(19) OFICINA ESPAÑOLA DE PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

(11) Número de publicación: **2 609 976**

(51) Int. Cl.:

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

(12) TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA T3

(96) Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **25.01.2007** **E 13193624 (7)**

(97) Fecha y número de publicación de la concesión europea: **05.10.2016** **EP 2705845**

(54) Título: **Combinación de sal de cinc y agente anti-H. pylori como 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:
25.04.2017

(73) Titular/es:

YALE UNIVERSITY (100.0%)
Two Whitney Avenue
New Haven, CT 06511, US

(72) Inventor/es:

GEIBEL, JOHN P. y
KIRCHHOFF, PHILIPP

(74) Agente/Representante:

VEIGA SERRANO, Mikel

ES 2 609 976 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

Combinación de sal de cinc y agente anti-*H. pylori* como inhibidor de acción rápida de la secreción de ácido gástrico

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 uno o más de un antibiótico/antimicrobiano anti-*H. pylori*, para proporcionar una acción rápida con un efecto opcional de larga duración para reducir la secreción de ácido gástrico, incluyendo la secreción de ácido en el fundus (mediante la inhibición de la ATPasa vacuolar de H^+) y en la región superior del cuerpo del estómago (mediante la inhibición de la ATPasa de H^+/K^+), que eleva, de este modo, el pH del estómago durante la fase de reposo, así como disminuye la duración de la liberación de ácido por el estómago durante una fase secretagoga, y para el tratamiento de patologías, incluyendo enfermedad por reflujo gastroesofágico (ERGE), enfermedad por reflujo no erosiva (ERNE), síndrome de Zollinger-Ellison (enfermedad de ZE), enfermedad de úlcera, y cáncer gástrico, así como la prevención o la reducción de la probabilidad de padecer enfermedad de úlcera. Además, la presente composición resulta útil para el tratamiento de pacientes que no responden a los inhibidores de la bomba de protones (IBP), y como alternativa a las terapias tradicionales o patologías que son causadas por una inhibición rápida y completa de la secreción de ácido inducida por secretagogos.

Solicitudes relacionadas

La presente solicitud reivindica el beneficio de prioridad de las solicitudes provisionales de Estados Unidos n.º 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.

Estado de la técnica

La generación de ácido clorhídrico concentrado 0,16N por la célula parietal de mamíferos implica una compleja combinación de circuitos de retroalimentación reguladora neuronal y hormonal[1-3]. Tras la activación de la célula, existe un complejo de transferencia celular de iones que permite la formación de ácido[4-7]. Una alteración en cualquiera de estos componentes (receptores de secreción, o transportadores de iones) puede dar lugar o bien a un cese de la secreción de ácido, o bien a la hipersecreción de ácido. Con este último, más de 30 millones de pacientes al año padecen síntomas de enfermedades relacionadas con el ácido, incrementando su número año tras año[8-11]. Clínicamente, la liberación no controlada o la hipersecreción continuada de ácido puede producir cambios tanto en el epitelio gástrico como en el intestinal pero, en casos más graves, puede provocar erosiones del esófago que pueden propiciar metaplasia y muerte[12-14]. Igualmente han aparecido evidencias recientes de que los periodos recurrentes prolongados de estados de hipersecreción pueden causar la formación de carcinoide gástrico[15].

En los últimos años, en un intento por diseñar terapias para prevenir la secreción hiperácida, se han empleado varios enfoques, siendo dos los más exitosos: a) inhibición del receptor de histamina en la membrana basolateral de la célula parietal, b) fármacos específicos para la bomba de protones orientados selectivamente contra la ATPasa de H, K (los llamados inhibidores de la bomba de protones; IBP)[16-18]. Estas dos terapias han mejorado, en gran medida, la calidad de vida de los pacientes que padecen esta enfermedad, no obstante, existe un número cada vez mayor de pacientes que han experimentado enfermedad recurrente sin dejar de tomar los fármacos[19, 20]. Pese a su alto grado de eficacia y uso clínico en todo el mundo, se ha informado sobre el fracaso en el tratamiento de las enfermedades relacionadas con el ácido, y el grado y la tasa de inicio del alivio de los síntomas son importantes para los pacientes[21]. Se ha estimado que aproximadamente el 30 % de los pacientes con ERGE permanecen sintomáticos con la dosis convencional de IBP[22]. Además, los IBPs tienen una semivida plasmática breve, que a menudo conduce a una recaída de la acidez nocturna[23]. Las dosis terapéuticas orales de los IBP alcanzan el estado estacionario y alcanzan así sus niveles máximos eficaces después de 4-5 días con los regímenes de dosificación típicos[24]. Este inicio lento y acumulativo del efecto de los IBP se refiere a su capacidad para inhibir solo aquellas bombas que están activas cuando el fármaco IBP se encuentra disponible. Tras la administración de IBP, se produce la reaparición de la secreción de ácido que se debe, en parte, a la síntesis *de novo* de la enzima[25].

