROTOCOLE EXPERIMENTAL

Le test est pratiqué chez des souris NMRI-HAN soumises à une diète hydrique préalable de 18 heures et réparties en séries de 15.

L'appareillage utilisé consiste en une boîte en plexiglas dont le sol est constitué de 4 plaques métalliques séparées les unes des autres. Un circuit d'alimentation permet d'établir une différence de potentiel entre deux plaques adjacentes grâce à un contacteur. Le test est pratiqué en plaçant doucement une souris sur une des plaques du fond de l'appareil ; les plaques sont électrisées chaque fois que la souris passe de l'une à l'autre, de telle sorte qu'elle reçoit alors un choc électrique au niveau des pattes. Les paramètres du choc sont les suivants : durée de l'impulsion électrique égale à 0,5 seconde ; intensité égale à 0,6 milliampères. Ce choc induit chez les animaux une réaction motrice évidente de fuite, la souris traversant souvent 2 à 3 plaques successivement. Les conditions expérimentales adoptées ont été les suivantes : exploration libre pendant 15 secondes, traversée punie pendant la minute suivante, les résultats étant exprimés en nombre de passages "punis" pendant cette minute.

Soixante souris ont été réparties de la façon suivante :

Séries d'animaux	Doses mg.kg ⁻¹ P.O	Nombre
Contrôle	0	15
α - β -aspartate de magnésium	300	15
	600	15
	1200	15

Les administrations ont été réalisées par voie intra-gastrique, à partir de solutions aqueuses, sous un volume constant de 20 ml.kg^{-1} , 60 minutes avant le début du test. Les animaux contrôles ont reçu un même volume d'eau distillée.

2) RESULTATS

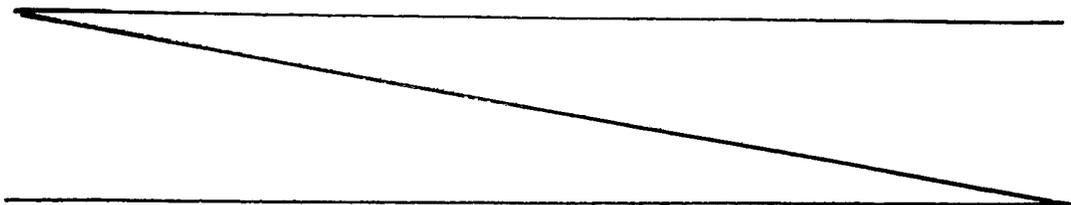
Les données moyennes sont rapportées sur le tableau VI.

Après 15 minutes d'exploration, le nombre de passages d'une plaque à l'autre réalisée en une minute par une souris naïve placée dans cette situation expérimentale mais ne subissant aucune punition est de l'ordre de 15. Ceci traduit une période d'intense activité exploratoire. Lorsque chaque passage est "puni" par un choc électrique, on constate l'établissement rapide d'un conditionnement.

L'apprentissage suppressif ainsi mis en oeuvre se traduit par une réduction considérable de la motilité avec un nombre de passages qui chute chez les souris témoins aux environs de 6, par estimation du risque encouru.

Administré 60 minutes avant la réalisation du test, à la dose de 300 mg.kg^{-1} , l' α - β -aspartate de magnésium n'accroît pas significativement le nombre de passages "punis". Par contre, aux deux doses de 600 et 1200 mg.kg^{-1} , ce nombre est accru significativement, de façon maximum à la dose de 600 mg.kg^{-1} . La diminution de la performance à la dose de 1200 mg.kg^{-1} pourrait être en rapport avec une diminution du tonus musculaire ($\text{DA } 50 = 612 \text{ mg.kg}^{-1}$).

Cet exemple confirme que l' α - β -aspartate de magnésium possède des propriétés tranquillisantes mineures, avec une dose optimum égale à 600 mg.kg^{-1} .



B) MISE EN EVIDENCE D'UNE POTENTIALISATION DE L'EFFET ANXIOLYTIQUE DES BENZODIAZEPINES PAR L' α - β -ASPARTATE DE MAGNESIUM

5 **EXEMPLE 5 : Effet anxiolytique d'une association α - β -aspartate de magnésium/diazepam en prise unique : mise en évidence par le test des 4 plaques chez la souris**

1) PROTOCOLE EXPERIMENTAL

Ce test est pratiqué selon le protocole décrit à l'exemple 4.

10 Cent-vingt souris ont été réparties de la façon suivante :

Séries d'animaux	Doses mg.kg ⁻¹ P.O	Nombre
Contrôle	0	30
15 Diazépan	0,25	15
	0,5	15
	1	15
	2	15
20 Diazépan + α - β -aspartate de magnésium 600mg.kg ⁻¹	0,125	15
	0,25	15
	0,5	15
	1	15

25 Les administrations ont été réalisées par voie intra-gastrique, à partir de solutions aqueuses, sous un volume constant de 20 ml.kg⁻¹ par produit 60 minutes avant le début du test. Les animaux contrôles ont reçu un même volume d'eau distillée.

30 Dans un premier temps a été calculée la DA 50 (dose anxiolytique 50) du Diazépan (Valium 10 mg - Roche , ampoule 2ml) seul, administré à des doses suivant une

progression géométrique de base 0,25 et de raison 2, soit respectivement 0,25, 0,5 l et 2 mg.kg⁻¹.

Dans un deuxième temps a été recherchée la DA 50 du Diazépam en association avec l' α - β -aspartate de magnésium à la dose de 600 mg (soit une progression géométrique de base 0,125 et de raison 2, soit respectivement 0,125, 0,25, 0,5 et 1 mg.kg⁻¹).

La DA 50 est déterminée à partir du pourcentage d'animaux tranquilisés. Est considéré comme tranquilisé tout animal dont le nombre de passages punis est égal ou supérieur à 9, c'est-à-dire à une valeur représentant une augmentation d'au moins 50 % par rapport au score moyen d'animaux non traités. Le calcul de la DA 50 a été réalisé selon la méthode graphique de J.T. LITCHFIELD et F. WILCOXON (J. Pharm. Exp. Ther. 1949, 96 : 99-113).

