

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 562 059**

51 Int. Cl.:

A61K 31/315 (2006.01)
A61K 33/30 (2006.01)
A61P 1/04 (2006.01)
A61K 31/43 (2006.01)
A61K 31/7048 (2006.01)
A61K 31/4168 (2006.01)
A61K 31/65 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **25.01.2007 E 07716990 (2)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **11.11.2015 EP 1976532**

54 Título: **Inhibidor de acción rápida de la secreción de ácido gástrico**

30 Prioridad:

27.01.2006 US 762595 P
03.02.2006 US 764834 P
11.10.2006 US 850891 P

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
02.03.2016

73 Titular/es:

YALE UNIVERSITY (100.0%)
Two Whitney Avenue
New Haven, CT 06510, US

72 Inventor/es:

GEIBEL, JOHN P. y
KIRCHHOFF, PHILIPP

74 Agente/Representante:

VEIGA SERRANO, Mikel

Observaciones :

Véase nota informativa (Remarks) en el folleto original publicado por la Oficina Europea de Patentes

ES 2 562 059 T3

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín europeo de patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre concesión de Patentes Europeas).

DESCRIPCIÓN

Inhibidor de acción rápida de la secreción de ácido gástrico

5 **Sector de la técnica**

La presente invención se refiere al uso de sales de cinc farmacéuticamente aceptables, preferentemente, sales de cinc solubles en agua, en combinación con una o más proteínas inhibidoras de la bomba (IBP), para proporcionar acción rápida con efecto opcional de larga duración para reducir la secreción de ácido gástrico, incluyendo la secreción de ácido en el fondo (mediante la inhibición de la ATPasa H⁺ vacuolar) y en la región superior del cuerpo del estómago (mediante la inhibición de la ATPasa H⁺/K⁺), elevar así el pH del estómago durante la fase de reposo, así como reducir la duración de la liberación de ácido por el estómago durante una fase de secretagogo, y para tratar afecciones incluyendo enfermedad por reflujo gastroesofágico (ERGE), enfermedad por reflujo no erosiva (ERNE), síndrome de Zollinger-Ellison (enfermedad de ZE), enfermedad por úlcera, y cáncer gástrico, así como prevenir o reducir la probabilidad de enfermedad por úlcera. Además, las composiciones cuyo uso se reivindica son útiles para tratar pacientes que no responden a los inhibidores de la bomba de protones (IBP) y como alternativa a las terapias tradicionales o afecciones que están causadas por una inhibición rápida y completa de la secreción de ácido inducida por secretagogo.

20 **Solicitudes relacionadas**

Esta solicitud reivindica el beneficio de prioridad de las solicitudes provisionales de Estados Unidos n° US60/762.595, presentada el 27 de enero de 2006, US60/764.834, presentada el 3 de febrero de 2006 y US60/850.891, presentada el 11 de octubre de 2006.

25 **Estado de la técnica**

La generación de ácido clorhídrico concentrado 0,16 N por la célula parietal de mamífero implica una compleja combinación de circuitos de autorregulación neuronales y hormonales¹⁻³. Después de la activación de la célula hay una compleja transferencia celular de iones que permite la formación de ácido⁴⁻⁷. Una perturbación en cualquiera de estos componentes (receptores secretores o transportadores de iones) puede conducir, bien al cese de la secreción de ácido, o bien a la hipersecreción de ácido. En el último caso, más de 30 millones de pacientes por año sufren síntomas de enfermedades relacionadas con el ácido, con cifras que crecen anualmente⁸⁻¹¹. Clínicamente, la liberación incontrolada o la hipersecreción continuada de ácido puede conducir a cambios tanto en el epitelio gástrico como en el intestinal pero, en los casos más serios puede conducir a erosiones del esófago que pueden dar como resultado metaplasia y muerte¹²⁻¹⁴. También han aparecido pruebas recientes de que los periodos recurrentes prolongados de estados hipersecretorios pueden conducir a la formación de carcinoma gástrico¹⁵.

En un intento de diseñar terapias para prevenir la secreción hiperácida, se han empleado diversos procedimientos en los últimos años, de los cuales, los dos que han tenido más éxito son: a) inhibición del receptor de la histamina en la membrana basolateral de la célula parietal, b) fármacos específicos de la bomba de protones dirigidos contra la ATPasa K, H (los llamados inhibidores de la bomba de protones; IBP)¹⁶⁻¹⁸. Estas dos terapias han mejorado considerablemente la calidad de vida de los pacientes que padecen esta enfermedad, sin embargo, hay un número cada vez mayor de pacientes que han experimentado enfermedad recurrente mientras aún están tomando los fármacos^{19, 20}. A pesar de su alto grado de eficacia y del uso clínico mundial, se ha publicado el fracaso en el tratamiento de las enfermedades relacionadas con el ácido, y el grado y velocidad del comienzo del alivio de los síntomas son importantes para los pacientes²¹. Se ha estimado que alrededor del 30 % de los pacientes con ERGE siguen siendo sintomáticos con la dosis habitual de IBP²². Además, los IBP tienen una corta semivida plasmática, lo que suele conducir a una recaída nocturna de la acidez²³. Las dosis terapéuticas orales de IBP llegan al estado estacionario y, por tanto, alcanzan sus niveles eficaces máximos después de 4-5 días con las pautas de típicas de dosificación²⁴. Este comienzo lento y acumulativo de los efectos de los IBP se relaciona con su capacidad para inhibir solo aquellas bombas que están activas cuando el fármaco IBP está disponible. Después de la administración del IBP, hay un retorno a la secreción de ácido que se debe parcialmente a la síntesis *de novo* de la enzima²⁵.

El cinc es una parte esencial de la dieta que requieren todas las células a fin de mantener la integridad y la función de la membrana. La deficiencia de cinc intracelular conduce a episodios apoptóticos y muerte celular²⁶⁻³⁰. Estudios previos han investigado el papel potencial del cinc en la proliferación y generación de la barrera protectora, concretamente la capa de gel mucoso de la superficie del estómago³¹⁻³⁴. Estos estudios han atribuido falsamente la reducción de la secreción de ácido a un aumento del espesor de la capa de gel³³⁻³⁵.

El ácido gástrico ayuda a la digestión de las proteínas; facilita la absorción de hierro, calcio y vitamina B12; y previene el sobrecrecimiento bacteriano. Cuando los niveles de ácido y enzimas proteolíticas superan los mecanismos de defensa de la mucosa, se produce la úlcera. Para evitar el daño que está asociado con estas duras condiciones, el ácido gástrico debe regularse de forma precisa mediante la superposición de vías neurales (p. ej., acetilcolina), hormonales (p. ej., gastrina y grelina), y paracrinas (p. ej., histamina y somatostatina) y, más recientemente, mediante la vía del receptor sensor de calcio. Cualquier alteración a largo plazo en cualquiera de

estas vías reguladoras conduce a la destrucción celular y tisular y a manifestaciones clínicas tales como las enfermedades por úlcera, o a la enfermedad por reflujo gastroesofágico (ERGE). Para tratar la sobreproducción de ácido se emplean habitualmente dos métodos: a) quirúrgicamente, mediante la eliminación del elemento neuronal (vagotomía) o b) farmacológicamente, bien a través de antagonistas del receptor 2 de histamina, bien de inhibidores de la bomba de protones (IBP), o bien de una combinación de ambos.

Los IBP tales como omeprazol son inhibidores irreversibles de la ATPasa H⁺/K⁺ gástrica, recientemente se han desarrollado diversos derivados del compuesto original omeprazol que se unen a múltiples residuos de cisteína sobre la superficie exofacial de la ATPasa H⁺/K⁺ y se han empleado con la esperanza de conseguir una unión molecular más estrecha una acción más prolongada. Tanto rabeprazol como lansoprazol son ejemplos de estos fármacos de unión múltiple y se activan en la luz ácida de la glándula gástrica y modifican los residuos de cisteína situados en la superficie luminal de la ATPasa H⁺/K⁺. En la célula en reposo, las bombas secretoras de ácido se internalizan en un sistema de vesículas tubulares, y están en un estado conformacional tal que los IBP solo pueden inhibir las ATPasas H⁺/K⁺ que ya se han activado y transferido a la superficie apical de la célula parietal.

Aunque la optimización de los perfiles farmacológicos dentro de la clase de los IBP puede proporcionar cierto beneficio clínico, otras áreas de investigación pueden resultar más fructíferas y, además, el ajuste óptimo de los procesos de secreción de ácido aún no se comprende totalmente y la modulación de la secreción de ácido gástrico sigue siendo un objetivo importante para las terapias.

El cinc es necesario para un gran número de procesos biológicos, incluyendo expresión génica, replicación, estabilidad de la membrana, almacenamiento y liberación hormonal y como componente catalítico para las enzimas. No ha habido ninguna investigación sobre las acciones del cinc a nivel celular en relación con los efectos sobre la secreción de ácido.

Helicobacter pylori reside dentro de la capa mucosa de la mucosa gástrica humana. Debido al pH extremadamente bajo, el estómago es un entorno hostil para la mayoría de otros microorganismos. La capacidad de *H. pylori* para proliferar en el estómago se ha atribuido a mecanismos protectores tales como su producción de ureasa, que protege a la bacteria de la acidez gástrica mediante la creación de un microentorno básico. Véase Taylor y Blaser, Epidemiol Rev, 13:42-59, (1991).

El estómago es un órgano grande que puede dividirse en 3 zonas principales que están implicadas en el proceso de la digestión del alimento y la esterilización de los líquidos y el agua. Al definir los procesos funcionales del estómago, se ha dividido habitualmente en dos zonas: Estómago superior y estómago inferior. Se piensa que el estómago superior está compuesto del fondo y el cuerpo superior y muestra contracciones sostenidas de baja frecuencia que son responsables de la generación de una presión basal dentro del estómago. Hay que destacar que estas contracciones tónicas también generan un gradiente de presión desde el estómago hasta el intestino delgado y son responsables del vaciamiento gástrico. De manera interesante, cuando se traga alimento y la consiguiente distensión gástrica que se produce actúa, inhibe la contracción de esta región del estómago, permitiendo que se hinche como un globo formando un gran depósito sin un aumento significativo de la presión. Se piensa que el estómago inferior está implicado en la trituración y licuación de los alimentos mediante la secreción de HCl desde las células parietales que se encuentran en esta sección del estómago. El documento WO2004099182 divulga una sal de cinc de S-omeprazol, los procesos para preparar la sal de cinc, composiciones farmacéuticas que comprenden la sal y el tratamiento o prevención de úlceras gastrointestinales que comprenden la administración de la sal. Rainsford y cols. Pharm Pharmacol 1992; 44: 476-482 divulgan el uso de sal de cinc para reducir el tamaño de la lesión gástrica.

Descripción de las figuras

Las figuras 1A-E muestran el trazado original de la secreción de ácido basal, la secreción de ácido inducida por histamina y la inhibición por ZnCl₂. Se aislaron glándulas gástricas únicas humanas y de rata, se cargaron con el colorante BCECF sensible a pH para medir el pH intracelular sobre células parietales únicas y se calculó el índice de recuperación del pH_i a partir de la pendiente después de una carga de ácido, usando la técnica de prepulso con NH₄Cl. **(A, C)** Alcalinización intracelular estimulada por histamina (100 μM) en ausencia de Na⁺ extracelular como una función de la ATPasa H⁺/K⁺ en las glándulas gástricas. **(B, D)** La salida de protones de las glándulas gástricas inducida por histamina puede bloquearse mediante ZnCl₂ 300 μM. **(E)** Gráfico de barras que resume los datos como medias ± EE (control: n= 32 células, 3 glándulas, 3 animales; histamina: n= 120 células, 15 glándulas, 8 animales; histamina + ZnCl₂: n= 60 células, 6 glándulas, 4 animales).

La figura 2 muestra que el ZnCl₂ inhibe la secreción de ácido de una manera dependiente de la dosis. Dependencia de la concentración de ZnCl₂ de la actividad ATPasa H⁺/K⁺ (alcalinización intracelular expresada como ΔpH/min) en presencia de histamina 100 μmol en comparación con la secreción de ácido basal e inducida por histamina. (n= 40 células, 3-4 glándulas, 3-4 animales para cada concentración de ZnCl₂).

La figura 3 muestra el rápido comienzo del efecto inhibitorio y la reversibilidad con ZnCl₂. **(A)** el trazado original muestra el rápido efecto inhibitorio del ZnCl₂ sobre la secreción de ácido inducida por histamina. Se añadió histamina (100 μM) a lo largo de todo el experimento. Cuando se observó alcalinización intracelular (salida de

protones), se añadió ZnCl_2 (300 μM) al baño de superfusión. La secreción de ácido se suprimió después de unos pocos segundos (parte media plana). Después de la eliminación del ZnCl_2 del baño de perfusión, se enjuagó el fármaco y el aumento del pH intracelular continuó. **(B)** El trazado original muestra la reversibilidad después de incubar y superfundir las células por encima de 20 min con ZnCl_2 (300 μM) e histamina (100 μM) Después de la eliminación del ZnCl_2 del baño de perfusión, se produce la alcalinización intracelular (extrusión de protones).

La figura 4 muestra la secreción de ácido después de la aplicación oral de ZnCl_2 . Se añadió ZnCl_2 300 μmol al agua de bebida. Los animales comieron y bebieron tanto como los animales de control. Antes del experimento se les hizo ayunar durante 12-18 horas. La secreción de ácido inducida por histamina se midió como se ha descrito anteriormente. Las células de los animales tratados con ZnCl_2 mostraron un menor índice de salida de protones. 150 mg/kg/d: $0,022 \pm 0,0045$; (n= 60 células, 10 glándulas, 3 animales), 0,05 mg/kg/d: $0,034 \pm 0,0036$; (n= 60 células, 6 glándulas, 4 animales).

La figura 5 muestra que el ZnCl_2 inhibe la secreción de ácido gástrico en una preparación de estómago completo recién aislado. Las preparaciones *ex vivo* de estómago completo de rata se incubaron en solución de Ringer tamponada con HEPES (control: n= 9), solución de Ringer tamponada con HEPES más histamina 100 μM (n= 8), o solución de Ringer tamponada con HEPES más histamina 100 μmol y ZnCl_2 300 μmol (n= 8). Las preparaciones de estómago incubadas con histamina y ZnCl_2 tuvieron un pH mayor que las que estuvieron en solución de Ringer tamponada con HEPES e histamina, y su pH fue similar al pH del estómago de control.

La figura 6 muestra las mediciones del pH intraluminal de estómago completo usando diversas sales de cinc de acuerdo con la presente invención. Las preparaciones de estómago completo aislado de las ratas se canularon a la altura de la unión esofágica y duodenal y se perfundieron *in vitro* con soluciones de Ringer a pH 7,4 a 37 °C. El perfundido sanguíneo se expuso después a histamina 100 μM para inducir la secreción de ácido. La luz del estómago se infundió con 0,5 cc de solución salina isotónica no tamponada. En algunos estudios se añadió al perfundido de la luz una de las siguientes sales de cinc a una concentración final de 300 μM (cloruro de cinc, sulfato de cinc, acetato de cinc, citrato de cinc). Los datos para cada una de las columnas son la suma de 5 estómagos separados de 5 animales separados. Los datos son la media de todos los estudios con el error estándar de la media mostrado.

Las figuras 7A-C muestran la inmunohistoquímica en fondo de estómago de rata. **(A)** Inmunolocalización de la subunidad α de la ATPasa H^+ , K^+ gástrica en células parietales de glándulas fúndicas de rata (40 X). **(B)** Microscopía electrónica de proteína ATPasa H^+ , K^+ marcada con oro en una célula parietal fúndica. Aquí pueden verse el núcleo, la membrana apical y estructuras de tipo canalicular (8.000 X). **(C)** La misma célula a mayor aumento (25.000 X). Aquí puede verse la proteína ATPasa H^+ , K^+ marcada con oro distribuida en los bordes de las estructuras de tipo canalicular (flechas). (En esta figura: n= núcleo, c= estructura de tipo canalicular, ma= membrana apical).

Las figuras 8 A-D muestran el trazado original de la secreción de ácido basal y la secreción de ácido inducida por histamina en el fondo y el cuerpo gástricos. Se aislaron glándulas gástricas únicas de rata, se cargaron con el colorante BCECF sensible a pH para medir el pH intracelular de las células parietales únicas y se calculó el índice de recuperación del pH_i a partir de la pendiente después de una carga de ácido, usando la técnica de prepulso con NH_4Cl . **(A)** Trazado original de una alcalinización de una glándula F1 (salida de protones) después de eliminar el Na^+ del baño de perfusión. **(B)** Alcalinización intracelular de una glándula F1 estimulada por histamina (100 μM) en ausencia de Na^+ extracelular como una función de la ATPasa H^+ , K^+ . **(C)** trazado de una glándula del cuerpo en condición de reposo. **(D)** Alcalinización intracelular de una glándula del cuerpo estimulada por histamina (100 μM) en ausencia de Na^+ extracelular como una función de la ATPasa H^+ , K^+ .

La figura 9 muestra una serie de secretagogo de glándulas F1. La glándula F1 en condiciones basales sin estimulación muestra índices de alcalinización de $0,039 \Delta \text{pH}_i/\text{min} \pm 0,009$ (n= 52 células/ 8 glándulas/ 5 animales). En presencia de histamina 100 μM , los índices de recuperación fueron $0,042 \pm 0,007 \Delta \text{pH}_i/\text{min}$ (n= 64 células/ 8 glándulas/ 6 animales). En presencia de acetilcolina 100 μM , las glándulas F1 se alcalinizaron a un índice de $0,075 \pm 0,0015 \Delta \text{pH}_i/\text{min}$ (n= 86 células/ 10 glándulas/ 6 animales). En presencia de pentagastrina 100 μM , las glándulas F1 muestran índices de alcalinización de $0,062 \pm 0,007 \Delta \text{pH}_i/\text{min}$ (n= 49 células/ 6 glándulas/ 5 animales).