El cinc es una parte fundamental 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 provoca los acontecimientos de apoptosis y muerte celular[26-30]. Estudios previos han investigado el papel potencial del cinc en la proliferación y en la generación de la barrera de protección, concretamente, la capa de gel mucoso de la superficie del estómago[31-34]. Estos estudios atribuyeron equivocadamente la reducción de la secreción de ácido a un aumento en el grosor de la capa de gel[33-35].

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 producen úlceras. Para evitar daños asociados con estas duras condiciones, el ácido gástrico ha de regularse precisamente por medio de la superposición de las vías neural (por ejemplo, acetilcolina), hormonal (por ejemplo, gastrina y grelina), y paracrina (por ejemplo, histamina y

somatostatina) y, más recientemente, a través del receptor sensor de calcio. Cualquier alteración a largo plazo en cualquiera de estas vías de regulación provoca la destrucción celular y tisular, y las manifestaciones clínicas, tales como enfermedades de úlcera péptica o enfermedad por reflujo gastroesofágico (ERGE). Se emplean habitualmente dos métodos para tratar la sobreproducción de ácido:

a) quirúrgicamente, por eliminación del elemento neuronal (vagotomía) o b) farmacológicamente, o bien a través de los antagonistas del receptor de histamina tipo 2, o bien los inhibidores de la bomba de protones (IBPs), o bien una combinación de ambos.

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

Aunque la optimización de los perfiles farmacológicos en la clase de IBPs puede proporcionar algún beneficio clínico, otras áreas de investigación pueden llegar a ser más fructíferas y, además, el ajuste del proceso de secreción de ácido aún no se comprende por completo y sigue siendo un objetivo importante de las terapias para modular la secreción de ácido gástrico.

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 investigación alguna de las acciones de cinc a nivel celular en relación con los efectos sobre la secreción de ácido.

Helicobacter pylorus reside en la capa mucosa de la mucosa gástrica humana. Como consecuencia de su pH extremadamente bajo, el estómago es un ambiente hostil para la mayoría de otros microorganismos. La capacidad de *H. pylori* para crecer en el estómago se ha atribuido a mecanismos de protección, tales como la producción de ureasa, que protege a la bacteria frente a la acidez gástrica mediante la creación de un microambiente básico, Véase, Taylor y Blaser, *Epidemiol Rev*, 13:42-59, (1991).

El estómago es un gran órgano que puede dividirse en 3 zonas principales que están implicadas en el proceso de digestión de alimentos y la esterilización de líquidos y agua. Al definir el proceso funcional del estómago, este se ha dividido habitualmente en dos zonas: parte del estómago superior, y parte del estómago inferior. Se cree que la parte superior del estómago está compuesta por el fundus y la parte del cuerpo superior, y muestra contracciones sostenidas de baja frecuencia, que son responsables de generar una presión basal en el estómago. Cabe destacar que estas contracciones tónicas también generan un gradiente de presión desde el estómago hasta el intestino delgado y son responsables del vaciado gástrico. Curiosamente, cuando se produce la deglución de alimentos y la consecuente distensión gástrica, esta actúa para inhibir la contracción de esta región del estómago, permitiéndole hincharse formando un gran depósito sin un aumento significativo de la presión. Se cree que la parte del estómago inferior participa en el molido y licuefacción de los productos alimenticios por la secreción de HCl desde las células parietales que se encuentran en esta sección del estómago.