2) RESULTATS

Les données moyennes sont rapportées sur le tableau VII.

La dose anxiolytique 50 du Diazépam seul, dans ces conditions expérimentales est de 0,76 mg.kg⁻¹. Lors de l'association au Diazépam de la dose de 600 mg.kg⁻¹ de α - β -aspartate de magnésium, on constate une réduction de la DA 50 qui, dès lors, est égale à 0,32 mg.kg⁻¹.

Toutefois la comparaison des DA 50 des deux groupes ne met pas en évidence de différence statistiquement significative bien que le rapport d'activité soit de 2,38

CONCLUSION

Bien que l'on observe une diminution de la dose anxiolytique 50 du diazépam lorsqu'il est associé à la dose de 600 mg de α - β -aspartate de magnésium, cette différence n'atteint pas le niveau statistique de $p \leq 0,05$. Sur la base de cette observation on peut se demander si le bénéfice de cette association est optimal dans le cadre d'une administration unique de 600 mg de α - β -aspartate de magnésium et si l'effet adjuvant ne serait pas plus marqué en administrant l' α - β -aspartate de magnésium de façon répétée à une dose moindre.

EXEMPLE 6 - Potentialisation de l'effet anxiolytique du diazépam par des administrations répétées d' α - β -aspartate de magnésium : Mise en évidence par le test des 4 plaques chez la souris

5

1) PROTOCOLE EXPERIMENTAL

Le test a été réalisé comme décrit à l'exemple précédent. Deux cent dix souris ont été réparties de la façon suivante :

10

Séries d'animaux	Doses mg.kg ⁻¹ P.O	Nombre
Contrôle	0	30
Diazépam	0,25	15
	0,5	15
	1	15
	2	15
Diazépam + α - β -aspartate de magnésium 28mg.kg ⁻¹ x13	0,125	15
	0,25	15
	0,5	15
	1	15

15

20

Toutes les administrations ont été réalisées par voie intra-gastrique à partir de solutions aqueuses, sous un volume constant de 20 ml.kg⁻¹ (eau distillée pour le groupe contrôle). L' α - β -aspartate de magnésium a été administré quotidiennement durant 13 jours consécutifs à la dose de 28 mg.kg⁻¹ P.O. (DA 50 de l' α - β -aspartate de magnésium déterminée dans une enceinte anxiogène, Cf exemple 3). La veille du test, les souris sont soumises à une diète hydrique de 18 heures. La dernière ingestion est pratiquée une heure avant l'étude, concomitamment avec le diazépam (Valium 10 mg - roche, ampoules de 2 ml).

25

30

2) RESULTATS

Le nombre moyen de passages d'une plaque à l'autre sont rapportées sur le tableau VIII (diazépam/ α - β -aspartate de magnésium)

5 Les DA 50 du diazépam seul ou associé à l' α - β -aspartate de magnésium ont été calculées à partir du pourcentage de souris tranquilisées

Qu'il s'agisse du diazépam seul ou associé à l' α - β -aspartate de magnésium, on observe par rapport à la
10 série témoin, une augmentation statistiquement significative du nombre de "passage punis" entre deux plaques adjacentes.

Les DA 50 ont été calculées, comme décrit précédemment.

On constate ainsi que la dose anxiolytique 50 du diazépam
15 seul est égale à $0,76 \text{ mg.kg}^{-1}$. Mais lorsque l'administration du diazépam est précédée de 13 ingestions quotidiennes consécutives d' α - β -aspartate de magnésium, la DA 50 du diazépam est réduite à $0,28 \text{ mg.kg}^{-1}$.

La comparaison de ces DA 50 fait apparaître que
20 l'administration répétée d'aspartate de magnésium réduit de façon statistiquement significative ($p \leq 0,05$) la dose anxiolytique 50 du diazépam, le rapport d'activité étant égal à 2,71.

CONCLUSION

25 Au terme de cette étude, il a été clairement démontré que l'administration préalable et réitérée (13 jours) d' α - β -aspartate de magnésium potentialise fortement l'effet anxiolytique du diazépam. En effet, dans le test classique dit des 4 plaques, la DA 50 du diazépam a été
30 réduite d'environ 2/3 : $0,28 \text{ mg.kg}^{-1}$ au lieu de $0,76 \text{ mg.kg}^{-1}$ en l'absence de prétraitement.

EXEMPLE 7 : Potentialisation de l'effet anxiolytique du diazépam par l' α - β -aspartate de magnésium chez le singe : mise en évidence par électrocortigraphie quantifiée

35 Cette étude a pour but de caractériser l'effet d'une dose liminaire de diazépam grâce à un EEG quantifié et de re-

chercher une potentialisation de cet effet lorsque la même dose de diazépam est ingérée après administration réitérée préalable d' α - β -aspartate de magnésium.

5 L'application de l'électroencéphalographie en psychopharmacologie date de la découverte de la chlorpromazine. Initialement l'analyse de l'EEG reposait sur une interprétation visuelle du tracé. Aujourd'hui, la sophistication des méthodes d'analyse grâce à l'ordinateur a permis de montrer par exemple que les drogues psychotropes ont, 10 pour une dose donnée, un "profil" caractéristique propre, semblable à une empreinte, que l'EEG quantifié permet d'objectiver. Ainsi, les benzodiazépines engendrent une recrudescence des rythmes les plus rapides (bêta) avec une fréquence dominante spécifique à chaque substance 15 alors qu'au contraire un neuroleptique va provoquer un glissement vers des fréquences plus lentes

1) PROTOCOLE EXPERIMENTAL

L'étude a été réalisée chez sept singes cynomolgus (Macaca fascicularis), de sexe mâle et femelle, pesant 20 entre 2 et 5 kg.

1.1) Mise en place des électrodes et enregistrement de l'ECG.

Un mois avant le début de l'étude, sous anesthésie générale (kétamine + xylazine) huit électrodes (boules d'argent) ont été implantées dans la table osseuse, au 25 niveau des aires frontale, centrale, pariétale et occipitale droites et gauche.