Las figuras 10 A-D muestran el trazado original de la secreción de ácido comparando glándulas F1 y glándulas del cuerpo con omeprazol y AZD0865. Se aislaron glándulas gástricas de rata únicas, se cargaron con el colorante BCECF sensible a pH para medir el pH intracelular sobre células parietales únicas y se calculó el índice de recuperación del pH_i a partir de la pendiente después de una carga de ácido, usando la técnica de prepulso con NH_4Cl , como se describe anteriormente. **(A)** Trazado original de una medición de pH intracelular que demuestra una alcalinización de la glándula F1 después de la estimulación mediante histamina (100 μM). Este trazado muestra que el omeprazol (200 μM) no inhibe la secreción de ácido en las glándulas F1. **(B)** Trazado de glándula del cuerpo de la alcalinización intracelular después de la estimulación con histamina (100 μM). Este trazado muestra que el omeprazol (200 μmolar) inhibe la secreción de ácido en el cuerpo con un índice

de alcalinización intracelular de $0,014 \pm 0,002 \Delta\text{pH}/\text{min}$. **(C)** Trazado intracelular de las mediciones de pH que demuestran que el AZD0865 no inhibe completamente la extrusión de protones en el fondo como lo hace en el cuerpo. En las glándulas fúndicas que se han expuesto a AZD0865 $10 \mu\text{M}$, la recuperación intracelular es $0,031 \pm 0,006 \Delta\text{pH}/\text{min}$. **(D)** En el cuerpo, el AZD0865 muestra una fuerte inhibición de la recuperación dependiente de potasio, con índices de alcalinización de $0,021 \pm 0,008 \Delta\text{pH}/\text{min}$.

Objeto de la invención

La presente invención se relaciona con composiciones para la inhibición rápida de la secreción de ácido que tiene un potencial escaso o nulo de efectos secundarios. En un primer aspecto, la presente invención se relaciona con composiciones de cinc que comprenden un inhibidor de la bomba de protones y al menos una sal de cinc farmacéuticamente compatible (preferentemente una sal soluble en agua) en una cantidad eficaz que produce un rápido descenso (es decir, dentro de un periodo no superior a alrededor de 5 minutos, no superior a alrededor de 10 minutos, no superior a alrededor de 20 minutos, no superior a alrededor de 30 minutos, no superior a una hora) de la secreción de ácido en el estómago de un paciente con un aumento (elevación) resultante del pH del estómago hasta un nivel del pH intragástrico de al menos 3,0-3,5, al menos 4,0, de 4,0 a 5,0. Un paciente que necesite un aumento del pH del estómago se trata con una cantidad eficaz de una sal de cinc farmacéuticamente compatible de modo que se produce un comienzo rápido de la elevación del pH dentro del estómago. Este método reside en la administración (preferentemente mediante, pero no limitada a la ingestión) de una cantidad eficaz de al menos una sal de cinc farmacéuticamente compatible, preferentemente soluble en agua, y en la que una porción sustancial se disuelve en los jugos gástricos a pH bajo (generalmente menos de alrededor de 2,0) y preferentemente dentro de un intervalo de pH desde pH bajo (alrededor de 1,0 hasta alrededor de 2,0) hasta pH más alto (alrededor de 5,5 hasta alrededor de 7,5 o más) de modo que pueden administrarse cantidades eficaces de cinc para proporcionar una inhibición inicial rápida de la liberación de ácido y un posterior mantenimiento de la inhibición de la liberación de ácido en el estómago. En la presente invención, el ácido gástrico se inhibe preferentemente dentro de un periodo rápido de alrededor de 20 minutos hasta alrededor de 1 hora (generalmente, dentro de un periodo no superior a alrededor de 5 minutos, dentro de un periodo no superior a alrededor de 10 minutos o dentro de un periodo no superior a alrededor de 20 minutos, dentro de un periodo no superior a alrededor de 30 minutos, dentro de un periodo no superior a alrededor de 1 hora).

El rápido descenso de la secreción de ácido en el estómago del paciente se produce a lo largo de todo el estómago (tanto en el estómago superior como en el estómago inferior, a través de la inhibición de la ATPasa H⁺/K⁺), aunque los efectos localizados de los compuestos de acuerdo con la presente invención se producen en el estómago superior, especialmente en la región el fondo del estómago (a través de la inhibición de una segunda proteína ATPasa H⁺/K⁺ distinguible) y/o en el cuerpo superior del estómago superior (a través de la inhibición de la ATPasa H⁺/K⁺). Por tanto, un aspecto adicional de la invención se dirige al uso de cantidades eficaces de compuestos de cinc farmacéuticamente aceptables para la inhibición de la ATPasa H⁺/K⁺ (generalmente a lo largo de todo el estómago), ATPasa H⁺/K⁺ (principalmente en la región del fondo del estómago) y preferentemente de ambas. El hallazgo de que los presentes compuestos pueden usarse para inhibir la ATPasa H⁺/K⁺ en la región del fondo tiene importantes repercusiones clínicas por las siguientes razones:

- 1) La erosión del esófago por la exposición al ácido tiene consecuencias potencialmente mortales debido, bien a hemorragia interna, o bien a úlcera, y/o a la formación carcinóide gástrico por exposición prolongada al ácido. Conforme a la presente invención, como se ha demostrado ahora las glándulas del fondo están en proximidad directa con la unión esofágica, que segregarán ácido y pueden inhibirse mediante los compuestos de acuerdo con la presente invención, lo que hace, por tanto, a los presentes compuestos particularmente eficaces para tratar ERGE, ERNE y afecciones relacionadas.
- 2) Hay un número cada vez mayor de pacientes que se están volviendo insensibles a los IBP (inhibidores de la bomba de protones) y tienen síntomas recurrentes de enfermedad por reflujo ácido. La proteína que identificamos en las glándulas fúndicas no es sensible a los IBP y podría ser la razón de que estos pacientes no respondan a la terapia clásica.
- 3) Los pacientes con IBP durante periodos largos de tiempo parecen mostrar cierto "rebote" de la secreción de ácido. Este resultado podría relacionarse de nuevo con la ATPasa H⁺ del fondo, que demostramos que es sensible a histamina y a los niveles de protones dentro de la célula.

En realizaciones preferidas de este aspecto de la invención, se prefiere una sal de cinc que sea soluble en agua, independientemente del pH (es decir, dentro de un intervalo de pH desde alrededor de 1,0 hasta alrededor de 7,5 o por encima). El cloruro de cinc es la sal preferida para usar en la presente invención. En realizaciones alternativas, se proporciona una mezcla de una sal soluble de cinc de pH bajo con una sal de cinc de pH alto, o una sal de cinc que puede absorberse fácilmente a través del intestino delgado (tal como un compuesto de aminoácido quelado con cinc), opcionalmente en combinación con un tampón farmacéuticamente aceptable. En este aspecto de la invención, se selecciona una cantidad eficaz de una sal de cinc del grupo que consiste en cloruro de cinc (ZnCl₂), acetato de cinc, ascorbato de cinc, un quelato de aminoácido con cinc (mono- o bis- quelato) y mezclas de los mismos, preferentemente se proporciona una mezcla de cloruro de cinc y al menos uno de acetato de cinc, gluconato de cinc,

ascorbato de cinc, y un quelato de aminoácido con cinc solo o en combinación con un vehículo, aditivo o excipiente farmacéuticamente aceptable.

5 La presente invención se relaciona con el uso de al menos una sal de cinc soluble en agua en combinación con al menos un compuesto/composición inhibidor tradicional de la bomba de protones, para proporcionar una rápida acción reductora de la secreción de ácido gástrico, rebajar el pH del estómago, evitar o reducir la probabilidad de enfermedad por úlcera, tratar la enfermedad por úlcera, tratar el cáncer gástrico, tratar una enfermedad o afección seleccionada del grupo que consiste en enfermedad por reflujo gastroesofágico (ERGE), enfermedad por reflujo no erosiva (ERNE), síndrome de Zollinger-Ellison (enfermedad de ZE), enfermedad por úlcera, y cáncer gástrico, así como prevenir o reducir la probabilidad de enfermedad por úlcera.

15 Son aspectos adicionales de la presente invención composiciones farmacéuticas que comprenden una mezcla de sales de cinc que aumentan al máximo las características tanto inmediatas como prolongadas de la presente invención, opcionalmente en combinación con un vehículo, aditivo o excipiente farmacéuticamente aceptable y, además, un inhibidor de la bomba de protones. Una cualquiera o más de estas composiciones puede usarse dentro del contexto para tratar las diversas afecciones/estados patológicos como se divulga de otra forma en el presente documento.

20 Descripción detallada de la invención

Los siguientes términos se usan a lo largo de la especificación para describir la presente invención.

25 El término "paciente" o "sujeto" se refiere a un animal, preferentemente un mamífero, aún más preferentemente un ser humano, con necesidad de tratamiento o terapia, al que se administran los compuestos de acuerdo con la presente invención a fin de tratar una afección o estado patológico tratable usando los compuestos de acuerdo con la presente invención. Dependiendo de la enfermedad o afección tratada, el término paciente se refiere al animal tratado para esa enfermedad dentro del contexto.

30 El término "eficaz" se usa para describir un tratamiento, compuesto, composición, componente o un aspecto relacionado con la presente invención, el cual, cuando se usa en el contexto, produce un resultado intencionado que puede incluir el aumento en el pH del estómago, la reducción de los síntomas asociados con el exceso de liberación de ácido o el tratamiento favorable de un estado patológico o afección. El término eficaz incorpora tanto una cantidad como una concentración de uno o más agente(s) activo(s), como se describe en el presente documento y un periodo de tiempo que es coherente con la producción de un efecto intencionado.

35 La expresión "sal de cinc farmacéuticamente aceptable" o "sal de cinc" usada en el contexto, se refiere a una sal o combinación de sal que contiene cinc, se disuelve en los jugos gástricos a un pH reducido y se absorbe hasta una cierta medida en la mucosa gástrica a un pH bajo de alrededor de 2 o menos, a un pH del estómago mayor de alrededor de 4,0 hasta 5,0 o por encima y a los pH altos del intestino delgado para alcanzar y mantener concentraciones eficaces de cinc en el torrente sanguíneo durante un periodo de terapia. Las sales de cinc farmacéuticamente compatibles de ejemplo incluyen sales de cinc tanto orgánicas como inorgánicas, por ejemplo, acetato de cinc, ascorbato de cinc, butirato de cinc, carbonato de cinc (soluble en ácido diluido al pH bajo del estómago), citrato de cinc, cloruro de cinc, yoduro de cinc, sulfato de cinc, gluconato de cinc, glicerato de cinc, glicolato de cinc, formiato de cinc, lactato de cinc, picolinato de cinc, salicilato de cinc, tartrato de cinc, undenilato de cinc, y quelatos de aminoácido con cinc (incluyendo, dependiendo de la concentración, mono- y bis-quelatos de aminoácidos L- o D- (preferentemente, los aminoácidos L naturales, que pueden absorberse más fácilmente desde el tubo gastrointestinal) los cuales forman complejos o se quelan con cinc, incluyendo preferentemente, L-cisteína, L-cistina, L-N-acetilcisteína, L-histidina (también D-histidina), L-aurina, L-glicinato, L-aspartato y L-metionina, entre otros. Nótese que para los propósitos de la presente invención, los quelatos de aminoácido con cinc se consideran sales de cinc. Preferentemente, la sal de cinc farmacéuticamente aceptable es soluble en agua.

50 Alguien con experiencia habitual reconocerá las sales de cinc favorables para el uso en la presente invención. En aspectos de la invención, se administra a un paciente al menos una sal de cinc soluble en agua farmacéuticamente compatible a fin de proporcionar una rápida inhibición de la liberación de ácido en el estómago, dando como resultado un aumento del pH del estómago hasta por encima de 4 (generalmente entre alrededor de 4,0 y 5,0, en algunos casos por encima de 5,0) durante un periodo prolongado de tiempo, preferentemente al menos 2 horas, 4 horas, 6 horas, 8 horas, 10 horas, 12 horas, 16 horas, 20 horas o más. Se destaca que en ciertos aspectos preferidos de la invención, la sal o combinaciones de sales de cinc elegidas para administrarse al paciente pueden ajustarse para proporcionar una concentración en el bolo inicial de cinc en el estómago a pH bajo a fin de producir la inhibición rápida de la liberación de ácido y elevar el pH en el estómago hasta un nivel por encima de 4. Además, una sal o combinación de sal de cinc preferida inhibe la liberación de ácido en el estómago a niveles variables de acidez y pH - es decir, a un nivel que es bastante ácido (pH menor que alrededor de 2,0) hasta un pH de alrededor de 4,0 o superior.

65 La expresión "proporcionar una acción rápida de reducción de la secreción de ácido gástrico" se usa para describir el hecho que da como resultado un incremento del pH hasta un nivel de al menos alrededor de 4,0, más

preferentemente de 4,0 a 5,0 o ligeramente por encima, en un periodo no superior a alrededor de 30 minutos, preferentemente en menos de 20-30 minutos, preferentemente en menos de 10-20 minutos, en alrededor de 15 minutos o menos o, alternativamente, en menos de alrededor de 5 minutos.

5 El término "secretagogo" se refiere al periodo durante cuyo tiempo las células parietales del estómago segregan ácido dentro de los jugos gástricos para rebajar el pH. A menudo, el periodo de secretagogo se produce justo después de una comida, pero la secreción de ácido puede producirse en otros momentos. La fase de secretagogo puede ser de duración corta o de duración más larga.

10 La expresión enfermedad por reflujo gastroesofágico o "ERGE" o "reflujo ácido" es una afección en la cual el contenido líquido del estómago se regurgita (retrocede o refluye) dentro del esófago. El líquido puede inflamar y dañar el revestimiento del esófago, aunque esto se produce en una minoría de pacientes. El líquido regurgitado suele contener ácido y pepsina que son producidos por el estómago. El líquido refluído también puede contener bilis que ha retrocedido dentro del estómago desde el duodeno. Se cree que el ácido es el componente más perjudicial del líquido refluído. La pepsina y la bilis también pueden perjudicar al esófago, pero su papel en la producción de inflamación y daño esofágicos (esofagitis) no está tan clara como el papel del ácido.

15 La ERGE es una afección crónica. Una vez que empieza, suele ser de por vida. Si hay daño en el revestimiento del esófago (esofagitis), éste también es una afección crónica. Además, después de que el esófago ha cicatrizado con el tratamiento y el tratamiento se ha interrumpido, el daño volverá en la mayoría de los pacientes en unos cuantos meses. Por tanto, una vez que ha empezado el tratamiento para la ERGE, puede ser necesario continuar el tratamiento de forma continua, generalmente durante cortos periodos de tiempo.

20 Realmente, el reflujo del contenido líquido del estómago dentro del esófago se produce en la mayoría de los individuos normales. De hecho, un estudio encontró que el reflujo en los individuos normales se produce tan frecuentemente como en los pacientes con ERGE. En los pacientes con ERGE, sin embargo, el líquido refluído contiene ácido más a menudo y el ácido permanece en el esófago durante más tiempo.

25 La gravedad, la deglución y la saliva son importantes mecanismos protectores para el esófago, pero son eficaces solo cuando los individuos están en posición erguida. Por la noche, durante el sueño, la gravedad no surte efecto, la deglución se interrumpe y la secreción de saliva se reduce. Por tanto, es más fácil que el reflujo que se produce durante la noche dé como resultado una permanencia más prolongada del ácido en el esófago y sea causa de un mayor daño al esófago.

30 Ciertas condiciones hacen que una persona esté predispuesta a ERGE. Por ejemplo, el reflujo puede ser un serio problema durante el embarazo. Los elevados niveles de hormonas del embarazo probablemente causan reflujo mediante el descenso de la presión en el esfínter esofágico inferior (véase más adelante). Al mismo tiempo, el feto en crecimiento aumenta la presión en el abdomen. Es esperable que ambos efectos aumenten el reflujo. Asimismo, los pacientes con enfermedades que debilitan los músculos esofágicos (véase más adelante), tales como escleroderma o conectivopatías mixtas, están más predispuestos a desarrollar reflujo.

35 La causa de la ERGE es compleja. Probablemente, existen múltiples causas, y las diferentes causas pueden ser operativas en individuos diferentes o incluso en el mismo individuo en diversos momentos. Numerosos pacientes con ERGE producen cantidades anormalmente grandes de ácido, pero esto es poco frecuente y no es un factor responsable en la gran mayoría de los pacientes. Los factores que contribuyen a causar ERGE son el esfínter esofágico inferior, hernias de hiato, contracciones esofágicas, y el vaciamiento del estómago. A pesar de la causa de la ERGE, la presente invención puede reducir la tendencia de tener reflujo ácido perjudicial dentro del esófago, causante de daño.

40 Cuando la onda de contracción en el esófago es deficiente, el ácido refluído no se impulsa de vuelta dentro del estómago. En los pacientes con ERGE se han descrito varias anomalías de la contracción. Por ejemplo, las ondas de contracción pueden no empezar después de cada deglución, o las ondas de contracción pueden extinguirse antes de que alcancen el estómago. Asimismo, la presión generada por las contracciones puede ser demasiado débil para impulsar el ácido de vuelta al estómago. Dichas anomalías de la contracción, que reducen el aclaramiento de ácido desde el esófago, se encuentran frecuentemente en los pacientes con ERGE. De hecho, se encuentran con la mayor frecuencia en aquellos pacientes con la ERGE más grave. Se esperaría que los efectos de las contracciones esofágicas anómalas fuesen peores de noche, cuando la gravedad no ayuda a devolver el ácido refluído al estómago. Nótese que fumar también reduce sustancialmente el aclaramiento de ácido desde el esófago. Este efecto continúa durante al menos 6 horas después del último cigarrillo.

45 La mayor parte del reflujo durante el día se produce después de las comidas. Este reflujo se debe, probablemente, a relajaciones transitorias del EEI están causadas por la distensión del estómago con la comida. Se ha encontrado que una minoría de pacientes con ERGE, alrededor del 20 %, tiene estómagos que se vacían de forma anormalmente lenta después de una comida. El vaciamiento más lento del estómago prolonga la distensión del estómago con el alimento después de las comidas. Por tanto, el vaciamiento más lento del estómago prolonga el periodo d tiempo durante el cual es más probable que se produzca reflujo.

La expresión "enfermedad por reflujo no erosiva" o "ERNE" se usa para describir una forma específica de ERGE descrita anteriormente. En algunos casos, la ERGE erosiona el revestimiento del esófago, creando una afección llamada esofagitis. La ERNE es una ERGE que no causa esofagitis. Como la mayoría de los afectados de ERGE no tienen esofagitis, la ERNE es la forma más frecuente de ERGE. Como su nombre contiene la palabra "no erosiva", puede parecer que la ERNE es la forma menos grave de ERGE, pero esto no es así necesariamente. Realmente, es más probable que la ERNE produzca complicaciones extraesofágicas, y también es menos probable que responda a cirugía de funduplicación. En un estudio, solo el 56 % de los pacientes con ERNE (comparado con el 90 % de los pacientes con reflujo erosivo) informaron de que sus síntomas se eliminaron completamente con la funduplicación. También fue el doble de probable que la ERNE causara dificultades de deglución.

La pirosis es el principal síntoma de ERNE. Tiene numerosas causas potenciales, incluyendo hernia de hiato, comportamientos del estilo de vida, y dieta. Muchas personas manejan la pirosis simplemente ajustando su comportamiento. En algunos casos, puede ser necesaria la medicación o la cirugía. Los antiácidos tradicionales también se han usado para tratar la ERNE.