L'électrocorticogramme a été enregistré sur un électroencéphalographe REEGA mini-huit (Alvar Electronic) en dérivations monopolaires par rapport à une référence commune. 30 Les enregistrements ont été réalisés sur des animaux habitués au siège à contention, en position assise, dans une pièce calme mais non insonorisée, en ambiance lumineuse tamisée.

1.2) Analyse spectrale de l'ECG

Les huit dérivations EEG ont été analysées simultanément par un Neuromapper 1620 (Neuroscience) qui extrait du signal les transformées de Fourier ("Fast Fourier Transform" : FFT). En fait, 90 échantillons de 2 secondes, soit 3 minutes de tracé exempt d'artefact, ont été analysés. Les données recueillies correspondent à l'amplitude (μV) de chacune des 5 bandes de fréquence EEG classiques selon les bornes suivantes : delta de 0 à 4 Hz ; thêta de 7 à 8 Hz ; alpha de 8 à 13 Hz, bêta₁ de 13 à 20 Hz ; bêta₂ de 20 à 30 Hz.

Pour chacune de ces bandes ont ensuite été calculées :

- Les puissances absolues en μV^2
- les puissances relatives (%), c'est-à-dire la puissance de chacune des bandes de fréquence rapportée à la puissance totale du spectre (power)
- la "SEF 95 % (Spectral Edge Frequency 95 %) qui est la fréquence en deçà de laquelle se situent 95 % de la puissance totale du spectre,
- le rapport entre fréquences rapides et fréquences lentes : $\alpha + \beta / \delta + \theta$

1.3) Les traitements

L' α - β -aspartate de magnésium a été administré durant deux semaines consécutives par voie orale (tubage naso-oesophagien), à raison de deux ingestions quotidiennes, à la dose de 50 mg.kg^{-1} , sous un volume de 2 ml.kg^{-1} (les Samedis et Dimanches, la dose journalière, soit 100 mg.kg^{-1} a été administrée en une fois). La dernière ingestion a précédé de 1 heure la seconde administration de diazépam.

Le diazépam (ampoules injectables - Valium 10 - Roche) a été administré par voie orale, en solution aqueuse, sous un volume de 10 ml/singe, à des doses comprises entre $0,5 \text{ mg.kg}^{-1}$ et 4 mg.kg^{-1} (doses différentes du fait d'une sensibilité individuelle propre à chaque sujet).

2) RESULTATS

Sur les figures 3 et 4 est illustrée l'évolution en fonction du temps de la SEF 95 % et du rapport $\alpha+\beta/\delta+\theta$.

5 Une analyse statistique a été réalisée selon le test t de Fisher-Student pour séries appariées (2 bornes) afin de comparer pour chaque paramètre les valeurs obtenues à chaque temps expérimental suivant l'ingestion de diazépam à la valeur ante obtenue, soit avant toute administration médicamenteuse, soit au terme des deux semaines
10 d'imprégnation par l' α - β -aspartate de magnésium. Les résultats observés sont statistiquement significatifs (2 bornes) au niveau de probabilité 10 p. 100 (le seuil de probabilité statistique choisi peut paraître élevé ; il est en rapport avec le faible nombre de sujets : n=7).
15 L'ensemble de l'analyse statistique a été obtenu grâce au programme statistique SPSS/PC⁺ (SPSS Inc., Chicago)

2.1) Effet de l'administration de Diazépam seul

L'administration de doses liminaires de diazépam, doses comprises entre 0,5 et 4 mg.kg⁻¹ P.O., a conduit à observer
20 une recrudescence des rythmes rapides de fréquence bêta chez le singe.

Les premiers signes visuellement décelables de l'effet du diazépam surviennent aux environs de 6 à 8 minutes après ingestion. Il se caractérisent par des bouffées sporadiques d'ondes pointues rapides, sur un tracé dont
25 l'amplitude s'accroît légèrement. L'acmé se situe en général aux alentours de 45 minutes à une heure, mais l'action perdure (plus ou moins marquée) jusqu'à la 5ème heure.

30 L'analyse spectrale de l'EEG révèle que l'effet du diazépam se caractérise, comme chez l'homme, par un enrichissement en rythmes rapides, en particulier dans la bande b, mais aussi parfois dans la bande alpha. Cependant, du fait du nombre restreint de sujets (n = 7), ces variations s'assortissent d'une grande variabilité. Parallèlement
35 à la recrudescence des rythmes de fréquence rapide,

les ondes les plus lentes : delta et thêta, se raréfient notablement.

L'ensemble de ces variations se résume dans une augmentation durable des valeurs du rapport $\alpha+\beta/\delta+\theta$ (figure 4).

5 Enfin, l'augmentation procentuelle des fréquences rapides provoque un glissement vers la droite du spectre de fréquence EEG, que traduit une augmentation de la "SEF 95 %" (figure 3).

10 2.2) Effet de l'association diazepam/ α - β -aspartate de magnésium

L'administration réitérée d' α - β -aspartate de magnésium à raison de deux ingestions quotidiennes, durant deux semaines consécutives, à la dose de 50 mg.kg^{-1} , entraîne en soi des modifications de l' EEG de repos. Ces varia-
15 tions sont discrètes en moyenne car elles intéressent en fait 4 sujets sur 7. Elles portent essentiellement sur une recrudescence de rythmes rapides, la puissance relatives par exemple de la bande β étant accrue de 4,4, 3,6, 6,2 et 13 % respectivement chez ces 4 sujets. La varia-
20 tion des autres bandes de fréquence est plus aléatoire, sauf celle des ondes delta qui est réduite de 2 à 10 % chez ces mêmes 4 singes. Chez les 3 autres, elle est soit inchangée, soit accrue de 5 % et 8 % respectivement. Ces variations ne sont pas suffisamment amples pour que les
25 valeurs du rapport rythmes rapides/fréquences lentes soient significativement accrues (figure 4) ; par contre la "SEF 95%" est augmentée de 0,5 Hz (figure 3). Bien que ces modifications soient en intensité nettement moindres, elles sont de même nature que celles enregistrées avec le
30 diazépam, en particulier la recrudescence du β au détriment des rythmes lents.

L'ingestion de diazépam réalisée une heure après la dernière administration d' α - β -aspartate de magnésium, donne naissance à des modifications EEG semblables en nature à
35 celles observées lors de l'ingestion du diazépam seul, mais globalement plus intenses. Par exemple, la propor-

tion relative de la bande β_2 s'accroît de 23 % initialement (avant diazépam) jusqu'à 30 % en moyenne deux heures après l'ingestion de diazépam. Rappelons que lors du premier test, cette proportion relative variait de 20 %

5 (valeur de référence) jusqu'à 27 % à l'acmé de l'effet du diazépam obtenue alors une heure après l'ingestion.

D'une manière générale, il apparaît qu'après imprégnation par l' α - β -aspartate de magnésium, l'effet tranquilisant du diazépam tel qu'il s'exprime au niveau EEG, est plus

10 intense mais surtout plus durable.

Ceci est parfaitement illustré sur la figure 3 qui retrace l'évolution de la "SEF 95 %". Lors du premier test, cette fréquence s'accroît progressivement jusqu'à atteindre un maximum à la 30ème minute et demeure peu ou

15 prou en plateau jusqu'à une heure ; puis l'effet s'atténue légèrement à partir de 1 h 30 mais néanmoins perdure jusqu'à la 5ème heure. Lors du second test, l'"effet diazépam" est d'emblée plus marqué ; il n'atteint son acmé qu'à 1 h 30 - 2 h et ne et ne

20 s'infléchit qu'à peine au cours des heures suivantes.

De la même manière l'ampleur de l'accroissement des valeurs du rapport $\alpha+\beta/\delta+\theta$ est remarquablement plus grande après traitement par l' α - β -aspartate de magnésium et la durée d'effet également prolongée (figure 4)

25 CONCLUSION

L'administration d' α - β -aspartate de magnésium seul pendant deux semaines consécutives engendre, chez le singe vigile, des modifications EEG moindres mais de même nature que celles engendrées par le diazépam, c'est-à-

30 dire une recrudescence des rythmes de fréquence rapide, essentiellement de la bande bêta, qui s'accompagne d'un appauvrissement en fréquences lentes.

Une administration de diazépam chez des sujets "imprégnés" d' α - β -aspartate de magnésium génère dans 5 cas

35 sur 7 un renforcement de l'effet préalablement observé en

présence de diazépam seul ; non seulement cet effet est plus prononcé, mais il est aussi plus durable.

Exemple 8 : Détermination de la DL 50 de l' α - β -aspartate de magnésium chez la souris

5 La DL 50 de l' α - β -aspartate de magnésium a été déterminée par voie intraveineuse et par voie intragastrique ; par voie intraveineuse elle est d'environ 238,4 mg.kg⁻¹ chez la souris male, et d'environ 230,5 mg.kg⁻¹ chez la souris femelle ; par voie intragastrique, elle est d'environ 7,1 g.kg⁻¹ chez la souris male, et d'environ 6,6 g.kg⁻¹ chez la souris femelle.

10 Ainsi que cela ressort de ce qui précède, l'invention ne se limite nullement à ceux de ses modes de mise en oeuvre, de réalisation et d'application qui viennent d'être décrits de façon plus explicite ; elle en embrasse au contraire toutes les variantes qui peuvent venir à l'esprit du technicien en la matière, sans s'écarter du cadre, ni de la portée, de la présente invention.

TABLEAU I - SCORE D'ACTIVITE MOTRICE CHEZ LA SOURIS DANS UN ACTIMETRE: α - β -ASPARTATE DE MAGNESIUM EN PRISE UNIQUE

Activité motrice 0-5 minutes		
Série	nombre d'animaux	moyenne
Contrôle	20	91
Mag:175	15	100
Mag:350	15	96
Mag:700	15	113
Mag:1400	15	110
Activité motrice 5-10 minutes		
Série	nombre d'animaux	moyenne
Contrôle	20	128
Mag:175	15	72
Mag:350	15	117
Mag:700	15	145
Mag:1400	15	104
Activité motrice 10-15 minutes		
Série	nombre d'animaux	moyenne
Contrôle	20	184
Mag:175	15	173
Mag:350	15	213
Mag:700	15	258
Mag:1400	15	213

* Mag = α - β -Aspartate de magnésium

TABLEAU II - COMPORTEMENT EXPLORATOIRE CHEZ LA SOURIS
DANS UNE ENCEINTE ANXIOGENE α - β -ASPARTATE DE MAGNESIUM

5	1ère minute		
	Série	nombre d'animaux	moyenne
	Contrôle	20	15
	Mag:175	15	14
	Mag:350	15	15
	Mag:700	15	15
10	Mag:1400	15	15
	2ème minute		
	Série	nombre d'animaux	moyenne
	Contrôle	20	8
	Mag:175	15	8
15	Mag:350	15	9
	Mag:700	15	10
	Mag:1400	15	11
	3ème minute		
	Série	nombre d'animaux	moyenne
20	Contrôle	20	7
	Mag: 175	15	7
	Mag: 350	15	6
	Mag: 700	15	7
25	Mag:1400	15	8
	Total		
	Série	nombre d'animaux	moyenne
	Contrôle	20	30
	Mag: 175	15	29
30	Mag: 350	15	30
	Mag: 700	15	33
	Mag:1400	15	34

TABLEAU III SCORE D'ACTIVITE MOTRICE CHEZ LA SOURIS DANS
UN ACTIMETRE : α - β -ASPARTATE DE MAGNESIUM (ETUDE
CHRONIQUE)

Activité motrice 0-5 minutes		
Série	nombre d'animaux	moyenne
Contrôle	25	88
Mag:10.95	15	98
Mag:21.9	15	104
Mag:43.8	15	104
Mag:87.5	15	99
Mag:175	15	106
Mag:350	15	107
Mag:700	15	104
Activité motrice 5-10 minutes		
Série	nombre d'animaux	moyenne
Contrôle	25	112
Mag:10.95	15	123
Mag:21.9	15	133
Mag:43.8	15	128
Mag:87.5	15	96
Mag:175	15	122
Mag:350	15	141
Mag:700	15	126
Activité motrice 10-15 minutes		
Série	nombre d'animaux	moyenne
Contrôle	25	201
Mag:10.95	15	222
Mag:21.9	15	238
Mag:43.8	15	233
Mag:87.5	15	194
Mag:175	15	228
Mag:350	15	248
Mag:700	15	230