La expresión "síndrome de Zollinger-Ellison" o "síndrome de ZE" se usa a lo largo de la especificación para describir una afección causada por la producción anómala de la hormona gastrina. En el síndrome de ZE, un tumor pequeño (gastrinoma) en el páncreas o el intestino delgado produce los altos niveles de gastrina en la sangre. El síndrome de ZE está causado por tumores que suelen encontrarse en la cabeza del páncreas y en el intestino delgado superior. Estos tumores producen la hormona gastrina y se llaman gastrinomas. Los niveles altos de gastrina provocan sobreproducción de ácido del estómago. Los altos niveles de ácido del estómago conducen a múltiples úlceras en el estómago e intestino delgado. Los pacientes con síndrome de ZE pueden experimentar dolor abdominal y diarrea. El diagnóstico también se sospecha en pacientes sin síntomas que tienen úlcera grave en el estómago y el intestino delgado.

Los agentes de elección para tratar el síndrome de ZE son los inhibidores de la bomba de protones (IBP), como se ha descrito anteriormente en el presente documento. Estos fármacos reducen drásticamente la producción de ácido por el estómago, y promueven la cicatrización de las úlceras en el estómago y el intestino delgado. También proporcionan alivio del dolor abdominal y la diarrea.

Puede intentarse la extirpación quirúrgica de un único gastrinoma si no existen pruebas de que se haya extendido a otros órganos (tales como ganglios linfáticos o el hígado). La cirugía del estómago (gastrectomía) para controlar la producción de ácido raramente es necesaria hoy. El diagnóstico precoz y la extirpación quirúrgica del tumor están asociados a un índice de curación de solo un 20 % a 25 %. Sin embargo, los gastrinomas crecen lentamente, y los pacientes pueden vivir durante muchos años después de que se haya descubierto el tumor. Los medicamentos supresores de ácido son muy eficaces en el control de los síntomas de sobreproducción de ácido.

El término "úlcera" se usa a lo largo de la especificación para describir un área de erosión tisular, por ejemplo, especialmente en el revestimiento del tubo gastrointestinal (GI), especialmente del estómago (úlcera péptica), esófago o intestino delgado (úlcera duodenal). Debido a la erosión, una úlcera es cóncava. Siempre está deprimida por debajo del nivel del tejido circundante. Las úlceras pueden tener diversas causas, pero en el tubo GI, se cree que se deben principalmente a la infección con las bacterias *H. pyloridis* (*H. pylori*). Sin embargo, el estrés, el consumo de tabaco y otros factores no infecciosos, incluyendo especialmente el ácido del estómago excesivo, pueden empeorar las úlceras GI, porque un pH más bajo puede ser un entorno de crecimiento mejor para *H. pyloridis*.

Los tratamientos tradicionales para las infecciones por *H. pyloridis* incluyen antimicrobianos/antibióticos tales como amoxicilina, claritromicina (biacin), metronidazol (flagyl) y tetraciclina (un agente "anti-*H. pylori*"); bloqueantes de H₂, tales como cimetidina (tagamet) famotidina (pepcid), nizatidina (acid), ranitidina (zantac) inhibidores de la bomba de protones (IBP) tales como esomeprazol (nexium), lansoprazol (prevacid), omeprazol (prilosec), pantoprazol (protonix) y rabeprazol (aciphex), agentes citoprotectores, tales como subsalicilato de bismuto, sucralfato; y agentes en combinación, tales como Helidac (combinación de subsalicilato de bismuto, metronidazol y tetraciclina), Prevpac (lansoprazol, claritromicina y amoxicilina).

La presente invención puede usarse para tratar una infección por *H. pyloridis* en un paciente mediante la administración de una cantidad eficaz de al menos una sal de cinc soluble en agua farmacéuticamente aceptable, en combinación (preferentemente mediante coadministración) con al menos uno de otros inhibidores de la bomba de protones, como se describe anteriormente.

La expresión "coadministración" o "terapia de combinación" se usa para describir una terapia en la que se usan al menos dos compuestos activos en cantidades eficaces para tratar uno o más de los estados patológicos o afecciones como se describe de otra forma en el presente documento al mismo tiempo. Aunque el término coadministración incluye preferentemente la administración de dos compuestos activos al paciente al mismo tiempo, no es necesario que los compuestos se administren al paciente al mismo tiempo, aunque estarán presentes en el paciente al mismo tiempo cantidades eficaces de los componentes individuales. Las composiciones activas incluyen una o más sales de cinc y/o compuestos/composiciones adicionales inhibidores de la bomba de protones, en

cantidades eficaces para la enfermedad o condición para la que se usan típicamente los compuestos.

La expresión "inhibidor de la bomba de protones" se usa a lo largo de la especificación para describir inhibidores de la bomba de protones como fármacos que ayudan a controlar el malestar doloroso de la pirosis y la enfermedad por reflujo gastroesofágico (ERGE), y promover la cicatrización de las úlceras estomacales y duodenales. Los inhibidores de la bomba de protones solo están disponibles mediante receta. Vienen como comprimidos, cápsulas, inyecciones, o polvos que se transforman en una suspensión.

Los inhibidores de la bomba de protones funcionan bloqueando la producción de ácido del estómago. Inhiben un sistema del estómago conocido como la bomba de protones, que es otro nombre para el "sistema enzimático de trifosfato de adenosina hidrógeno-potasio". Los inhibidores de la bomba de protones son bastante versátiles. Se usan para cicatrizar las úlceras estomacales y duodenales, incluyendo las úlceras estomacales causadas por la toma de fármacos antiinflamatorios no esteroideos. También se usan para aliviar los síntomas de esofagitis (inflamación del esófago o la garganta) y el reflujo gastroesofágico grave (ERGE), como se discute anteriormente.

Combinados con ciertos antibióticos (tales como amoxicilina claritromicina) o con sales de cinc de acuerdo con la presente invención, los inhibidores de la bomba de protones son eficaces para tratar las infecciones por *Helicobacter pylori* (una infección bacteriana del estómago). La bacteria *Helicobacter pylori* es el principal sospechoso de causar recaídas de las úlceras estomacales. Los IBP también son el tratamiento de primera elección para la rara afección llamada síndrome de Zollinger-Ellison, discutida anteriormente.

Los inhibidores de la bomba de protones presentan efectos secundarios, aunque estos tienden a ser controlables, que incluyen diarrea, sensación de estar enfermo, estreñimiento, flatulencia, dolor abdominal, cefaleas y, más raramente, reacciones alérgicas, prurito, mareos, tobillos hinchados, dolor muscular y articular, visión borrosa, depresión y sequedad de boca, entre otros. El uso a largo plazo de inhibidores de la bomba de protones puede dar como resultado infecciones del estómago. Como los inhibidores de la bomba de protones interrumpen completamente la producción de ácido -y el ácido del estómago ayuda a matar a microbios tales como las bacterias del estómago-, el uso de IBP puede conducir al crecimiento de microbios potencialmente perjudiciales en el estómago.

Los inhibidores de la bomba de protones presentan interacciones farmacológicas significativas, a veces nocivas, incluyendo reacciones con la fenitoína como agente epileptico y la warfarina para prevenir coágulos de sangre, para incrementar sus efectos, con ketoconazol e itraconazol para reducir su absorción, con diazepam (valium) para reducir su metabolismo.

Los inhibidores de la bomba de protones se suelen tomar durante 1-2 meses, pero en algunos casos pueden tomarse durante más tiempo. Los síntomas pueden volver cuando una persona deja de tomar un inhibidor de la bomba de protones. Los inhibidores de la bomba de protones pueden causar hemorragia interna, cuyos signos incluyen vómitos de sangre, si detecta una sustancia similar a granos de café en su vómito, o el paso de heces alquitranosas, vea a su médico inmediatamente.

Los inhibidores comunes de la bomba de protones incluyen omeprazol (Prilosec), esomeprazol (Nexium), lansoprazol (Prevacid), pantoprazol (Protonix) y rabeprazol sódico (Aciphex).

La presente descripción divulgada un método para proporcionar una acción rápida con un efecto opcional de larga duración para reducir la secreción de ácido gástrico, elevar el pH del estómago durante una fase de reposo, reducir la duración de la liberación de ácido por el estómago durante una fase de secretagogo, y para tratar afecciones incluyendo enfermedad por reflujo gastroesofágico (ERGE), enfermedad por reflujo no erosiva (ERNE), síndrome de Zollinger-Ellison (enfermedad de ZE), enfermedad por úlcera, y cáncer gástrico, donde la reducción de la secreción de ácido gástrico es beneficiosa, así como evitar o reducir la probabilidad de enfermedad por úlcera mediante la reducción de la secreción de ácido gástrico.

El método comprende la administración de una cantidad eficaz de al menos una sal de cinc soluble en agua farmacéuticamente aceptable en combinación con un inhibidor de la bomba de protones para aliviar o tratar la afección o estado patológico. Los métodos pueden implicar la administración de una sal de cinc soluble en agua en combinación con otros agentes como se divulga en el presente documento, en una sola vez, o preferentemente durante una mayor duración, normalmente de alrededor de 2-3 días a alrededor de 2-3 meses, con intervalos variables intercalados, dependiendo del pronóstico y la evolución del tratamiento.

Estos agentes incluyen inhibidores de la bomba de protones tales como esomeprazol, lansoprazol, omeprazol, pantoprazol o rabeprazol.

En un aspecto preferido de la invención, se usa al menos una sal de cinc soluble en agua en la que la sal de cinc o la combinación se caracteriza por ser soluble y absorbible (a través de la mucosa gastrointestinal), tanto a pH bajo (es decir, un pH de alrededor de 1-2, que se produce en una condición ácida en el estómago) y un pH más alto (es decir, un pH de alrededor de 4-5 o ligeramente por encima, después de la inhibición de la secreción de ácido en el

estómago, o aun mayor -es decir, un pH de alrededor de 5,5-6,0 en el duodeno hasta alrededor de 6,5-7,5 en el yeyuno e íleon- el pH es ligeramente mayor en el íleon que en el yeyuno). Proporcionando composiciones que son tanto solubles en agua como absorbibles a lo largo de la mucosa gastrointestinal (es decir, en el estómago y a través de las diversas secciones del intestino delgado), la biodisponibilidad de la sal de cinc se aumentará al máximo, al igual que la terapia favorable de las afecciones o estados patológicos a tratar. En este aspecto, se prefiere una combinación de cantidades eficaces de cloruro de cinc y al menos una sal de cinc seleccionada del grupo que consiste en acetato de cinc, gluconato de cinc, ascorbato de cinc y un quelato de aminoácido y cinc (como mono- o bis- quelato de aminoácido), aunque pueden combinarse otros numerosos compuestos ácidos de cinc para producir resultados favorables.

Las sales preferidas de cinc incluyen aquellas sales en las que el contraión aniónico en forma protonada tiene un pKa de al menos alrededor de 4 hasta al menos alrededor de 5,5 o más. Se prefieren mezclas de sales de cinc en las que todas las sales de cinc son solubles dentro de un intervalo de pH desde 1-2 hasta alrededor de 7,5. El acetato de cinc, gluconato de cinc, glicolato de cinc y ascorbato de cinc solos o en combinación con otra sal de cinc, especialmente cloruro de cinc, son particularmente útiles para su uso en la presente invención. También pueden usarse preferentemente quelatos de aminoácidos con cinc (mono- o bis- quelatos de aminoácido), en los que la combinación de cloruro de cinc y un quelato de aminoácido con cinc se seleccionan del grupo que consiste en quelatos con cinc (mono- o bis- quelatos) de L-cisteína, L-cistina, L-N-acetilcisteína, L-histidina D-histidina L-aurina, L-glicinato, L-aspartato, L-metionina, y mezclas de los mismos.

Las sales preferidas de cinc incluyen cloruro de cinc (en el que el pKa del contraión no es importante por su interacción con los canales de cloro) y los ácidos orgánicos incluyendo acetato de cinc (pKa 4,75), gluconato de cinc, y ascorbato de cinc (pKa de 4,2 y 11,6). Además, también pueden usarse preferentemente glicolato de cinc y lactato de cinc, prefiriéndose glicolato de cinc. Se prefiere que cuando se usa una combinación de sales de cinc, que al menos una sal de cinc que es eficaz a bajo pH en el estómago (para la inhibición inmediata de la secreción de ácido) se combine con un agente que pueda presentar un efecto intensificado en el estómago a un pH de 4,0-5,0 o mayor, o que se absorba preferentemente en el intestino delgado (aminoácido un mono- o bis- quelato con cinc).

Aunque sin limitación por la teoría, se cree que una combinación de una sal de cinc que es eficaz a bajo pH en el estómago (tal como cloruro de cinc y también sulfato de cinc) y una o más de las sales orgánicas de cinc que son eficaces a un pH mayor, aumentarán al máximo la liberación de cinc a la mucosa del estómago para obtener un efecto favorable, primero, por disolverse en el jugo gástrico ácido en el estómago, donde se produce una inhibición inicial de ácido y el pH aumenta, y, a continuación, a través de la absorción de cinc (de una sal de cinc), a un pH mayor en el estómago o en el intestino delgado, donde los niveles sanguíneos de cinc aumentarán hasta niveles terapéuticos. La absorción y el efecto de una sal de cinc a niveles mayores de pH en el estómago o al pH mayor del intestino delgado (5,5-7,5 o mayor) es ventajosa porque esta absorción retrasada del cinc reducirá la secreción de ácido gástrico a un tiempo posterior (al efecto inicial a un pH bajo) a lo largo de un periodo prolongado de tiempo. Las composiciones de acuerdo con la presente invención pueden administrarse en una única vez, pero suelen administrarse preferentemente una o dos veces al día por vía oral durante un periodo que oscila desde alrededor de 2-3 días hasta varios meses o más.

Las composiciones también se relacionan con formulaciones de liberación sostenida o prolongada que comprenden un primer componente que permite o facilita la disolución rápida en los jugos gástricos a pH bajo de modo que se efectúe una inhibición rápida de la secreción de ácido (con un aumento simultáneo en el pH hasta un nivel de alrededor de 4,0 hasta alrededor de 5,0 o más) y un segundo componente que libera la sal de cinc al mayor nivel de pH en el estómago o más preferentemente, además en el intestino delgado sobre la base de una liberación sostenida a fin de mantener un nivel eficaz de cinc en el torrente sanguíneo para inhibir la secreción de ácido gástrico en el estómago durante periodos prolongados. El primer componente de acción rápida puede formularse fácilmente usando una sal de cinc que se disuelve en el jugo gástrico a pH bajo (p. ej., cloruro de cinc o sulfato de cinc a un pH de alrededor de 1,0 hasta alrededor de 2,0) usando excipientes habituales tales como lactosa, azúcar glas en forma de polvos, diversas sales de estearato, etc., que se disuelven rápidamente en el estómago, y una segunda formulación de liberación sostenida o prolongada que obliga a usar cualquiera de los numerosos aglutinantes poliméricos, matrices (poliméricas y/o corrosibles), gránulos, o cubiertas entéricas para permitir la liberación de la sal de cinc sobre la base de una liberación sostenida o prolongada en el intestino delgado. Muchos de estos métodos son conocidos en la técnica. Ejemplos de patente tales como la patente de Estados Unidos nº 4.863.741 de Becker, la patente de Estados Unidos nº 4.938.967 de Newton, y cols., la patente de Estados Unidos número 4.940.556 de MacFarlane, y cols., y la patente de Estados Unidos nº 5.202.128 de Morella, y cols., entre muchas otras, pueden ser útiles para proporcionar enseñanzas, todas bien conocidas en la técnica, para la formulación de formulaciones de liberación rápida/sostenida, o formulaciones de liberación prolongada útiles en la presente invención.

Las formulaciones anteriores pueden ser útiles para proporcionar una mayor biodisponibilidad de una o más sales de cinc y opcionalmente, otros agentes que pueden ser útiles en el tratamiento o reducción de la probabilidad de una o más úlceras gástricas, ERGE, ERNE, síndrome de Zollinger-Ellison, cáncer gástrico y la reducción/inhibición de la secreción de ácido en el estómago y la elevación del pH del estómago hasta alrededor de 4,0 o alrededor de 5,0 o más, como se divulga de otra forma en la presente invención. Se destaca que al inhibir la secreción de ácido en el

estómago, las concentraciones sanguíneas de sal de cinc de alrededor de 100 micromolar (μmol) producen inhibición de alrededor del 70 %. Con una concentración de sal de cinc de 300 μmol , la inhibición se aproxima al 100 %. El tiempo de acción de la inhibición desde el lugar de liberación en sangre a 100 μmol o 300 μmol es inmediato (es decir, en cuanto la sal de cinc entra en contacto con la membrana celular, se produce la inhibición). Puede demostrarse que se produce la inhibición dentro de alrededor de 10-15 minutos hasta alrededor de 1 hora en presencia de secretagogo. Las sales de cinc pueden administrarse por vía oral (preferentemente no más de una o dos veces al día) o por vía intravenosa en combinación con fármacos IBP.

Se prefiere el uso de cloruro de cinc solo, o en combinación con al menos una sal adicional de cinc, como se describe de otra forma en el presente documento. Las sales de cinc adicionales preferidas incluyen acetato de cinc, gluconato de cinc, ascorbato de cinc y quelatos de aminoácido con cinc (mono- y bis- quelatos de aminoácido). Estas sales de cinc y combinaciones están en combinación con un inhibidor de la bomba de protones (esomeprazol, lansoprazol, omeprazol, pantoprazol o rabeprazol).

Las composiciones farmacéuticas que comprenden una cantidad eficaz de una sal de cinc farmacéuticamente aceptable sola o, preferentemente en combinación con al menos otra sal de cinc y una cantidad eficaz de un inhibidor tradicional de la bomba de protones tal como esomeprazol, lansoprazol, omeprazol, pantoprazol o rabeprazol, opcionalmente en combinación con un vehículo, aditivo o excipiente, farmacéuticamente aceptable.