TABLEAU IV

1ère minute			
Série	nombre d'animaux	moyenne	
5	Contrôle	25	13
	Mag:10.95	15	16
	Mag:21.9	15	14
	Mag:43.8	15	13
	Mag:87.5	15	13
	Mag:175	15	12
	Mag:350	15	13
	Mag:700	15	14
2ème minute			
Série	nombre d'animaux	moyenne	
15	Contrôle	25	10
	Mag:10.95	15	11
	Mag:21.9	15	9
	Mag:43.8	15	9
	Mag:87.5	15	9
	Mag:175	15	9
	Mag:350	15	10
	Mag:700	15	10
3ème minute			
Série	nombre d'animaux	moyenne	
25	Contrôle	25	7
	Mag:10.95	15	8
	Mag:21.9	15	6
	Mag:43.8	15	8
	Mag:87.5	15	8
	Mag:175	15	8
	Mag:350	15	8
	Mag:700	15	9
Total			
Série	nombre d'animaux	moyenne	
35	Contrôle	25	30
	Mag:10.95	15	36
	Mag:21.9	15	36
	Mag:43.8	15	30
	Mag:87.5	15	31
	Mag:175	15	30
	Mag:350	15	31
	Mag:700	15	33

TABLEAU V - RECHERCHE D'UN EFFET RELAXANT MUSCULAIRE DE L' α - β -ASPARTATE DE MAGNESIUM

5	Séries	Doses mg.kg ⁻¹ P.O x13	Nombre animaux	Animaux tombés (%)
	Contrôle	-	25	20,0
10	α - β aspartate de magnésium	10,95	25	26,6
		21,9	15	33,3
		43,8	15	46,6
		67,5	15	33,3
		175,0	15	46,6
		350,0	15	33,3
		700,0	15	33,3

15 TABLEAU VI - RECHERCHE D'UN EFFET ANXIOLYTIQUE CHEZ LA SOURIS : TEST DES 4 PLAQUES

Nombre de passages			
Série	nombre d'animaux	moyenne	
20	Contrôle	15	5,8
	Mag: 300	15	6,4
	Mag: 600	15	8,3
	Mag:1200	15	7,5

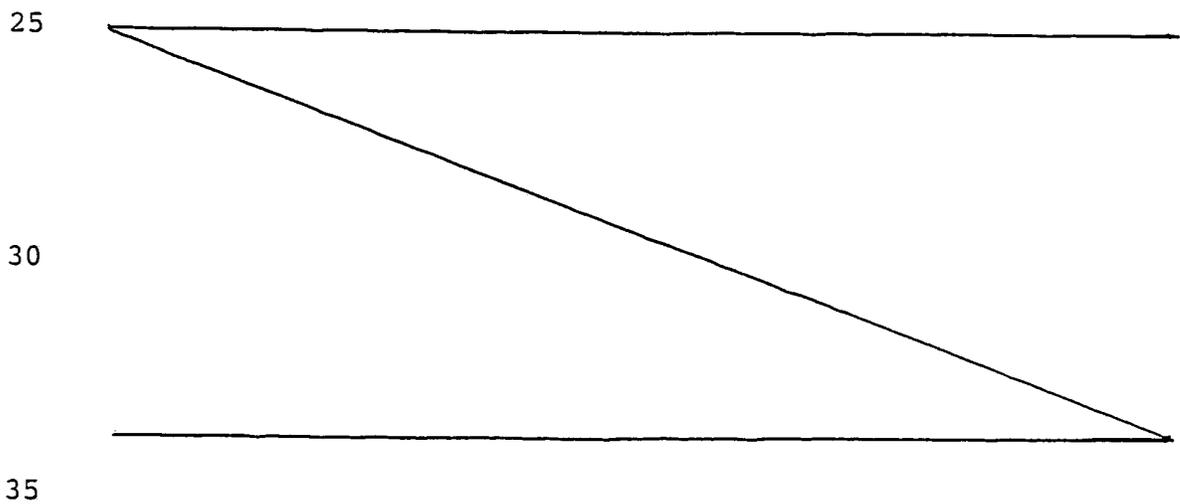


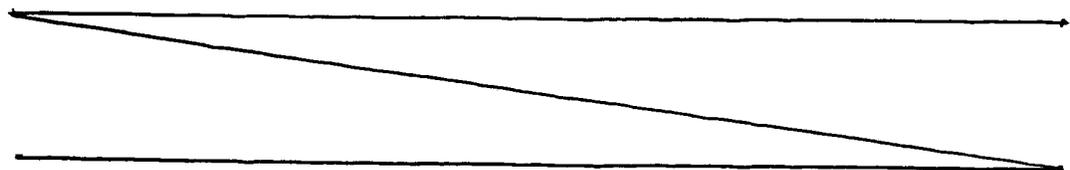
TABLEAU VII - RECHERCHE D'UN EFFET ANXIOLYTIQUE CHEZ LA SOURIS : TEST DES 4 PLAQUES - ETUDE DU VALIUM ET DE L'ASSOCIATION VALIUM- α - β -ASPARTATE DE MAGNESIUM

Nombre de passages		
Série	nombre d'animaux	moyenne
Contrôle	15	5,5
V (0,25)	15	7,3
V (0,5)	15	7,7
V (1)	15	9,5
V (2)	15	10,6
V+Mag: (0,125)	15	7,5
V+Mag: (0,25)	15	8,0
V+Mag: (0,5)	15	9,3
V+Mag: (1)	15	9,6

V = Valium

TABLEAU VIII - RECHERCHE D'UN EFFET ANXIOLYTIQUE CHEZ LA SOURIS : TEST DES 4 PLAQUES - ETUDE DE L'ASSOCIATION VALIUM- α - β -ASPARTATE DE MAGNESIUM (28 mg/kgx13)