Las formulaciones farmacéuticas incluyen aquellas adecuadas para la administración por vía oral, rectal, nasal, tópica (incluyendo bucal y sublingual), vaginal o parenteral (incluyendo la administración intramuscular, subcutánea e intravenosa). Se prefieren las composiciones orales o parenterales (especialmente aquellas para administración IV). Las composiciones de acuerdo con la presente invención también pueden presentarse como un bolo, electuario o pasta. Los comprimidos y cápsulas para la administración oral pueden contener excipientes convencionales tales como agentes aglutinantes, cargas, lubricantes, disgregantes, o agentes humectantes. Los comprimidos pueden estar recubiertos de acuerdo con métodos bien conocidos en la técnica. Las preparaciones orales líquidas pueden estar en forma de, por ejemplo, suspensiones acuosas u oleosas, soluciones, emulsiones, jarabes o elixires, o pueden presentarse como un producto seco para reconstitución con agua u otro vehículo adecuado antes de su uso. Dichas preparaciones líquidas pueden contener aditivos convencionales tales como agentes de suspensión, agentes emulsionantes, vehículos no acuosos (que pueden incluir aceites comestibles), o conservantes. Cuando se desee, como se discute anteriormente en el presente documento, las presentes formulaciones pueden adaptarse para proporcionar características de liberación sostenida del/los ingrediente(s) activo(s) de la composición usando métodos habituales bien conocidos en la técnica. Puede preferirse una composición que proporciona una cantidad eficaz de dosis inicial de sal de cinc en el jugo gástrico a pH bajo seguida de efectos de liberación prolongada del cinc a lo largo de una mayor duración.

En el aspecto farmacéutico de acuerdo con la presente invención, el/los compuesto(s) de acuerdo con la presente invención se formula(n) preferentemente en mezcla con un vehículo farmacéuticamente aceptable. En general, es preferible administrar la composición farmacéutica por vía oral, pero ciertas formulaciones pueden administrarse preferentemente por vía parenteral y, en particular, en forma de dosificación intravenosa o intramuscular, así como mediante otras vías parenterales, tales como transdérmica, bucal, subcutánea, supositoria u otras vías, incluyendo mediante la inhalación intranasal. Las formas de dosificación orales se administran preferentemente en forma de comprimidos o cápsulas (preferentemente, gelatina dura o blanda). Las formulaciones intravenosas e intramusculares se administran preferentemente en solución salina estéril. Por supuesto, alguien con experiencia habitual en la técnica puede modificar las formulaciones dentro de las enseñanzas de la especificación para proporcionar numerosas formulaciones para una vía particular de administración sin volver a las composiciones de la presente invención inestables o comprometer su actividad terapéutica.

En particular, los presentes compuestos son preferentemente fácilmente solubles en agua y pueden usarse mezclas de cinc solubles en agua para efectuar un perfil farmacéutico de liberación inmediata/liberación sostenida. Esto puede aumentar al máximo el efecto inmediato y el efecto de mayor duración, mediante la simple elección del tipo de sal y el consiguiente ajuste de la proporción de la mezcla de sal de cinc. Por supuesto, pueden elegirse excipientes para afectar la distribución y bioequivalencia de las sales de cinc usadas. Está dentro de la experiencia habitual modificar la vía de administración y la pauta de dosificación de un compuesto particular a fin de manejar la farmacocinética de los presentes compuestos para el máximo efecto beneficioso para el paciente.

Las formulaciones que contienen los compuestos de la invención pueden tomar forma de sólido, semisólido, polvo liofilizado, o formas de dosificación líquidas, tales como, por ejemplo, comprimidos, cápsulas, polvos, formulaciones de liberación sostenida, soluciones, suspensiones, emulsiones, supositorios, cremas, pomadas, lociones, aerosoles o similares, preferentemente en formas de unidad de dosificación adecuadas para una administración simple de las dosificaciones precisas.

Las composiciones incluyen típicamente un vehículo o excipiente farmacéutico convencional y pueden incluir adicionalmente otros agentes medicinales, vehículos, y similares. Preferentemente, la composición será un compuesto o compuestos de sal de cinc de acuerdo con la invención de alrededor de 0,05 % hasta alrededor de 75-80 % en peso, consistiendo el resto en aditivos, vehículos y/o excipientes farmacéuticos adecuados. Para la

administración oral, dichos excipientes incluyen grados farmacéuticos de manitol, lactosa, almidón, estearato de magnesio, sacarina sódica, talco, celulosa, glucosa, gelatina, sacarosa, carbonato de magnesio, y similares. Si se desea, la composición también puede contener cantidades menores de sustancias auxiliares atóxicas tales como agentes humectantes, agentes emulsionantes, o tampones.

5 Las composiciones líquidas pueden prepararse mediante la disolución o dispersión de los compuestos (alrededor de 0,5 % hasta alrededor de 20 %), y aditivos farmacéuticos opcionales tales como, por ejemplo, solución salina acuosa, dextrosa acuosa, glicerol, o etanol, para formar una solución o suspensión. La composición para uso en
10 preparación oral líquida puede prepararse como una solución, suspensión, emulsión, o jarabe, suministrándose bien en forma líquida o bien en forma deshidratada adecuada para hidratación en agua o solución salina normal.

15 Cuando la composición se emplea en forma de preparaciones sólidas para administración oral, las preparaciones pueden ser comprimidos, gránulos, polvos, cápsulas o similares. En una preparación tal como de sacárido o celulosa, se usan típicamente un aglutinante tal como pasta de almidón o metilcelulosa, una carga, un disgregante y otros aditivos en la fabricación de preparaciones médicas.

20 Una composición inyectable para administración parenteral contendrá típicamente el compuesto en una solución i.v. adecuada, tal como solución salina fisiológica estéril. La composición también puede formularse como una suspensión en un lípido o fosfolípido, en una suspensión liposómica, o en una emulsión acuosa.

25 Las composiciones farmacéuticas de esta invención también pueden administrarse mediante aerosol nasal o inhalación. Dichas composiciones se preparan de acuerdo con técnicas bien conocidas en la técnica de la formulación farmacéutica y pueden prepararse como soluciones en solución salina, empleando alcohol bencílico u otros conservantes adecuados, promotores de la absorción para aumentar la biodisponibilidad, fluoruros de carbono, y/u otros agentes solubilizadores o dispersantes convencionales.

30 Los métodos para preparar dichas formas de dosificación son conocidos o serán evidentes para los expertos en la técnica.; véase, por ejemplo, "Remington's Pharmaceutical Sciences" (17^a Ed., Mack Pub. Co, 1985). La persona de experiencia habitual aprovechará los parámetros farmacocinéticos favorables de las formas de profármaco de la presente invención, cuando sea procedente, en la administración de los presentes compuestos a un paciente afectado de una infección viral para aumentar al máximo el efecto intencionado del compuesto.

35 Las composiciones farmacéuticas usadas de acuerdo con la invención también contienen inhibidores de la bomba de protones. Además, también pueden contener agentes anticancerosos (para tratar el cáncer gástrico). Las cantidades o concentraciones eficaces de cada uno de los compuestos activos son para incluir dentro de las composiciones farmacéuticas usadas de acuerdo con la presente invención.

40 Los componentes individuales de dichas combinaciones pueden administrarse, bien de manera secuencial o bien de manera simultánea en formulaciones farmacéuticas separadas o combinadas.

45 Cuando uno o más de los compuestos e acuerdo con la presente invención se use en combinación con un segundo agente terapéutico activo, la dosis de cada compuesto puede ser, bien la misma, o bien diferente de cuando el compuesto se usa solo. Los expertos en la técnica apreciarán fácilmente las dosis apropiadas.

Los siguientes ejemplos se usan para describir la presente invención. Se entiende que son meros ejemplos y se entiende que no limitan la amplitud de la invención en ninguna forma.

Ejemplos

50 El estómago produce ácido para ayudar a romper el alimento, haciéndolo más fácil de digerir. En algunos casos, el ácido del estómago puede irritar realmente el revestimiento del estómago y el duodeno (extremo superior del intestino delgado). Algunas veces el ácido "refluye" hacia arriba e irrita el revestimiento del esófago. La irritación del revestimiento del estómago o del esófago causa indigestión ácida (pirosis) y a veces causa úlceras o hemorragia.

55 Demostramos en esta solicitud particular que el ZnCl₂ tiene un potente efecto inhibidor de la secreción de ácido gástrico a nivel celular mediante la supresión de la actividad de la ATPasa H⁺/K⁺ gástrica en glándulas gástricas de rata y humanas. También demostramos que la adición de concentraciones micromolares de ZnCl₂ puede evitar de forma eficaz la secreción de ácido dependiente de histamina en estómagos de rata completos y a través de una dieta enriquecida con ZnCl₂.

60 Materiales y métodos

65 **Animales.** Se alojaron ratas Sprague-Dawley de 150-250 g (Laboratorio Charles River) en habitáculos con ciclos de luz y condiciones controladas de climatización y humedad, se alimentaron con pienso normal con acceso libre al agua, y se manipularon de acuerdo con las prácticas humanas de cuidado animal establecidas por el *Yale Animal Care*. Antes de los experimentos se hizo ayunar a los animales durante 18-24 horas con acceso libre al agua.

Aislamiento de glándulas gástricas de rata y humanas. Después de la extirpación del estómago, el estómago se abrió longitudinalmente y el cuerpo y el antro se aislaron y se cortaron en secciones de 0,5 cm cuadrados, y se lavaron en solución de Ringer fría para eliminar las partículas residuales de alimento. Los tejidos se transfirieron a la platina de un microscopio de disección. Las glándulas individuales se aislaron usando una técnica de disección manual como se ha descrito previamente³⁶. Después del aislamiento, se permitió que las glándulas individuales aisladas se adhirieran a cubreobjetos que habían sido pre-cubiertos con Cell-Tak (Collaborative Research, Bedford, MA) y se transfirieron a la platina de un microscopio invertido.

El tejido humano se transfirió desde el quirófano en una solución de Ringer tamponada con HEPES. El tejido se conservó en hielo y las glándulas aisladas se diseccionaron inmediatamente como se describe anteriormente.

Toma de imágenes digitales para el pH intracelular. Las glándulas gástricas aisladas se incubaron en solución de Ringer tamponada con HEPES que contenía 10 μmol de colorante sensible a pH BCECF-AM (2',7')-bis-(2-carboxietil)-5-(y -6)-carboxi-fluoresceína, o de éster acetometílico (Molecular Probes, Eugene, OR) durante 10 minutos, como se ha descrito previamente³⁷⁻³⁹. Después de cargar el colorante, la cámara se enjuagó con una solución de HEPES para eliminar todo el colorante no desesterificado. La cámara de perfusión se montó en la platina de un microscopio invertido (Olympus IX50), que se usó en el modo de epifluorescencia con un objetivo de 40 X. El BCECF se excitó con éxito a 440 nm y 490 nm desde la fuente luminosa de un monocromador, y la señal fluorescente resultante se verificó a 535 nm usando una cámara con dispositivo de carga intensiva acoplada. Las regiones individuales de interés se señalaron y se verificaron simultáneamente cada 15 seg. durante el curso del experimento. Se seleccionó un mínimo de 8 células o regiones por glándula.

La extrusión de protones por células parietales individuales se verificó mediante la observación de la recuperación del pH_i después de cargar con ácido las células con solución de HEPES sin Na^+ que contenía NH_4Cl 20 mM. Las células parietales se superfundieron posteriormente con HEPES sin Na^+ , lo que suprimió toda la actividad del intercambiador Na^+/H^+ (NHE, Na^+/H^+ *Exchanger*), atrapando H^+ dentro del citosol e iniciando una caída inmediata en el pH_i . En estas condiciones, la única vía potencial de extrusión de H^+ es mediante la activación de la ATPasa H^+/K^+ .

Los datos de la proporción de intensidad (490/440) se convirtieron a valores de pH mediante el uso de la técnica de calibración con nigericina/alto K^+ ⁴⁰. Los índices de recuperación del pH intracelular se calcularon a partir del mismo pH de partida inicial para eliminar la variación potencial en el poder tamponador intracelular individual de las células en condiciones experimentales diferentes. Todos los datos, incluyendo las imágenes individuales para todas las longitudes de onda, se registraron en el disco duro, lo que nos permitió volver a las imágenes individuales después del experimento para más análisis. Los índices de recuperación se expresan como el $\Delta\text{pH}/\text{min}$, y se calcularon sobre el intervalo de pH de 6,5-6,8. Todos los datos se obtuvieron de Sigma y Molecular Probes. Todos los datos se resumieron como las medias \pm EE y se analizaron mediante la agrupación de las mediciones a los valores iniciales.

Mediciones del pH en estómago completo. Antes de los experimentos, se hizo ayunar a los animales durante 24 horas para reducir la secreción basal de ácido hasta un mínimo consistente. Los animales se mataron con una sobredosis de isoflurano y se realizó una incisión abdominal. El estómago se ligó en la unión esofágica y la duodenal y se escindió. Después, se infundió dentro de la luz del estómago 1 ml de solución salina isotónica no tamponada (140 mM). Este volumen no distendió el estómago, evitando así la estimulación potencial de la secreción de ácido por el estiramiento. Los estómagos se colocaron después, bien en solución de Ringer oxigenada tamponada con HEPES o bien en la misma solución que contenía histamina 100 μM sola o, además, ZnCl_2 300 μM (pH 7,4) y se mantuvieron al 37 °C. Después de 1 hora, los contenidos de los estómagos se aspiraron y se registró el pH.

Aporte complementario de cinc oral en ratas. Estos estudios se diseñaron para modular la secreción de ácido mediante el incremento del cinc alimentario. En estos estudios, usamos una solución oral con ZnCl_2 (cloruro de cinc en agua corriente). Los animales tuvieron acceso libre al alimento y al agua que contenía cinc durante la duración del estudio. Se añadieron 150 mg/kg/d o 0,5 mg/kg/d de ZnCl_2 al agua de bebida durante 5 días. Los animales tuvieron acceso libre al agua antes del experimento y se alimentaron con pienso normal hasta 24 horas antes del experimento, en cuyo punto tuvieron acceso únicamente al agua que contenía ZnCl_2 . Después del periodo de exposición de 5 días y del ayuno de 24 horas, los animales se sacrificaron y se realizó una gastrectomía total sobre los animales. Las glándulas gástricas individuales se aislaron con la técnica de disección manual descrita anteriormente.

Resultados

El ZnCl_2 inhibe la secreción de ácido inducida por histamina en seres humanos y ratas. En las primeras series, se utilizaron las mediciones de pH_i de células parietales únicas dentro de glándulas gástricas recién aisladas para medir la actividad ATPasa H^+/K^+ . La actividad de la bomba de protones se calculó a partir del índice de alcalinización del pH_i ($\Delta\text{pH}_i/\text{min}$) después de la acidificación usando la técnica de prepulso con NH_4Cl en ausencia de sodio y bicarbonato. La extrusión de H^+ en estas condiciones depende de la actividad de la ATPasa H^+/K^+ , como se ha demostrado anteriormente⁴¹. En ausencia de cualquier estimulación, solo se observó un bajo índice de recuperación del pH_i ($0,011 \pm 0,002$ unidades de pH_i/min), $n = 32$ células de 3 glándulas de 3 animales; fig. 1E). Tras la exposición de las glándulas gástricas de rata a histamina (100 μM), el índice de alcalinización aumentó hasta $0,051 \pm 0,004$ unidades de pH/min , ($n = 60$ células de 15 glándulas de 8 animales; fig. 1A). La adición de ZnCl_2 300 μM al baño de

superfusión en presencia de histamina (100 μM) previno el efecto estimulador de la histamina sobre el del índice de recuperación de pH_i independiente de Na^+ ($0,0012 \pm 0,004$ unidades de pH/min) y lo redujo hasta el mismo nivel que el observado en las glándulas de control no expuestas a la histamina ($n= 60$ células de 6 glándulas de 4 animales); fig. 1B). Las glándulas gástricas humanas también mostraron una fuerte salida de protones bajo la estimulación por histamina. Este efecto se suprimió mediante ZnCl_2 (fig 1C, D); ($n= 26$ células, 3 glándulas). Por tanto, las glándulas gástricas de rata y humanas recién aisladas mostraron actividad $\text{ATPasa H}^+/\text{K}^+$ que podía estimularse mediante histamina e inhibirse mediante ZnCl_2 .

El ZnCl_2 inhibe la secreción de ácido de una forma dependiente de la dosis. El ZnCl_2 inhibió la extrusión de H^+ de una forma dependiente de la dosis (fig.2). En este protocolo, la secreción de ácido se estimuló mediante histamina y se expresó como $\Delta\text{pH}_i/\text{min}$. Por lo tanto, las glándulas gástricas de ratas se incubaron con histamina 100 μM (15 min) y la histamina estuvo presente a lo largo de todo el experimento. Para investigar la potencia inhibitoria del ZnCl_2 , usamos diferentes concentraciones (25 μM -300 μM). El ZnCl_2 estuvo presente durante todo el experimento, incluyendo el periodo de incubación con histamina de 15 min. El ZnCl_2 300 μM mostró una inhibición de la extrusión de protones del 98 % comparada con el índice inducido por la histamina y el control.

Comienzo rápido e inhibición reversible de la secreción de ácido gástrico por ZnCl_2 . Hay disponibles bloqueantes de ácido irreversibles (p. ej., omeprazol) y reversibles (BAC-P)⁴². Nosotros investigamos la reversibilidad del efecto inhibitorio del ZnCl_2 en nuestro entorno *in vitro*. Por tanto, estimulamos la secreción de ácido con histamina (100 μM) durante todo el experimento. Cuando se observó alcalinización intracelular (secreción de ácido), se añadió ZnCl_2 (300 μM) al baño de superfusión. La secreción de ácido se suprimió después de unos pocos segundos (fig. 3A). Después de la eliminación del ZnCl_2 en el mismo experimento, la secreción de ácido vuelve a niveles normales. También fuimos capaces de demostrar reversibilidad después de la incubación y superfusión de células parietales por encima de 20 min con ZnCl_2 (300 μM) e histamina (100 μM). Tras la eliminación del ZnCl_2 del baño de superfusión, la alcalinización intracelular (extrusión de protones) continuó al índice normal no inhibido (fig. 3 B).

El aporte complementario de cinc oral reduce la secreción basal de ácido gástrico en la rata. Estos estudios se diseñaron para modular la secreción de ácido mediante el incremento del cinc alimentario. Se añadieron 150 mg/kg/d o 0,5 mg/kg/d de ZnCl_2 al agua de bebida durante 5 días. El índice de extrusión de H^+ se midió con BCECF como se ha descrito anteriormente. Las células parietales estimuladas con histamina mostraron un fuerte índice de recuperación (extrusión de protones) de $0,051 \pm 0,004$ ($n= 120$ células de 15 glándulas de 8 animales). La fig. 4 muestra que el ZnCl_2 (150 mg/kg/d o 0,5 mg/kg/d) en el agua de bebida redujo la secreción de ácido inducida por histamina significativamente en comparación con el grupo de control con histamina sola. 150 mg/kg/d: $0,022 \pm 0,0045$; ($n= 60$ células de 10 glándulas de 3 animales), 0,05 mg/kg/d: $0,034, \pm, 0,0036$; ($n= 60$ células de 6 glándulas de 4 animales).

El ZnCl_2 redujo la producción de ácido gástrico *ex vivo*. Para determinar si el ZnCl_2 podía inhibir la secreción de ácido gástrico en el órgano completo, examinamos el pH luminal en estómagos de rata recién aislados después de la incubación en HEPES o en la misma solución en presencia de histamina 100 μM o de ambos, histamina 100 μM y ZnCl_2 300 μM . como se ilustra en la figura 5, en presencia de histamina, el pH luminal fue menor que en las preparaciones de estómago de control incubadas en HEPES solo ($3,15 \pm 0,27$ frente a $4,59 \pm 0,48$, $n= 9$ para cada una, $P < 0,005$). En presencia de histamina y ZnCl_2 , el pH luminal fue casi tan alto como en el grupo de control sin estimulación, aunque estos hallazgos no fueron significativos ($4,54 \pm 0,065$ frente a $4,59 \pm 0,48$, $n= 8$ cada grupo, $P > 0,005$).

Las diferentes sales de cinc muestran diferente eficacia en la elevación del pH intraluminal. Se realizaron mediciones del pH intraluminal del estómago completo usando diversas de sales de cinc de acuerdo con la presente invención para evaluar el efecto de la sal y de la concentración sobre el pH intraluminal. Las preparaciones de estómago completo aislado de las ratas se canularon a la altura de la unión esofágica y duodenal y se perfundieron *in vitro* con solución de Ringer a pH 7,4 a 37 °C El perfundido sanguíneo se expuso después a histamina 100 μM para inducir la secreción de ácido. La luz del estómago se infundió con 0,5 cc de solución salina isotónica no tamponada. En algunos estudios se añadió al perfundido de la luz una de las siguientes sales de cinc a una concentración final de 300 μM (cloruro de cinc, sulfato de cinc, acetato de cinc, citrato de cinc). Los datos para cada una de las columnas son la suma de 5 estómagos separados de 5 animales separados. Los datos son la media de todos los estudios con el error estándar de la media mostrado. Esos resultados aparecen en la figura 6 adjunta.

Discusión

En este estudio, examinamos la inhibición dependiente de la dosis de la secreción de ácido gástrico por ZnCl_2 en glándulas humanas y de rata. Además, tratamos de evaluar el comienzo del efecto del ZnCl_2 y usamos preparación de estómago completo, así como aporte complementario de cinc oral para investigar el efecto sobre la secreción de ácido gástrico.

La secreción de ácido se indujo mediante la clásicamente conocida histamina secretagoga, que condujo a una fuerte

extrusión de protones mediante la ATPasa H^+,K^+ en comparación con la secreción basal de ácido en la glándula en reposo sin estimular (fig. 1E). En estudios posteriores examinamos los efectos inhibitorios del $ZnCl_2$ sobre la secreción de ácido gástrico sensible a secretagogo. Confirmamos la potencia inhibitoria del $ZnCl_2$ (300 μM) sobre la secreción de ácido inducida por histamina. El $ZnCl_2$ inhibe la secreción de ácido en la glándula gástrica única de una forma dependiente de la dosis. El $ZnCl_2$ suprimió la extrusión de protones hasta un nivel comparable al de los experimentos de control tanto en glándulas gástricas humanas como de rata (fig.). Esta dosis sería equivalente a un aporte complementario de 40 mg por día en los seres humanos. La cantidad diaria recomendada de ingesta de zinc es de 11 mg. En la bibliografía, la dosis que se considera que es tóxica es 10 veces mayor. Por tanto, 40 mg de $ZnCl_2$ como un bloqueante ácido oral sería significativamente menor que las dosis tóxicas publicadas. Además, una cantidad similar de $ZnCl_2$ también previno la secreción de ácido en las preparaciones *ex vivo* de estómago completo (fig. 5). En estos experimentos, el $ZnCl_2$ se aplicó en la cara luminal del estómago y puede concluirse, por tanto, que el ion metálico está funcionando directamente sobre la ATPasa H^+/K^+ de la célula parietal o entra en la célula para modular la vía de señalización de la secreción de ácido. Sigue sin estar claro cómo entra el $ZnCl_2$ en la célula. Estudios previos describieron la entrada de zinc dentro de la célula a través de canales de Ca^{2+} dependientes de voltaje y/o el intercambiador HCO_3^-/Cl^- de la membrana basolateral. El $ZnCl_2$ aplicado por vía oral confirmó nuestros resultados previos. La extrusión de protones por las ratas tratadas con $ZnCl_2$ fue significativamente menor que la secreción de ácido por nuestro grupo de control (fig. 4). El control se refiere a estimuladas con histamina. En la figura, las glándulas tratadas con cinc son aún mayores que el control (sin tratar con histamina) solo.

Como se ha mencionado en la introducción, los inhibidores de la bomba de protones tienen un comienzo retardado de la acción agudo y el efecto inhibitorio total es lento, requiriendo varios ciclos de dosis. Por ejemplo, el omeprazol alcanza una inhibición de la secreción de ácido de solo un 30 % en el primer día de tratamiento⁴³. Nuestro caracteriza el comienzo rápido de la acción del $ZnCl_2$, así como su reversibilidad. Un comienzo más rápido del efecto y una mayor duración de la acción ofrecería mejoría a los pacientes con ERGE y otros trastornos relacionados con el ácido. De hecho, como se muestra en la fig. 5A, fuimos capaces de inhibir la secreción de ácido inducida por histamina durante la máxima extrusión de protones mediante la adición de $ZnCl_2$ 300 μM . Por otra parte, la secreción de ácido inducida por histamina continuó después de la eliminación del $ZnCl_2$ del baño de superfusión, demostrando la naturaleza reversible del $ZnCl_2$ (fig. 3B). En resumen, nuestros hallazgos indican que el $ZnCl_2$ ofrece una inhibición más rápida y prolongada de la secreción de ácido gástrico. Es un inhibidor reversible y de acción rápida de la secreción de ácido en glándulas gástricas únicas de rata y humanas y también en preparaciones de estómago completo.

Dicho tratamiento puede proporcionar un beneficio significativo a los pacientes con ERGE. Los estudios futuros que investiguen el mecanismo exacto por el cual el $ZnCl_2$ inhibe la secreción de ácido, son necesarios y ayudarán a definir su futuro lugar en el tratamiento de las enfermedades relacionadas con la liberación de ácido en el ámbito clínico.

Región del fondo

En los siguientes ejemplos, se demuestra que la región del fondo del estómago y las glándulas fúndicas contienen proteínas funcionales secretoras de ácido. Además, se demuestra que las glándulas fúndicas tienen una proteína independiente del sodio y del potasio, la ATPasa de protones, denominada comúnmente como ATPasa H^+ vacuolar. Las pruebas consisten en datos de inmunofluorescencia usando un anticuerpo dirigido contra la subunidad α de la ATPasa H^+ y datos funcionales (figuras 7-10) en los que se mide el índice de extrusión de protones de estas células en ausencia de Na y K. Además, hay pruebas de que este proceso se amplifica en presencia de histamina, un compuesto, que se pensaba que solo incluía sobre la ATPasa H,K gástrica que se encuentra en las células parietales del cuerpo del estómago. Esta actividad se demuestra tanto en el modelo de rata como en seres humanos, en resecciones gástricas tomadas de pacientes sometidos a cirugía de reducción gástrica.

50 Materiales y métodos

Animales y sustancias químicas

Se alojaron ratas Sprague-Dawley de 200-300 g en habitáculos con ciclos de luz y condiciones controladas de climatización y humedad, y se alimentaron con pienso normal con acceso libre al agua. Antes de los experimentos, se hizo ayunar a los animales durante 18-24 horas, mientras que se les permitía el acceso libre al agua, para reducir la secreción basal de ácido. Después de la anestesia con isoflurano, los animales se sacrificaron, se efectuó una incisión abdominal exponiendo el estómago. Después del aislamiento de las uniones del esófago y duodenal, se realizó una gastrectomía total, dejando 1-2 cm de esófago unidos a la gastrectomía. Incluimos la unión esofágica para tener una marca común para todos los aislamientos del fondo. Mientras se sujetaba el esófago con pinzas, se extrajeron aproximadamente 3 mm de esófago con 5mm del esófago intacto.

Aislamiento de glándulas fúndicas

65 El tejido del fondo extraído se colocó en solución de Ringer tamponada con HEPES (pH ajustado a 7,4 a 4 °C) enfriada en hielo, y se transfirió a la platina de un microscopio de disección. Las glándulas fúndicas se visualizaron al

microscopio a un aumento de 50 X. Las glándulas adyacentes a la unión esofágica se diseccionaron manualmente. Después del aislamiento, las glándulas individuales se adhirieron a cubreobjetos que se habían pretratado con el adhesivo biológico Cell-Tak (Cell-Tak™ cell adhesive, BD Biosciences; Bedford, MA).

5 Inmunohistoquímica/inmunofluorescencia

Se anestesiaron ratas macho Wistar (200-250 g) con pentobarbital i.p. y se perfundieron a través del ventrículo izquierdo con PBS seguido del fijador peryodato de lisina paraformaldehído (PLP) como se ha descrito previamente^{19a}. Los estómagos se extrajeron, se limpiaron sus residuos de alimento, y se fijaron toda la noche a 4 °C mediante inmersión en PLP. Los estómagos se lavaron tres veces con PBS y se cortaron secciones a un espesor de 5 µm después de crioprotección con 2,3 M en PBS durante al menos 12 h. La inmunotinción se llevó a cabo como se ha descrito previamente^{20a}. Las secciones se incubaron en SDS al 1 % durante 5 min, se lavaron 3 veces con PBS y se incubaron con PBS que contenía seroalbúmina bovina al 1 % durante 15 min antes del anticuerpo primario. Los anticuerpos primarios (anticuerpo monoclonal de ratón anti-ATPasa H⁺,K⁺ gástrica β humana, Affinity Bioreagents, CA, EE. UU.) se diluyeron a 1:50 y se aplicaron toda la noche a 4 °C. Las secciones se lavaron después dos veces durante 5 minutos con PBS con NaCl alto (PBS + NaCl al 2,7 %), una vez con PBS, y se incubaron con el anticuerpo secundario (Alexa 546 burro anti-conejo, Molecular Probes, Oregon) a una dilución de 1:1000 durante 1 hora a temperatura ambiente. Las secciones se lavaron dos veces con PBS con NaCl alto y una vez con PBS antes del montaje con VectaMount (Vector Laboratories, Burlingame, CA). Las muestras se visualizaron con un microscopio Nikon E-800.

Inmunomarcaje con oro

Las ratas se anestesiaron usando 5 ml de un pentobarbital sódico al 10 % dado por vía i.p. La fijación se hizo a través de una perfusión cardiaca del ventrículo izquierdo usando PBS y después PLP. El estómago se extrajo y se fijó en PLP durante 4 horas, y después se transfirió a tampón de almacenamiento toda la noche. Se efectuaron secciones congeladas y en Epon de la unión gastroesofágica y se tomaron cortes para el marcaje con oro y la microscopía electrónica.

30 Tinción con hematoxilina y eosina

Las ratas se anestesiaron usando 5 ml de un pentobarbital sódico al 10 % dado por vía i.p. La fijación se hizo a través una perfusión cardiaca del ventrículo izquierdo usando PBS para irrigar al animal y después fijador de Karnovsky durante 2 horas, y después en tampón de almacenamiento toda la noche. Se efectuaron secciones de la unión gastroesofágica y se tomaron cortes para la morfología de microscopía electrónica de la proteína ATPasa H⁺,K⁺ y la tinción con hematoxilina/eosina de las glándulas de la unión gastroesofágica.

Mediciones del pH intracelular (pH_i). Mediciones de glándulas fúndicas aisladas

40 Mediante el uso del mismo protocolo que desarrollamos para la perfusión de glándulas aisladas del cuerpo^{20a,21a}, las glándulas fúndicas individuales se cargaron con una concentración de 10 µM del colorante sensible a pH (BCECF, 27-bis(2-carboxietil)-5-(y 6)-carboxifluoresceína - éster acetometílico; Molecular Probes, OR EE.UU.) durante 15 minutos. Después del periodo de carga, la cámara de perfusión se montó en la platina de un microscopio invertido (Olympus 1X50) unido a un sistema digital de toma de imágenes (Universal Imaging Corp; Downingtown, PA), y se perfundieron con solución de Ringer tamponada con HEPES durante 5 minutos a 37 °C para eliminar cualquier colorante no esterificado. Las mediciones se realizaron en el modo de epifluorescencia con los objetivos de 60 X/ .80 y 40 X/ .90. El BCECF se excitó con éxito a 440 ± 10 nm y a 490 ± 10 nm, la señal fluorescente intracelular resultante se verificó a 535 nm usando una cámara con dispositivo de carga intensiva acoplada. Los puntos de datos se adquirieron cada 15 s. Las proporciones de intensidad 490/440 resultantes se convirtieron a valores de pH intracelular (pH_i) mediante el uso de la técnica de calibración con nigericina/alto K^{22as,22as}. La extrusión de ácido se verificó en ausencia de bicarbonato. El índice de alcalinización intracelular se midió después del uso de la técnica de prepulso con NH₄Cl^{22a,23a}, lo que dio como resultado una acidificación intracelular reproducible y sostenida. Los índices de recuperación del pH intracelular (actividad ATPasa H⁺, K⁺) se midieron en soluciones de HEPES sin Na⁺ que contenían: 1) histamina 100 µM 2) pentagastrina 100 µM 3) acetilcolina 100 µM 4) histamina 100 µM y 55 omeprazol a concentraciones de 100 µM y 200 µM.

Los índices de recuperación del pH intracelular se calcularon a partir del mismo pH de partida inicial para eliminar la variación potencial en el poder tamponador intracelular individual de las células en condiciones experimentales diferentes. Todos los datos, incluyendo las imágenes individuales para todas las longitudes de onda, se registraron en el disco duro, lo que nos permitió volver a las imágenes individuales después del experimento para más análisis. Los índices de recuperación se expresan como el ΔpH_i/min, y se calcularon sobre el intervalo de pH de 6,5-6,9.

La activación de la secreción de ácido mediante histamina, acetilcolina o pentagastrina se indujo mediante preincubación de las glándulas durante 15 minutos antes del experimento combinado con la carga de BCECF (100 µM). Todos los datos se resumen como medias ± EE. La significación se determinó usando la prueba de ANOVA simple, con la p < 0,05 considerada como estadísticamente significativa. Todas las sustancias químicas se obtuvieron

de Sigma y Molecular Probes.

Resultados

Localización inmunohistoquímica de la ATPasa H⁺, K⁺

5 La inmunohistoquímica usando anticuerpos específicos dirigidos contra epítopos muy conservados dentro de las subunidades α o β de la ATPasa H⁺, K⁺ gástrica identificó tinción específica para ambas subunidades en las glándulas fúndicas (figura 7 A).

10 Microscopía electrónica

Después de la obtención de secciones en Epon de unión gastroesofágica de rata en ayunas, se realizó la microscopía electrónica sobre las glándulas gástricas que venían justo después de esta unión, y estas se llamaron F1 y se usaron en todos nuestros experimentos. Las figuras 7B, C muestran la localización de la etiqueta de oro de la ATPasa H⁺, K⁺ en la célula parietal de la glándula fúndica. Percibimos una mayor densidad de tinción sobre el polo apical de la célula en los canalículos secretores o vacuolares. Esto podría correlacionarse con la alta extrusión basal de protones de las regiones del fondo en comparación con el cuerpo, debido al hecho de que la proteína está siempre en la membrana en la glándula fúndica, mientras que en el cuerpo el receptor está dentro del canalículo secretor hasta la estimulación.

20 Tinción del receptor de H2

La tinción del receptor de H2 se hizo tanto en el fondo como en el cuerpo para examinar la presencia y densidad del receptor en ambas áreas del estómago. Encontramos una clara tinción basolateral en las glándulas del cuerpo y no pudimos detectar tinción en las glándulas fúndicas. Estos resultados se correlacionan con la falta de efecto de la histamina en la estimulación de la secreción de ácido en el fondo. Se vio claramente que el receptor H2 está ausente en las glándulas del fondo y presente en el cuerpo (datos no mostrados).

30 Secreción de ácido inducida por secretagogo

El pH intracelular se midió usando el colorante BCECF sensible a pH y se verificó continuamente usando un sistema de toma de imágenes de fluorescencia en tiempo real para identificar los cambios en el pH intracelular. Los índices de salida de protones se calcularon como $\Delta\text{pH}_i/\text{min}$ usando una técnica que se desarrolló en nuestro laboratorio para las glándulas del cuerpo^{21a-25a}. Medimos el cambio en el índice de salida en presencia y ausencia de secretagogos.

35 Efecto de la histamina sobre la ATPasa H⁺, K⁺ del fondo y del cuerpo

Incubamos glándulas individuales con histamina 100 μM durante 20 minutos. La histamina estuvo presente durante todo el protocolo de superfusión. En la glándula del cuerpo medimos una tasa de extrusión de protones estimulada por histamina de $0,056 \pm 0,008 \Delta\text{pH}_i/\text{min}$, mientras que la secreción de ácido basal sin ningún secretagogo fue de $0,011 \pm 0,002 \Delta\text{pH}_i/\text{min}$ (figuras 8C, D). En comparación con el cuerpo, el fondo mostró un alto índice de extrusión de protones, incluso por debajo de las condiciones basales, ($0,039 \pm 0,009 \Delta\text{pH}_i/\text{min}$). Éste es similar a la secreción de ácido inducida por histamina ($0,040 \pm 0,0079 \Delta\text{pH}_i/\text{min}$, figuras 8A, B). Estos datos muestran que no hay efecto de la histamina sobre las glándulas de la zona F1 en comparación con los controles.

45 Acetilcolina y secreción de ácido en el fondo

En la siguiente serie, investigamos las propiedades funcionales de las glándulas fúndicas de acuerdo con la estimulación neuronal por la vía de la ACh. Al contrario que con la histamina, hubo un cambio evidente en los índices de extrusión de protones después de la estimulación. Aunque los controles aún estaban bombeando hacia afuera protones de forma activa, las glándulas que se estimularon con acetilcolina 100 μM durante la carga de colorante y a lo largo de toda la perfusión. Determinamos que la acetilcolina causó un aumento del índice de alcalinización ($0,075 \pm 0,0015 \Delta\text{pH}_i/\text{min}$ frente a los controles $0,039 \pm 0,009 \Delta\text{pH}_i/\text{min}$), mostrando un efecto directo de la acetilcolina sobre la extrusión de ácido en el fondo (figura 9).