Nombre de passages		
Série	Nombre d'animaux	moyenne
Contrôle	30	5,9
V+Mag (0,125)	15	7,5
V+Mag (0,25)	15	7,9
V+Mag (0,5)	15	10,5
V+Mag (1,0)	15	10,3



REVENDEICATIONS

- 1) Procédé de préparation d'un sel équimolaire d'un acide α -aminé dicarboxylique et d'un métal divalent, lequel procédé est caractérisé en ce qu'il comprend une étape dans laquelle on procède à la déprotonation de l'acide α -aminé dicarboxylique en milieu hétérogène, en présence d'un hydroxyde du métal divalent.
- 2) Procédé selon la revendication 1, caractérisé en ce que l'hydroxyde de métal divalent est en excès molaire par rapport à l'acide α -aminé dicarboxylique.
- 3) Procédé selon une quelconque des revendications 1 ou 2, caractérisé en ce que l'acide α -aminé dicarboxylique est l'acide glutamique.
- 4) Procédé selon une quelconque des revendications 1 ou 2, caractérisé en ce que l'acide α -aminé dicarboxylique est l'acide aspartique.
- 5) Procédé selon une quelconque des revendications 1 à 4, caractérisé en ce que l'hydroxyde de métal divalent est l'hydroxyde de magnésium.
- 6) Sels équimolaires d'acide aminé dicarboxylique et de métal divalent caractérisés en ce qu'ils sont obtenus par un procédé selon l'une quelconque des Revendications 1 à 5.
- 7) Sel d'acide aspartique et de magnésium, caractérisé en ce qu'il répond à la formule brute suivante :
- $$\text{C}_4 \text{H}_5 \text{O}_4 \text{NMg}, 2\text{H}_2\text{O},$$
- et en ce qu'il est susceptible d'être obtenu par un procédé selon une quelconque des Revendications 1 à 5.
- 8) Compositions pharmaceutiques caractérisées en ce qu'elles contiennent, en tant que principe actif, un sel équimolaire d'acide aspartique et de magnésium selon la Revendication 7, seul ou en association avec un autre principe actif.

9) Compositions pharmaceutiques selon la revendication 8 caractérisées en ce qu'elles contiennent, en tant que principe actif, un sel équimolaire d'acide aspartique et de magnésium en association avec un anxiolytique.

10) Compositions pharmaceutiques selon la revendication 9 caractérisées en ce que l'anxiolytique est une benzodiazépine.

Figure 1

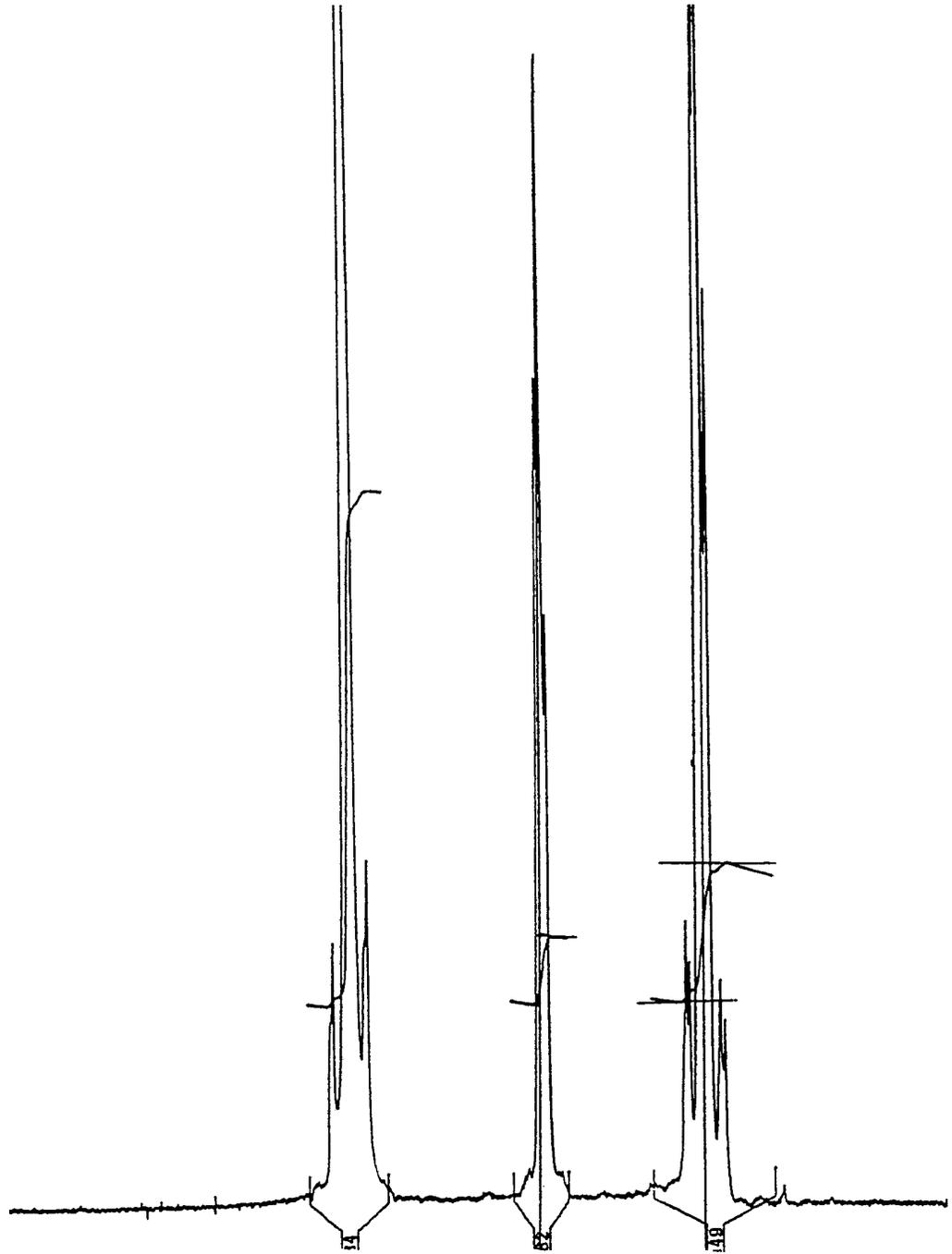


Figure 2

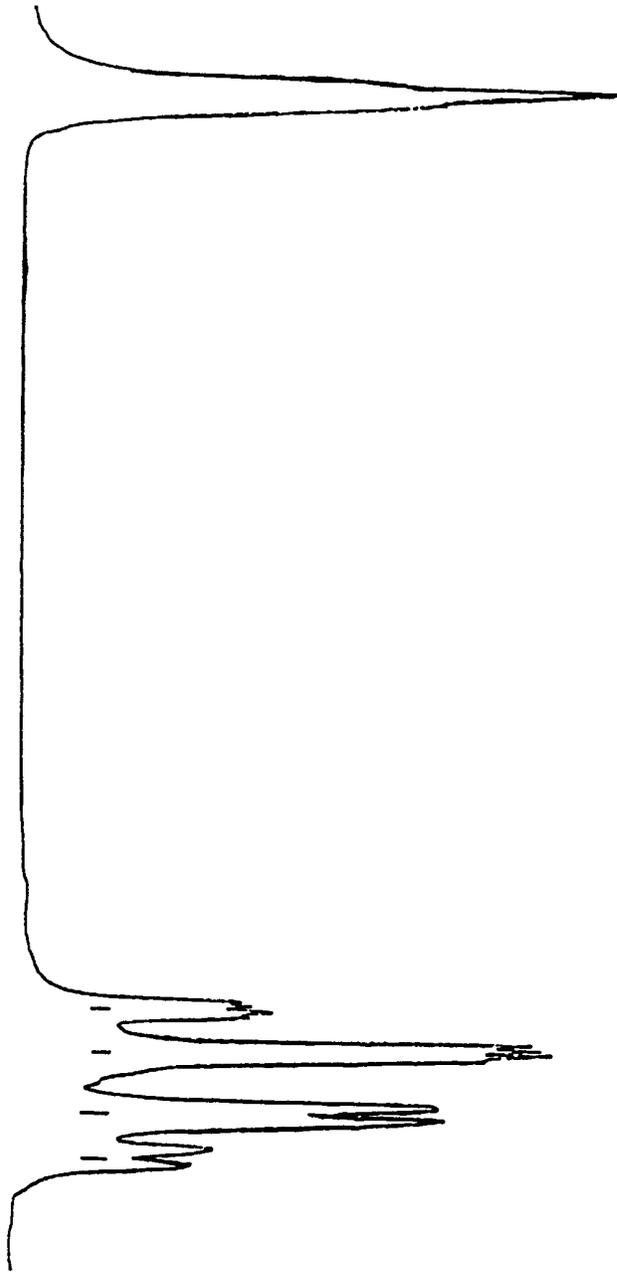
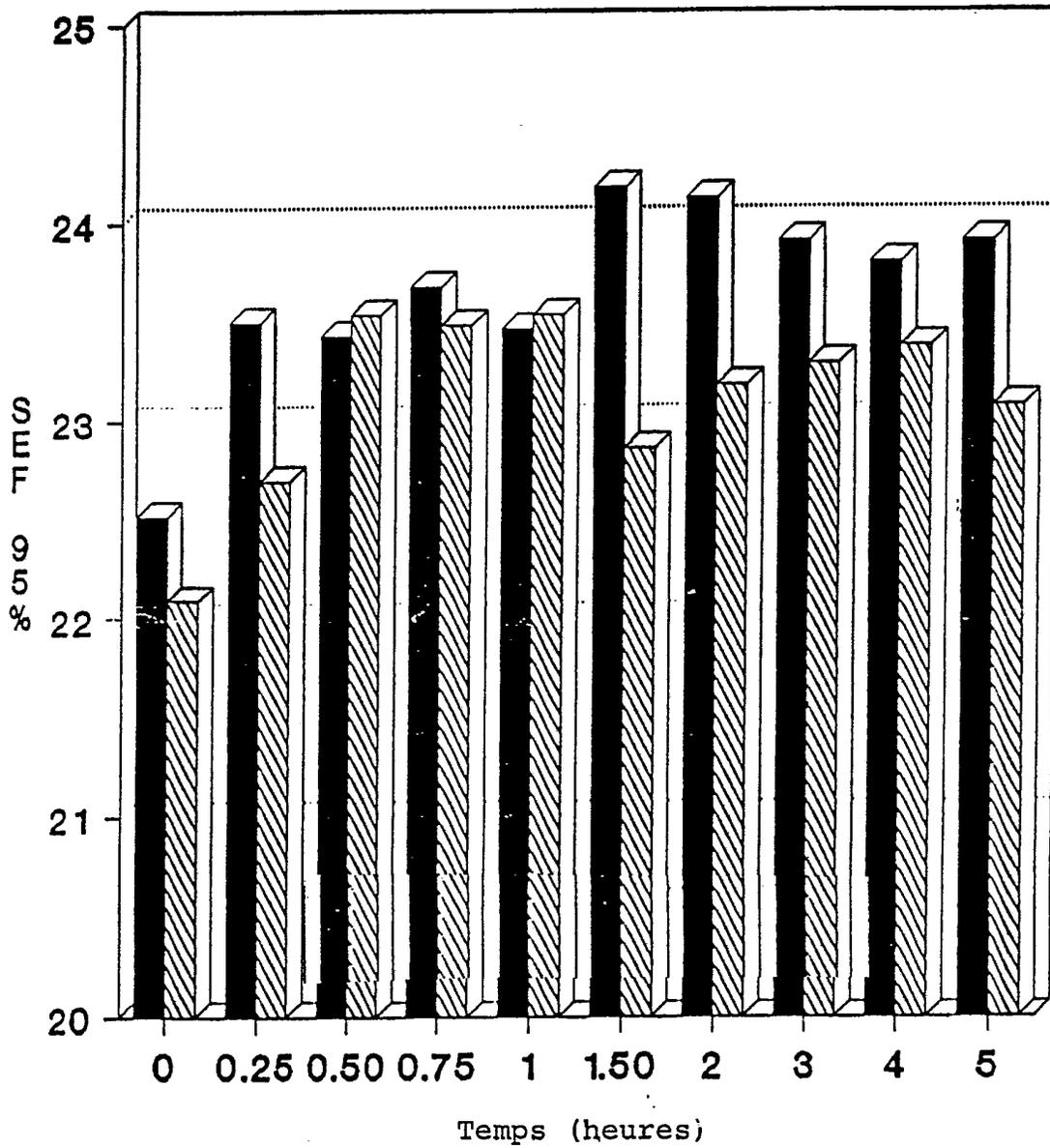