55 Efecto de la pentagastrina en la zona F1

Para determinar si la gastrina también podía activar la ATPasa H⁺, K⁺ del fondo, llevamos a cabo estudios usando pentagastrina, un péptido sintético que contiene los cinco aminoácidos terminales de la gastrina, el cual se sabe que causa una fuerte secreción de ácido en las glándulas del cuerpo. A una dosis de pentagastrina de 100 μM observamos índices de alcalinización que fueron de $0,062 \pm 0,007 \Delta\text{pH}_i/\text{min}$, lo que fue similar a la acetilcolina en cuanto al aumento del índice de extrusión de protones desde las células del fondo (figura 9).

65 Inhibidores de la secreción de ácido gástrico

En la siguiente serie de estudios intentamos determinar si las glándulas fúndicas tenían perfiles de inhibición de la

ATPasa H⁺,K⁺ similares a los observados en el cuerpo. Elegimos el inhibidor bien caracterizado de la ATPasa H⁺,K⁺ gástrica omeprazol y el BAC-P (bloqueante de ácido competitivo con potasio) AZD0865^{26,27}.

5 Efecto del omeprazol en la zona F1 y en el cuerpo

Como se muestra en la figura 10A, el omeprazol no inhibió la secreción de ácido usando la misma concentración que inhibía completamente la secreción de ácido inducida por secretagogo en el cuerpo (figura 10B). A una dosis aun mayor de la que inhibe normalmente la secreción de ácido en el cuerpo, el fondo continuó extruyendo protones. Las glándulas fúndicas se preincubaron con omeprazol 200 μM e histamina 100 μM y después se perfundieron con omeprazol e histamina a lo largo de todo el experimento. Los índices de alcalinización fueron 0,045 ± 0,002 ΔpH/min en comparación con los controles estimulados solo con histamina, con un índice de 0,042 ± 0,007ΔpH/min. Por el contrario, la secreción de ácido en las glándulas del cuerpo se suprimió mediante omeprazol 200 μmol (0,014 ± 0,002ΔpH/min) (figura 10B).

15 Efecto de AZD0865 en la zona F1 en comparación con el cuerpo

Como también se muestra en la figura 10 (C, D), El BCA-P AZD0865 inhibe de forma eficaz la secreción de ácido en el cuerpo a una concentración de 10 μM; sin embargo, a esa misma concentración, la zona F1 aún tiene una recuperación dependiente de potasio. En el fondo, el pH intracelular aumentó a un índice de 0,031 ± 0,006 ΔpH/min. En el cuerpo, a la misma concentración de 10 μM, el índice de recuperación fue de 0,021 ± 0,008 ΔpH/min.

Tabla 1

Composición de las soluciones usadas para las mediciones del pH intracelular en glándulas gástricas únicas de rata. Todas las concentraciones se dan en mM. NMDG es N-metil-D-glucosamina, todas las soluciones se ajustaron a un pH de 7,4 a 37 °C usando, bien NaOH o bien KOH. La NMDG se ajustó con HCl.

Tabla 1

	Solución 1: HEPES normal	Solución 2: HEPES sin Na ⁺	Solución 3: HEPES sin Na ⁺ + NH ₄ Cl	Solución 4: Calibración con alto K ⁺
NaCl	125	-	-	-
NMDG	-	125	125	125
NH ₄ Cl	-	-	20	-
KCl	3	3	3	105
MgSO ₄	1,2	1,2	1,2	1,2
CaCl ₂	1	1	1	1
Glucosa	5	5	5	-
HEPES	32,2	32,2	32,2	32,2
pH	7,4	7,4	7,4	7,0

30 Discusión

En este estudio hemos proporcionado pruebas de que la región del fondo del estómago contiene glándulas que son capaces de segregar ácido mediante la ATPasa H⁺,K⁺ gástrica. En nuestro estudio hemos caracterizado por primera vez las propiedades secretoras de ácido del fondo. Hemos proporcionado pruebas morfológicas, inmunohistoquímicas y funcionales de la actividad de la proteína ATPasa H⁺,K⁺ en el fondo. En nuestros estudios morfológicos primero tuvimos que delimitar dónde empezaba y acababa el fondo. Como se entiende que esta región empieza en la unión gastroesofágica, decidimos tomar glándulas de este punto de unión hasta el inicio de la curvatura mayor del fondo. Tomamos secciones de tejido de lo que llamamos la zona F1, que empezaba en la unión gastroesofágica y continuaba distalmente 2 mm. Encontramos que estas glándulas eran bastante diferentes en la forma y también en la densidad de células de tipo parietal. Para confirmar que las células parietales en la zona F1 contienen ATPasa H⁺,K⁺, teñimos las subunidades α y β (la figura 7 muestra la tinción de la subunidad α).

Durante nuestra investigación de la secreción de ácido inducida por secretagogo, fuimos capaces de demostrar que la histamina no es el estimulador más potente de la secreción de ácido en el fondo, como lo es en el cuerpo. De hecho, se vieron diferencias muy pequeñas en las glándulas que no se estimularon en comparación con las estimuladas con histamina (figuras 8 y 9). El resultado se confirmó por una falta de tinción para el receptor H2 en el fondo (datos no mostrados). La acetilcolina fue el más fuerte de los tres secretagogos en el fondo, lo que puede relacionarse con la estrecha proximidad del nervio vago a la región del fondo. Como esta sección del estómago se estira cuando el alimento está presente, hay estimulación vagal^{28a-30a} con secreción asociada de acetilcolina. Este hallazgo es especialmente importante cuando se consideran los problemas clínicos en los pacientes obesos que tienen enfermedad por reflujo gastroesofágico (ERGE). Esto puede correlacionarse con los beneficios que consiguen los pacientes con enfermedad por úlcera grave cuando se someten a una vagotomía después de que no hayan conseguido alivio de la atención médica^{31a-33a}.

Otro hallazgo interesante es la falta de inhibición por el omeprazol sobre la secreción de ácido en el fondo, aunque sean inmunorreactivos con anticuerpos para la ATPasa H^+,K^+ gástrica. Fuimos incapaces de inhibir la secreción de ácido basal o inducida por secretagogo (histamina) en el fondo con el inhibidor de la bomba de protones omeprazol (figura 10 A) a dosis que fueron el doble de las que eliminaron eficazmente toda la secreción de ácido en el cuerpo (figura 10 B). Estos hallazgos están en contraposición directa con nuestros datos (figura 8C, D)^{20a, 21a, 24a, 25a} y otros hallazgos en glándulas del cuerpo^{34a-38a}. Este hallazgo tiene una correlación clínica interesante en cuanto a que hay un número creciente de pacientes que padecen ERGE que no se tratan de forma eficaz con IBP^{39a}. Una explicación posible para la falta de sensibilidad al omeprazol podría ser que, dado que el omeprazol necesita activarse por el ácido, una falta de espacio similar al de los canalículos podría prevenir la concentración de ácido y prevenir potencialmente la activación del fármaco por el ácido. Como se muestra en las figuras 7B, C usando marcaje con etiqueta de oro, vemos que hay, en efecto, un espacio secretor, y que la bomba parece tapizar la superficie apical de este espacio. Con las teorías previas sobre la secreción de ácido vinieron los numerosos aforismos para las modalidades de tratamiento quirúrgicas y médicas que se centraron en el cuerpo. Es de interés que la incidencia reciente de síntomas similares a la ERGE en los pacientes con derivación gástrica a los que, después del procedimiento se deja solo con una pequeña parte del fondo, y con poco o nada de cuerpo funcional. En esos pacientes sintomáticos ha habido escaso o nulo éxito usando IBP clásicos^{40a}, lo que posiblemente puede explicarse ahora por nuestros resultados recientes. Nuestros resultados demuestran que la región del fondo del estómago es mucho más que un área de almacenamiento y, de hecho, puede segregar ácido en respuesta a la estimulación por secretagogo, además la ATPasa H^+,K^+ que se encuentra en este segmento parece insensible al omeprazol. Estos resultados pueden conducir a nuevas dianas importantes para los pacientes que son resistentes a IBP o tienen síntomas recurrentes de reflujo en presencia de terapia con IBP.

Resultados:

Las glándulas fúndicas mostraron una morfología distinta en comparación con las glándulas de cuerpo (elongadas y carentes de las típicas células parietales abultadas). Tanto la inmunofluorescencia (subunidades α y β de la ATPasa H^+,K^+) como el inmunomarcaje con oro (subunidad β) fueron positivas en la región del fondo. Los índices de extrusión de protones de las glándulas fúndicas se estimularon por gastrina y acetilcolina pero no fueron influidos por histamina. Finalmente, la secreción de ácido de las glándulas fúndicas estimuladas no pudo inhibirse mediante el inhibidor de la ATPasa H^+,K^+ omeprazol.

Conclusión:

La región del fondo del estómago segregó ácido mediante la ATPasa H^+,K^+ , y no fue sensible a los inhibidores de la bomba de protones. Nuestros resultados demuestran que la región del fondo del estómago es mucho más que un área de almacenamiento y, de hecho, puede segregar ácido en respuesta a la estimulación por secretagogo, excepto histamina.

La digestión del alimento por el estómago requiere una combinación compleja de acontecimientos hormonales y neuronales. Generalmente, se ha pensado que el cuerpo del estómago segrega ácido mediante las células parietales y el antro segrega bicarbonato para neutralizar el digerido mediante la elevación del pH del contenido del estómago^{1a-9a}. Durante este proceso, los movimientos peristálticos del estómago dan como resultado contracciones que empujan el alimento hacia arriba dentro de la sección del fondo del estómago donde transita antes de salir dentro del intestino delgado^{10a}. En este modelo de digestión, el fondo actúa solo como una zona de almacén y no está implicado en la secreción de ácido^{4a,11a}. La secreción gástrica de ácido clásica en el cuerpo se produce cuando la ATPasa H^+,K^+ es estimulada por secretagogos y comienza a segregar protones dentro del canalículo secretor después de haber sido transportada hacia la membrana apical desde sus tubulovesículas citoplásmicas^{12a}. La célula parietal tiene al menos tres receptores activadores sobre su membrana basolateral, es decir, H2 de histamina, M3 de acetilcolina, y CCK-B de gastrina. Está ampliamente aceptado que el receptor H2 se acopla con los G a la adenilato ciclasa activada produciendo cAMP y la consiguiente activación de la proteína cinasa dependiente de cAMP. La acetilcolina y el receptor de la gastrina se acoplan a través de un sistema no G, probablemente Gq, para activar a la fosfolipasa C, produciendo IP3 y diacilglicerol. La acetilcolina libera Ca^{2+} intracelular y proteína cinasa C activadora de gastrina^{13a}. Después de esta cascada de eventos intracelulares, la célula parietal extruye protones a través de la bomba ATPasa H^+,K^+ que intercambia iones H^+ intracelulares por iones K^+ extracelulares en una proporción electroneural^{14a}.

Observaciones recientes en pacientes que se han sometido a cirugía de derivación gástrica presentan un paradigma interesante, a saber, que se les ha dejado solo con una región del fondo pequeña después de la operación y aún tienen secreción de ácido, lo que en algunos pacientes conduce a síntomas de reflujo, úlceras y pérdidas de contenido entérico^{15a}. Es de destacar que muchos de estos pacientes tienen escaso éxito en la reducción de los síntomas, mientras están con terapia con inhibidor de la bomba de protones (IBP)^{16a-18a}. A partir de estas observaciones clínicas iniciales, planteamos la pregunta: ¿juega el fondo un papel en la producción de ácido, y cómo son de similares sus propiedades con las proteínas secretoras del cuerpo? También estuvimos interesados en la determinación de la sensibilidad del fondo a los secretagogos clásicos y, por tanto, llevamos a cabo estudios usando histamina, pentagastrina, y acetilcolina.

En el presente experimento hemos investigado las propiedades secretoras de ácido del fondo de rata en estados de reposo y estimulados por secretagogo, además, hemos esclarecido la respuesta del fondo a un fármaco inhibidor de la secreción de ácido. Nuestros datos demuestran que la región del fondo es una zona secretora activa del estómago y contiene una ATPasa H⁺,K⁺ gástrica que puede estimularse por secretagogos pero parece ser insensible al omeprazol. La terapia con cinc de acuerdo con la presente invención es un medio para regular la liberación de ácido en la región del fondo.

Referencias:

10 Primer grupo

1. Hersey SJ, Sachs G. Gastric acid secretion. *Physiol Rev* 1995;75:155-189.
- 15 2. Sachs G, Prinz C, Loo D, Bamberg K, Besancon M, Shin JM. Gastric acid secretion: activation and inhibition. *Yale J Biol Med* 1994;67:81-95.
3. Sachs G. Physiology of the parietal cell and therapeutic implications. *Pharmacotherapy* 2003;23:68S-73S.
- 20 4. Horie S, Yano S, Watanabe K. Effects of drugs acting on Cl(-)-. *Eur J Pharmacol* 1992;229:15-19.
5. Helander HF, Keeling DJ. Cell biology of gastric acid secretion. *Baillieres Clin Gastroenterol* 1993;7:1-21.
6. Soumarmon A, Lewin MJ. Gastric (H⁺,K⁺)-ATPase. *Biochimie* 1986;68:1287-1291.
- 25 7. Wolfe MM, Welage LS, Sachs G. Proton pump inhibitors and gastric acid secretion. *Am J Gastroenterol* 2001;96:3467-3468.
8. Aihara T, Nakamura E, Amagase K, Tomita K, Fujishita T, Furutani K, Okabe S. Pharmacological control of gastric acid secretion for the treatment of acid-related peptic disease: past, present, and future. *Pharmacol Ther* 2003;98:109-127.
- 30 9. Gardner JD, Sloan S, Miner PB, Robinson M. Meal-stimulated gastric acid secretion and integrated gastric acidity in gastro-oesophageal reflux disease. *Aliment Pharmacol Ther* 2003;17:945-953.
- 35 10. Williams JL. Gastroesophageal reflux disease: clinical manifestations. *Gastroenterol Nurs* 2003;26:195-200.
11. Lehmann F, Hildebrand P, Beglinger C. New molecular targets for treatment of peptic ulcer disease. *Drugs* 2003;63:1785-1797.
- 40 12. Brzozowski T, Konturek PC, Konturek SJ, Drozdowicz D, Kwiecien S, Pajdo R, Bielanski W, Hahn EG. Role of gastric acid secretion in progression of acute gastric erosions induced by ischemia-reperfusion into gastric ulcers. *Eur J Pharmacol* 2000;398:147-158.
- 45 13. Franzin G, Manfrini C, Musola R, Rodella S, Fratton A. Chronic erosions of the stomach--a clinical, endoscopic and histological evaluation. *Endoscopy* 1984;16:1-5.
14. Raugstad TS, Svanes K, Ulven A, Molster A. Interaction between acute gastric ulcer and epinephrine-induced mucosal erosions in the rat: the significance of gastric acid secretion. *Digestion* 1979;19:70-72.
- 50 15. Houghton J, Stoicov C, Nomura S, Rogers AB, Carlson J, Li H, Cai X, Fox JG, Goldenring JR, Wang TC. Gastric cancer originating from bone marrow-derived cells. *Science* 2004;306:1568-1571.
16. Bell NJ, Hunt RH. Progress with proton pump inhibition. *Yale J Biol Med* 1992;65:649-657.
- 55 17. Garnett WR. Lansoprazole: a proton pump inhibitor. *Ann Pharmacother* 1996;30:1425-1436.
18. Robinson M. Drugs, bugs, and esophageal pH profiles. *Yale J Biol Med* 1999;72:169-172.
- 60 19. Tutuian R, Katz PO, Castell DO. Nocturnal acid breakthrough: pH, drugs and bugs. *Eur J Gastroenterol Hepatol* 2004;16:441-443.
20. Adachi K, Komazawa Y, Fujishiro H, Mihara T, Ono M, Yuki M, Kawamura A, Karim Rumi MA, Amano Y, Kinoshita Y. Nocturnal gastric acid breakthrough during the administration of rabeprazole and ranitidine in *Helicobacter pylori*-negative subjects: effects of different regimens. *J Gastroenterol* 2003;38:830-835.
- 65 21. Kleinman L, McIntosh E, Ryan M, Schmier J, Crawley J, Locke GR, III, De LG. Willingness to pay for

complete symptom relief of gastroesophageal reflux disease. *Arch Intern Med* 2002;162:1361-1366.

22. Carlsson R, Galmiche JP, Dent J, Lundell L, Frison L. Prognostic factors influencing relapse of oesophagitis during maintenance therapy with antisecretory drugs: a meta-analysis of long-term omeprazole trials. *Aliment Pharmacol Ther* 1997;11:473-482.
- 5 23. Katz PO, Hatlebakk JG, Castell DO. Gastric acidity and acid breakthrough with twice-daily omeprazole or lansoprazole. *Aliment Pharmacol Ther* 2000;14:709-714.
- 10 24. Tytgat GN. Shortcomings of the first-generation proton pump inhibitors. *Eur J Gastroenterol Hepatol* 2001;13 Suppl 1:S29-S33.
- 15 25. Gedda K, Scott D, Besancon M, Lorentzon P, Sachs G. Turnover of the gastric H⁺,K⁽⁺⁾-adenosine triphosphatase alpha subunit and its effect on inhibition of rat gastric acid secretion. *Gastroenterology* 1995;109:1134-1141.
- 20 26. Diamond I, Hurley LS. Histopathology of zinc-deficient fetal rats. *J Nutr* 1970;100:325-329.
27. Elmes ME, Jones JG. Ultrastructural studies on Paneth cell apoptosis in zinc deficient rats. *Cell Tissue Res* 1980;208:57-63.
28. Fong LY, Lee JS, Chan WC, Newbeme PM. Zinc deficiency and the development of esophageal and forestomach tumors in Sprague-Dawley rats fed precursors of N-nitroso-N-benzylmethylamine. *J Natl Cancer Inst* 1984;72:419-425.
- 25 29. Ng WL, Fong LY, Ma L, Newberne PM. Dietary zinc deficiency and tumorigenesis: a scanning electron microscope study. *J Electron Microsc (Tokio)* 1984;33:344-348.
- 30 30. Sunderman FW, Jr. The influence of zinc on apoptosis. *Ann Clin Lab Sci* 1995;25:134-142.
31. Cho CH, Fong LY, Ma PC, Ogle CW. Zinc deficiency: its role in gastric secretion and stress-induced gastric ulceration in rats. *Pharmacol Biochem Behav* 1987;26:293-297.
- 35 32. Cho CH, Fong LY, Wong SH, Ogle CW. Zinc deficiency worsens ethanol-induced gastric ulcers in rats. *Drug Nutr Interact* 1988;5:289-295.
33. Frommer DJ. The healing of gastric ulcers by zinc sulphate. *Med J Aust* 1975;2:793-796.
34. Watanabe T, Arakawa T, Fukuda T, Higuchi K, Kobayashi K. Zinc deficiency delays gastric ulcer healing in rats. *Dig Dis Sci* 1995;40:1340-1344.
- 40 35. Naess K. [Zinc in the treatment of stomach ulcer]. *Tidsskr Nor Laegeforen* 1976;96:1334.
36. Kirchhoff P, Wagner CA, Gaetzschmann F, Radebold K, Geibel JP. Demonstration of a functional apical sodium hydrogen exchanger in isolated rat gastric glands. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2003;285:G1242-G1248.
- 45 37. McDaniel N, Lytle C. Parietal cells express high levels of Na-K-2Cl cotransporter on migrating into the gastric gland neck. *Am J Physiol* 1999;276:G1273-G1278.
- 50 38. Geibel JP, Wagner CA, Caroppo R, Qureshi I, Gloeckner J, Manuelidis L, Kirchhoff P, Radebold K. The stomach divalent ion-sensing receptor *scar* is a modulator of gastric acid secretion. *J Biol Chem* 2001;276:39549-39552.
- 55 39. Dufner MM, Kirchhoff P, Remy C, Hafner P, Muller MK, Cheng SX, Tang LQ, Hebert SC, Geibel JP, Wagner CA. The Calcium-Sensing Receptor (CaSR) acts as a modulator of gastric acid secretion in freshly isolated human gastric glands. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2005.
- 60 40. Schultheis PJ, Clarke LL, Meneton P, Harline M, Boivin GP, Stemmermann G, Duffy JJ, Doetschman T, Miller ML, Shull GE. Targeted disruption of the murine Na⁺/H⁺ exchanger isoform 2 gene causes reduced viability of gastric parietal cells and loss of net acid secretion. *J Clin Invest* 1998;101:1243-1253.
41. Kirchhoff P, Andersson K, Socrates T, Sidani SM, Kosiek O, Geibel JP. Characteristics of the K⁺-competitive H⁺,K⁺-ATPase inhibitor AZD0865 in isolated rat gastric glands. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2006.
- 65 42. Andersson K, Carlsson E. Potassium-competitive acid blockade: a new therapeutic strategy in acid-related

diseases. *Pharmacol Ther* 2005;108:294-307.