Figure 3

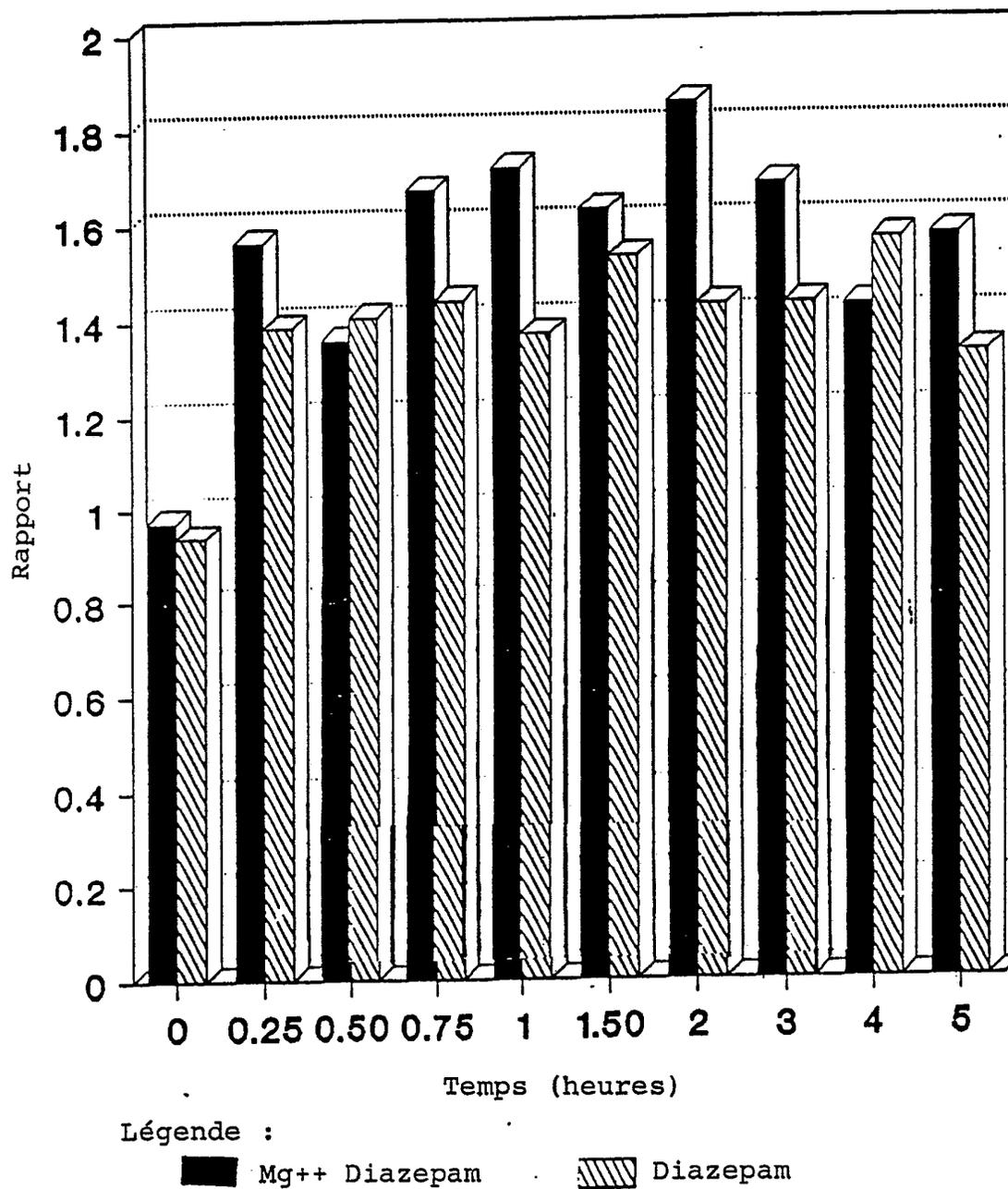


Légende :

■ Mg++ Diazepam

▨ Diazepam

Figure 4



INSTITUT NATIONAL
de la
PROPRIETE INDUSTRIELLE

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

N° d'enregistrement
national

FR 9004353
FA 441045
Page 2

DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS		Revendications concernées de la demande examinée
Catégorie	Citation du document avec indication, en cas de besoin, des parties pertinentes	
A	JOURNAL OF THE ELECTROCHEMICAL SOCIETY OF INDIA vol. 30, no. 4, 1981, BANGALORE pages 336 - 340; R. RAMAJJE GOWDA ET AL. : "INTERACTION OF ACIDIC AMINO ACIDS WITH BIVALENT METAL IONS" * pages 336 - 338 * -----	1
		DOMAINES TECHNIQUES RECHERCHES (Int. Cl.5)
		Examineur
Date d'achèvement de la recherche		RUFET, J
23 OCTOBRE 1990		
<p>CATEGORIE DES DOCUMENTS CITES</p> <p>X : particulièrement pertinent à lui seul Y : particulièrement pertinent en combinaison avec un autre document de la même catégorie A : pertinent à l'encontre d'au moins une revendication ou arrière-plan technologique général O : divulgation non-écrite P : document intercalaire</p> <p>T : théorie ou principe à la base de l'invention E : document de brevet bénéficiant d'une date antérieure à la date de dépôt et qui n'a été publié qu'à cette date de dépôt ou qu'à une date postérieure. D : cité dans la demande L : cité pour d'autres raisons & : membre de la même famille, document correspondant</p>		

EPO FORM 1503 03.82 (P0413)