43. Dammann HG, Burkhardt F. Pantoprazole versus omeprazole: influence on meal-stimulated gastric acid secretion. *Eur J Gastroenterol Hepatol* 1999;11:1277-1282.

5 Referencias del segundo grupo

1a. Sachs G. The parietal cell as a therapeutic target. *Scand J Gastroenterol Suppl* 1986;118:1-10.

10 2a. Lorentzon P, Scott D, Hersey S, Wallmark B, Rabon E, Sachs G. The gastric H⁺,K⁺-ATPase. *Prog Clin Biol Res* 1988;273:247-254.

3a. Wallmark B, Lorentzon P, Sachs G. The gastric H⁺,K(+)-ATPase. *J Intern Med Suppl* 1990;732:3-8.

15 4a. Prinz C, Kajimura M, Scott D, Helander H, Shin J, Besancon M, Bamberg K, Hersey S, Sachs G. Acid secretion and the H,K ATPase of stomach. *Yale J Biol Med* 1992;65:577-596.

5a. Scott DR, Helander HF, Hersey SJ, Sachs G. The site of acid secretion in the mammalian parietal cell. *Biochim Biophys Acta* 1993;1146:73-80.

20 6a. Sachs G, Prinz C, Loo D, Bamberg K, Besancon M, Shin JM. Gastric acid secretion: activation and inhibition. *Yale J Biol Med* 1994;67:81-95.

7a. Hersey SJ, Sachs G. Gastric-Acid Secretion. *Physiological Reviews* 1995;75:155-189.

25 8a. Hirschowitz BI, Keeling D, Lewin M, Okabe S, Parsons M, Sewing K, Wallmark B, Sachs G. Pharmacological Aspects of Acid-Secretion. *Digestive Diseases and Sciences* 1995;40:S3-S23.

9a. Wolfe MM, Welage LS, Sachs G. Proton pump inhibitors and gastric acid secretion. *Am J Gastroenterol* 2001;96:3467-3468.

30 10a. Hersey SJ, Sachs G. Gastric-Acid Secretion. *Physiological Reviews* 1995;75:155-189.

11a. Hersey SJ, Sachs G. Gastric-Acid Secretion. *Physiological Reviews* 1995;75:155-189.

35 12a. Forte JG, Ly B, Rong Q, Ogihara S, Ramilo M, Agnew B, Yao X. State of actin in gastric parietal cells. *Am J Physiol* 1998;274:C97-104.

13a. Urushidani T, Forte JG. Signal transduction and activation of acid secretion in the parietal cell. *J Membr Biol* 1997;159:99-111.

40 14a. Geibel JP. Role of potassium in acid secretion. *World J Gastroenterol* 2005;11:5259-5265.

15a. Blachar A, Federle MP. Gastrointestinal complications of laparoscopic roux-en-Y gastric bypass surgery in patients who are morbidly obese: findings on radiography and CT. *AJR Am J Roentgenol* 2002;179:1437-1442.

45 16a. Peghini PL, Katz PO, Castell DO. Ranitidine controls nocturnal gastric acid breakthrough on omeprazole: a controlled study in normal subjects. *Gastroenterology* 1998;115:1335-1339.

50 17a. Peghini PL, Katz PO, Bracy NA, Castell DO. Nocturnal recovery of gastric acid secretion with twice-daily dosing of proton pump inhibitors. *Am J Gastroenterol* 1998;93:763-767.

18a. Sanders SW, Moore JG, Day GM, Tolman KG. Circadian differences in pharmacological blockade of meal-stimulated gastric acid secretion. *Aliment Pharmacol Ther* 1992;6:187-193.

55 19a. Knauf F, Yang CL, Thomson RB, Mentone SA, Giebisch G, Aronson PS. Identification of a chloride-formate exchanger expressed on the brush border membrane of renal proximal tubule cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2001;98:9425-9430.

60 20a. Dufner MM, Kirchhoff P, Remy C, Hafner P, Muller MK, Cheng SX, Tang LQ, Hebert SC, Geibel JP, Wagner CA. The calcium-sensing receptor acts as a modulator of gastric acid secretion in freshly isolated human gastric glands. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2005;289:G1084-G1090.

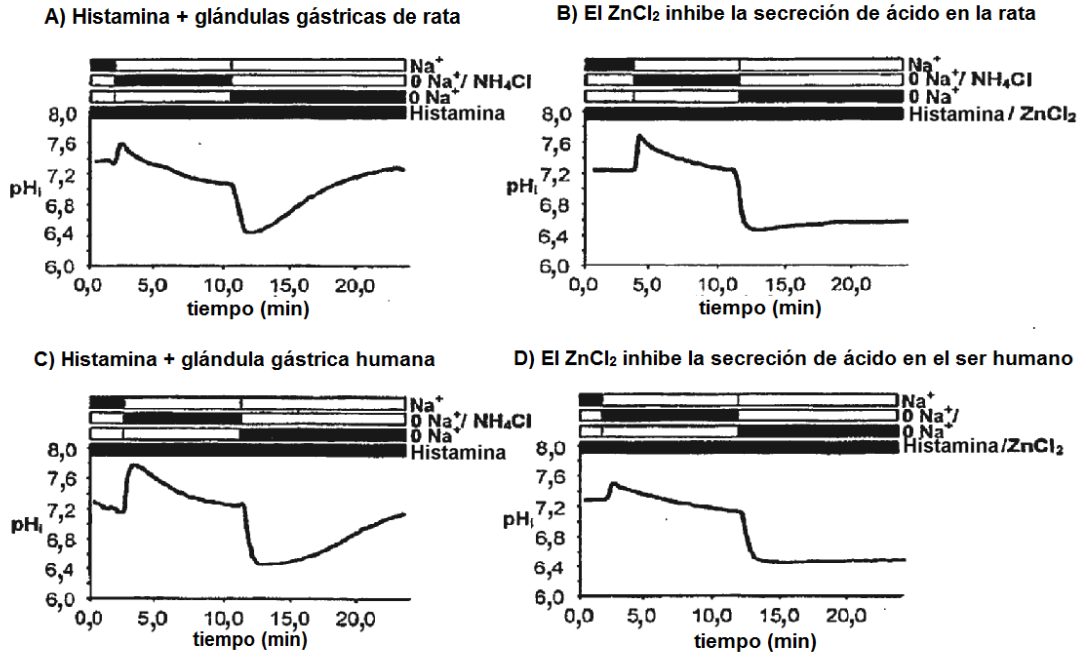
65 21a. Kirchhoff P, Dave MH, Remy C, Kosiek O, Busque SM, Dufner M, Geibel JP, Verrey F, Wagner CA. An amino acid transporter involved in gastric acid secretion. *Pflugers Arch* 2006;451:738-748.

- 22a. Waisbren SJ, Geibel J, Boron WF, Modlin IM. Luminal perfusion of isolated gastric glands. *Am J Physiol* 1994;266:C1013-C1027.
- 5 23a. Waisbren SJ, Geibel JP, Modlin IM, Boron WF. Unusual permeability properties of gastric gland cells. *Nature* 1994;368:332-335.
- 10 24a. Busque SM, Kerstetter JE, Geibel JP, Insogna K. L-type amino acids stimulate gastric acid secretion by activation of the calcium-sensing receptor in parietal cells. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2005;289:G664-G669.
- 15 25a. Geibel JP, Wagner CA, Caroppo R, Qureshi I, Gloeckner J, Manuelidis L, Kirchoff P, Radebold K. The stomach divalent ion-sensing receptor scar is a modulator of gastric acid secretion. *J Biol Chem* 2001;276:39549-39552.
- 20 26a. Sachs G, Scott D, Reuben M. Omeprazole and the gastric mucosa. *Digestion* 1990;47 Suppl 1:35-38.
- 25 27a. Sachs G, Wallmark B. The gastric H⁺,K⁺-ATPase: the site of action of omeprazole. *Scand J Gastroenterol Suppl* 1989;166:3-11.
- 30 28a. Alino SF, Garcia D, Uvnas-Moberg K. On the interaction between intragastric pH and electrical vagal stimulation in causing gastric acid secretion and intraluminal release of gastrin and somatostatin in anesthetized rats. *Acta Physiol Scand* 1983;117:491-495.
- 35 29a. Meulemans AL, Eelen JG, Schuurkes JA. NO mediates gastric relaxation after brief vagal stimulation in anesthetized dogs. *Am J Physiol* 1995;269:G255-G261.
- 40 30a. Singh J. Prostaglandin release from rat stomach following vagal stimulation or administration of acetylcholine. *Eur J Pharmacol* 1980;65:39-48.
- 45 31a. Aarimaa M, Soderstrom KO, Kalimo H, Inberg M, Nevalainen T. Morphology and function of the parietal cells after proximal selective vagotomy in duodenal ulcer patients. *Scand J Gastroenterol* 1984;19:787-797.
- 50 32a. Amdrup E. The surgical treatment of duodenal ulcer. *Schweiz Med Wochenschr* 1979;109:583-585.
- 55 33a. Waisbren SJ, Modlin IM. The evolution of therapeutic vagotomy. *Surg Gynecol Obstet* 1990;170:261-272.
- 34a. Abelo A, Eriksson UG, Karlsson MO, Larsson H, Gabrielsson J. A turnover model of irreversible inhibition of gastric acid secretion by omeprazole in the dog. *J Pharmacol Exp Ther* 2000;295:662-669.
- 35a. Andersen JB, Andrade DV, Wang T. Effects of inhibition gastric acid secretion on arterial acid-base status during digestion in the toad *Bufo marinus*. *Comp Biochem Physiol A Mol Integr Physiol* 2003;135:425-433.
- 36a. Gedda K, Scott D, Besancon M, Lorentzon P, Sachs G. Turnover of the gastric H⁺,K⁽⁺⁾-adenosine triphosphatase alpha subunit and its effect on inhibition of rat gastric acid secretion. *Gastroenterology* 1995;109:1134-1141.
- 37a. Sachs G, Shin JM, Pratha V, Hogan D. Synthesis or rupture: duration of acid inhibition by proton pump inhibitors. *Drugs Today (Barc)* 2003;39 Suppl A:11-14.
- 38a. Shamburek RD, Schubert ML. Pharmacology of gastric acid inhibition. *Baillieres Clin Gastroenterol* 1993;7:23-54.
- 39a. Locke GR, III. Current medical management of gastroesophageal reflux disease. *Thorac Surg Clin* 2005;15:369-375.
- 40a. Geibel JP. Secretion and absorption by colonic crypts. *Annu Rev Physiol* 2005;67:471-490.

REIVINDICACIONES

1. Una composición farmacéutica para la administración al estómago de un paciente que comprende una cantidad eficaz de al menos una sal de cinc farmacéuticamente aceptable en combinación con un inhibidor de la bomba de protones, opcionalmente en combinación con un vehículo, aditivo o excipiente farmacéuticamente aceptable para su uso para incrementar rápidamente el pH de los jugos gástricos en el estómago de un paciente con dicha necesidad hasta al menos 3,0 dentro de un periodo no superior a una hora después de su administración.
2. La composición para su uso de acuerdo con la reivindicación 1 en la que dicha cantidad de sal de cinc en dicha composición es eficaz para elevar el pH de los jugos gástricos en el estómago de dicho paciente hasta al menos 3,5 dentro de un periodo no superior a 30 minutos después de su administración.
3. La composición para su uso de acuerdo con las reivindicaciones 1 o 2 en la que dicha cantidad de sal de cinc es eficaz para elevar el pH de los jugos gástricos en el estómago de dicho paciente hasta al menos 4,0.
4. La composición para su uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1-3 en la que dicha cantidad de sal de cinc se selecciona del grupo que consiste en acetato de cinc, ascorbato de cinc, butirato de cinc, carbonato de cinc, citrato de cinc, cloruro de cinc, yoduro de cinc, sulfato de cinc, gluconato de cinc, glicerato de cinc, glicolato de cinc, formiato de cinc, lactato de cinc, picolinato de cinc, salicilato de cinc, tartrato de cinc, undecilenato de cinc, un quelato de aminoácido con cinc y mezclas de los mismos.
5. La composición para su uso de acuerdo con la reivindicación 4 en la que dicha sal de cinc se selecciona del grupo que consiste en acetato de cinc, ascorbato de cinc, citrato de cinc, cloruro de cinc, sulfato de cinc, gluconato de cinc, picolinato de cinc, un quelato de aminoácido con cinc y mezclas de los mismos.
6. La composición para su uso de acuerdo con la reivindicación 3 en la que dicha sal de cinc se selecciona de al menos dos sales de cinc del grupo que consiste en acetato de cinc, ascorbato de cinc, citrato de cinc, cloruro de cinc, gluconato de cinc, picolinato de cinc y un quelato de aminoácido con cinc.
7. La composición para su uso de acuerdo con las reivindicaciones 1-6 en la que dicha sal de cinc o al menos una de dichas sales de cinc es un quelato de aminoácido con cinc.
8. La composición para su uso de acuerdo con la reivindicación 7 en la que dicho quelato de aminoácido con cinc se selecciona del grupo que consiste en mono- y bis- quelatos de aminoácidos L o D.
9. La composición para su uso de acuerdo con las reivindicaciones 7 u 8 en la que dicho quelato de aminoácido es un quelato de cinc con un aminoácido seleccionado del grupo que consiste en L-cisteína, L-cistina, L-N-acetilcisteína, L-histidina, D-histidina L-aurina, L-glicinato, L-aspartato y L-metionina.
10. La composición para su uso de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1-3 en la que dicha sal de cinc es cloruro de cinc y opcionalmente, al menos una sal adicional de cinc seleccionada del grupo que consiste en acetato de cinc, ascorbato de cinc, citrato de cinc, gluconato de cinc, picolinato de cinc, sulfato de cinc y un quelato de aminoácido con cinc.
11. La composición para su uso de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1-10 en la que dicho inhibidor de la bomba de protones es esomeprazol, lansoprazol, omeprazol, pantoprazol, rabeprazol o mezclas de los mismos.
12. La composición para su uso de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1-11 en la que dicho inhibidor de la bomba de protones es una mezcla de esomeprazol, lansoprazol, omeprazol, pantoprazol o rabeprazol.
13. La composición para su uso de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1-11 en la que dicho inhibidor de la bomba de protones está formulado en forma de liberación sostenida.
14. La composición para su uso de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1-13 que comprende al menos dos sales de cinc, estando al menos una de dichas sales de cinc formulada en forma de liberación inmediata y estando al menos una de dichas sales de cinc formulada en forma de liberación sostenida.
15. La composición para su uso de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en la que la composición es una composición líquida.
16. La composición para su uso de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en la que la composición es adecuada para la administración oral.

Figuras 1A-E



E) Gráfico de barras de resumen

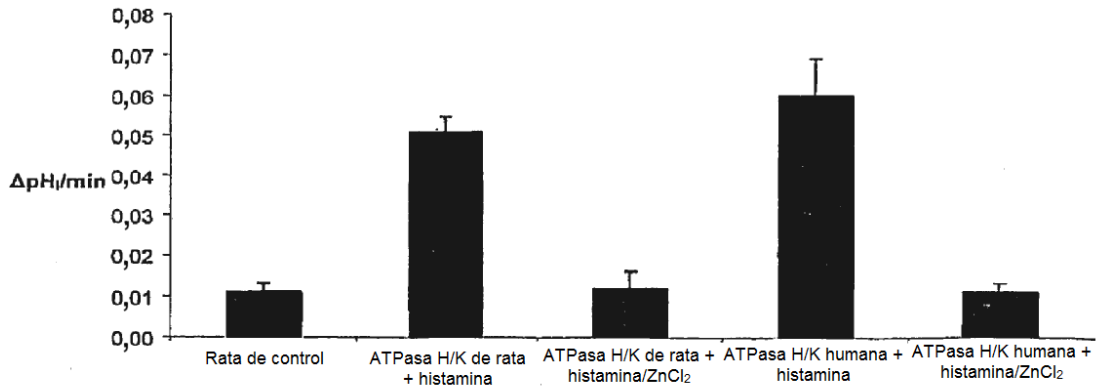


Figura 2

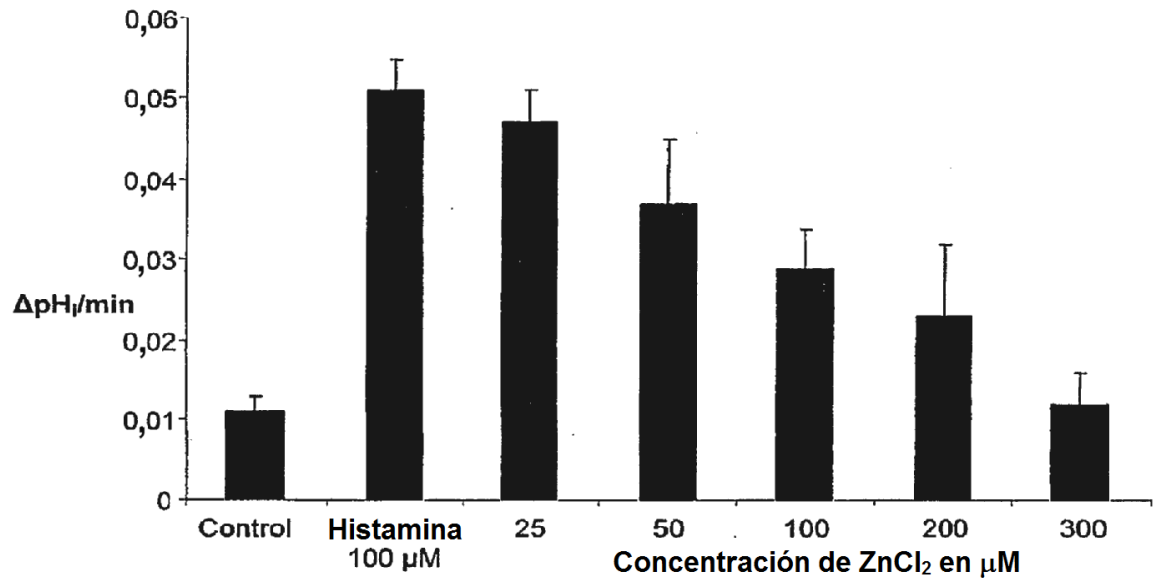


Figura 3

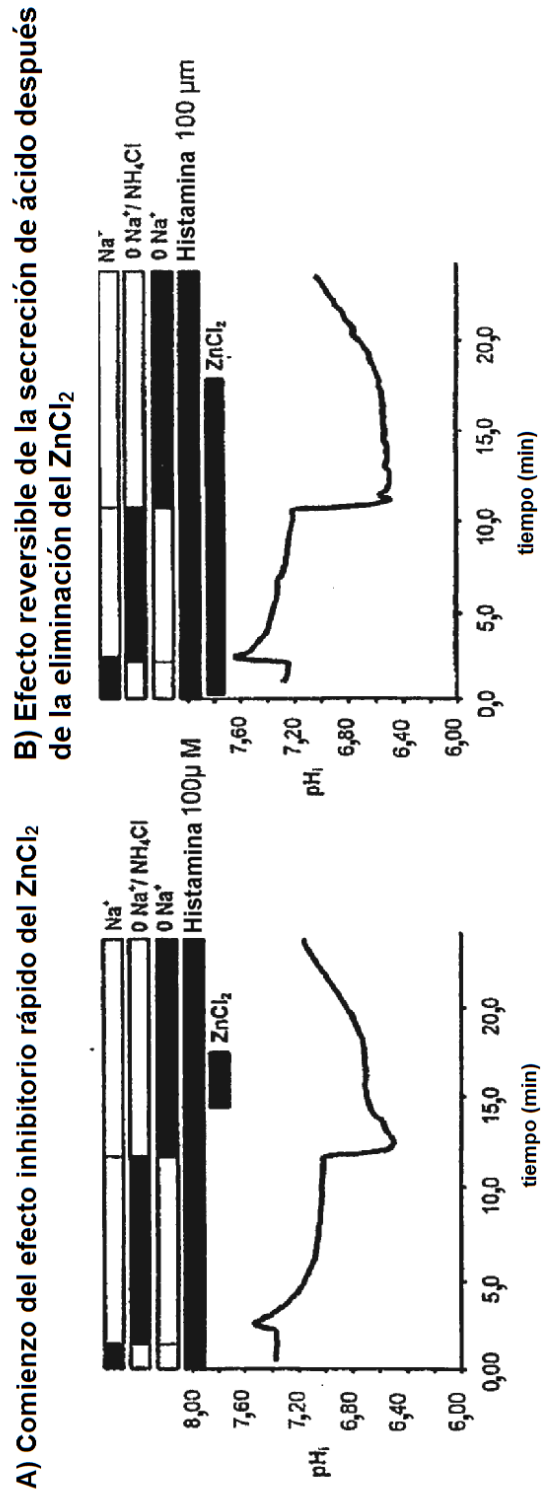


Figura 4

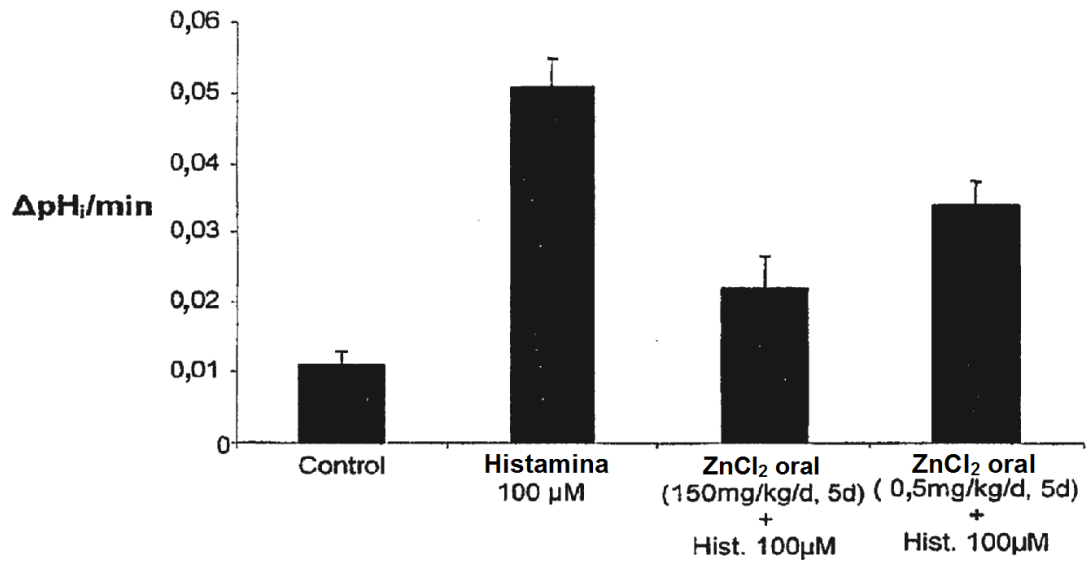


Figura 5

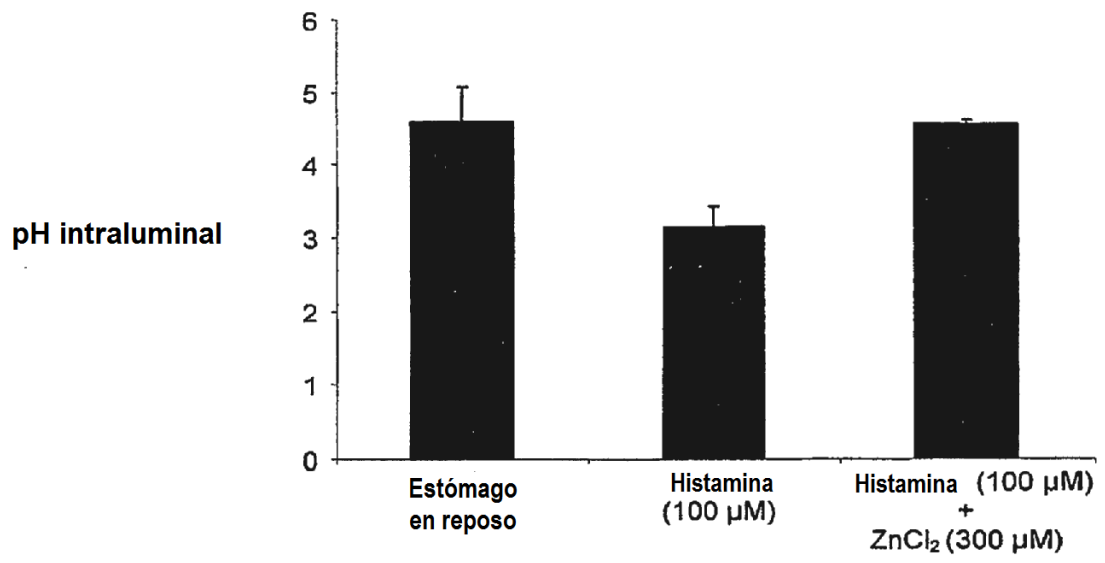
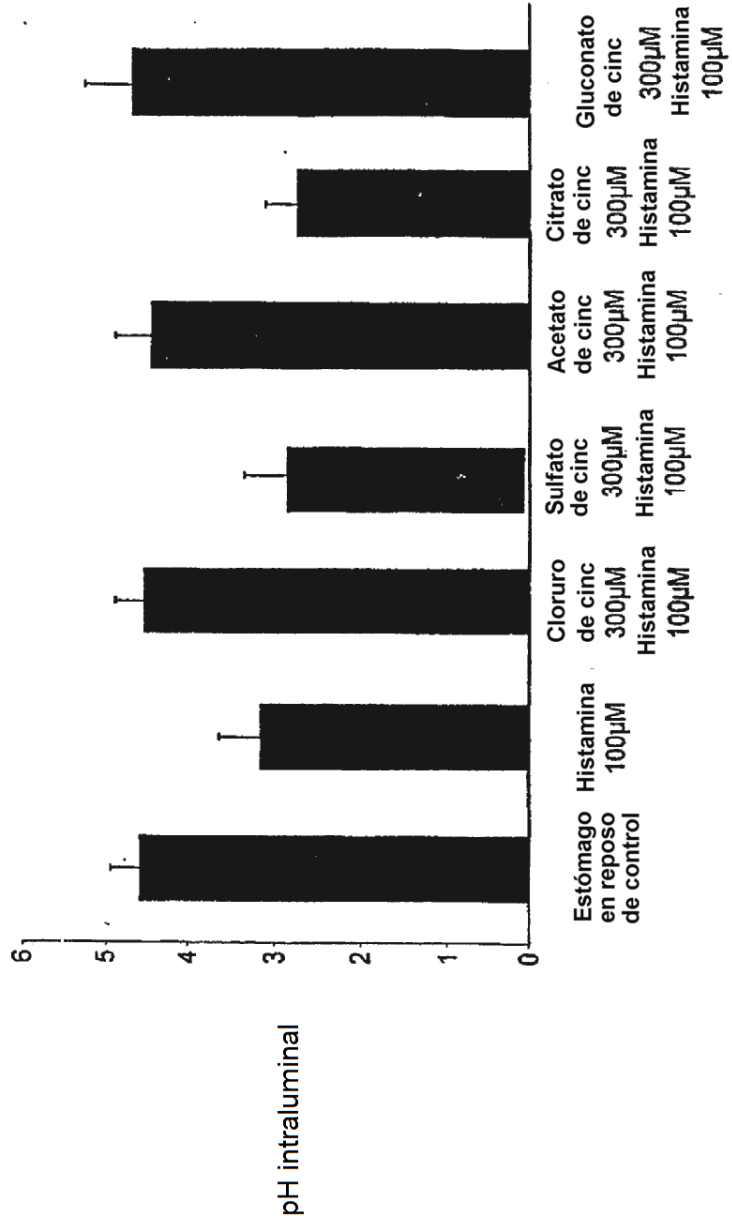
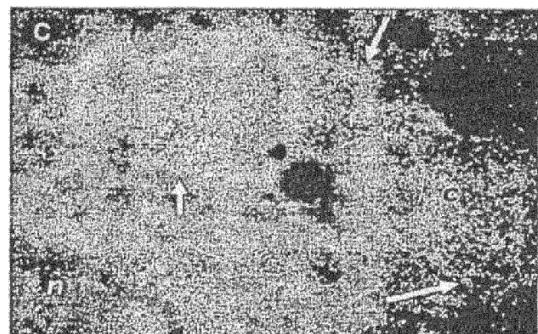
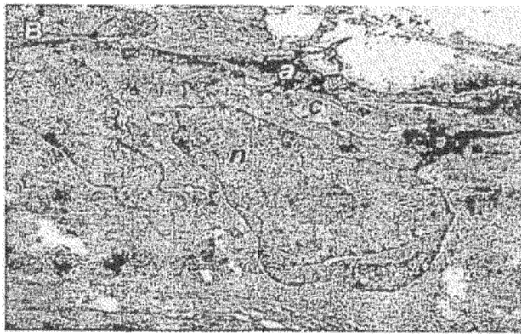
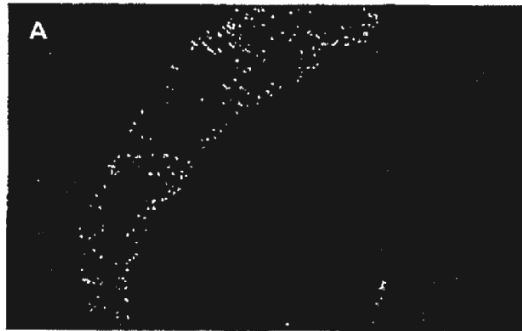


Figura 6



Figuras 7A-C



Figuras 8A-D

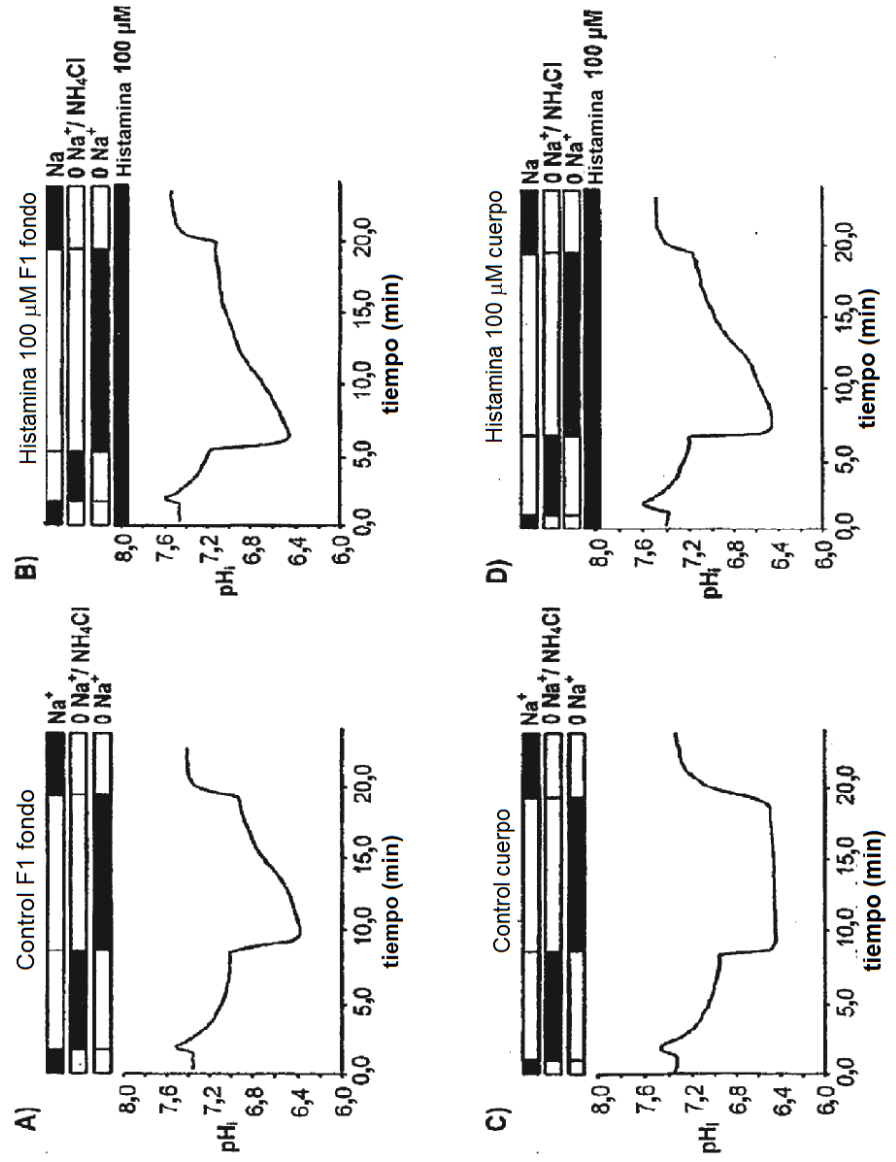
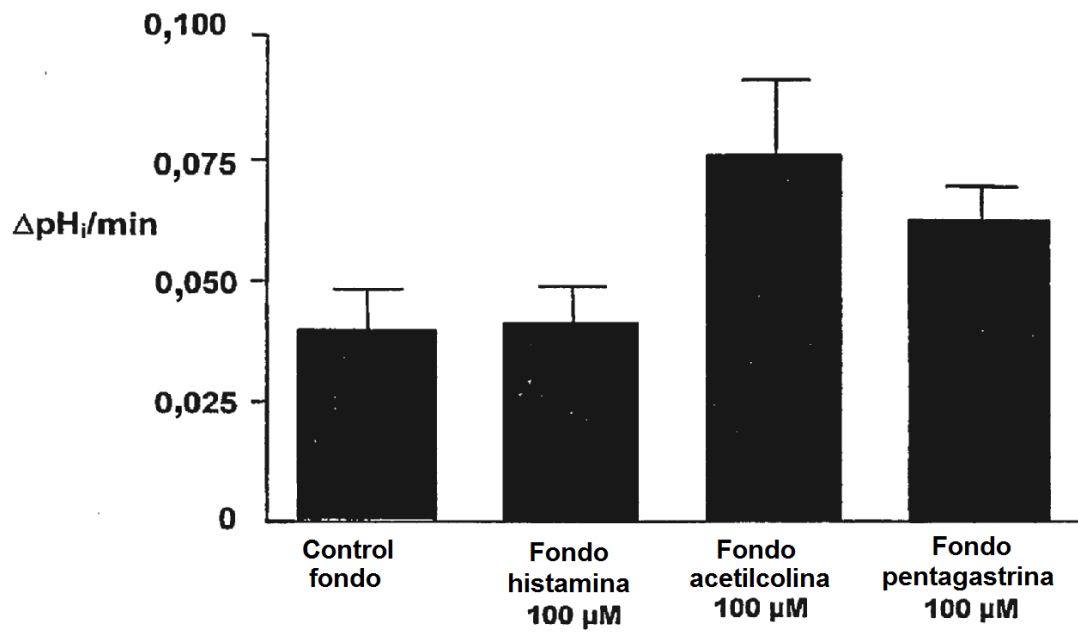


Figura 9



Figuras 10A-D