El documento WO 98/16218A1 describe terapias para tratar síntomas gastrointestinales entre los que se encuentran las infecciones por *H. pylori*. Un tratamiento descrito en el documento WO 98/16218 implica administraciones de citrato de cinc o sulfato de cinc, de amoxicilina, y metronidazol administrados por separado. La combinación con citrato de cinc erradica *H. pylori* en el 75 % de los casos.

El documento WO 98/10779 A1 describe que los asociados de ácido hialurónico, es decir, hialuronatos de cinc y cobalto para acelerar la epitelización de las superficies corporales deficientes de epitelio que curan la úlcera crural y afirma que dichos asociados de ácido hialurónico son activos contra las bacterias de *H. pylori*.

El documento WO95/25513 A1 describe una composición farmacéutica y un método para el tratamiento de trastornos gástricos y *Helicobacter pylori* en el estómago o duodeno, que comprende un compuesto de cinc y una ciclodextrina o derivado de ciclodextrina, por ejemplo, seleccionado entre alfa-ciclodextrina, beta-ciclodextrina o gamma-ciclodextrina. La composición farmacéutica también puede incluir un compuesto ácido farmacéuticamente aceptable, tal como ácido carboxílico.

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 $ZnCl_2$. Se aislaron glándulas gástricas únicas humanas y de rata, se cargaron con el

colorante BCECF sensible a pH para medir el pH intracelular sobre las células parietales individuales y se calculó la tasa de recuperación del pH_i a partir de la pendiente después de una carga de ácido utilizando la técnica de prepulso con NH_4Cl. **(A, C)** Alcalinización intracelular estimulada por histamina (100 μM) en ausencia de Na^+ extracelular como función de la ATPasa de H^+/K^+ en las glándulas gástricas. **(B, D)** El eflujo de protones inducido por histamina de las glándulas gástricas puede bloquearse por medio de 300 umol de $ZnCl_2$. **(E)** El gráfico de barras resume los datos como EE de la media (control: n = 32 células, 3 glándulas, 3 animales; histamina: n = 120 células, 15 glándulas, 8 animales; histamina + $ZnCl_2$: n = 60 células, 6 glándulas, 4 animales).

La Figura 2 muestra que $ZnCl_2$ inhibe la secreción de ácido de manera dependiente de la dosis. Dependencia de la concentración de $ZnCl_2$ de la actividad de la ATPasa de H^+/K^+ (alcalinización intracelular expresada como ΔpH/min) en presencia de 100 μmol de histamina 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 $ZnCl_2$).

La Figura 3 muestra el rápido inicio del efecto inhibidor y la reversibilidad con $ZnCl_2$. **(A)** El trazado original muestra el rápido efecto inhibidor de $ZnCl_2$ sobre la secreción de ácido inducida por histamina. Se añadió histamina (100 μM) durante todo el experimento. Cuando se observó alcalinización intracelular (eflujo de protones), se añadió $ZnCl_2$ (300 μM) al baño de superfusión. La secreción de ácido se suprimió después de unos pocos segundos (parte central plana). Después de la eliminación de $ZnCl_2$ del baño de perfusión, el fármaco se lavó y el aumento del pH intracelular continuó. **(B)** El trazado original muestra la reversibilidad una vez incubadas y superfundidas las células durante más de 20 min con $ZnCl_2$ (300 μM) e histamina (100 μM). Después de la eliminación de $ZnCl_2$ del baño de superfusión, 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 añadieron 300 μmol de $ZnCl_2$ al agua para consumo. Los animales comieron y bebieron tanto como los animales de control. Antes del experimento, estos se mantuvieron en ayunas durante 12-18 horas. La secreción de ácido inducida por histamina se midió como se ha descrito previamente. Las células de los animales tratados con $ZnCl_2$ mostraron una tasa menor de eflujo de protones. 150 mg/kg/d: 0,022 ± 0,0045; (n = 60 células, 10 glándulas, 3 animales), 0,05 mg/kg/d: 0,034 ± 0,0036; (n = 60 células, 6 glándulas, 4 animales).

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

La Figura 6 muestra las mediciones del pH intraluminal de estómago entero utilizando una serie de sales de cinc de acuerdo con la presente invención. Las preparaciones de estómago entero aislado de ratas se canularon en la unión esofágica y duodenal y se perfundieron *in vitro* con solución de Ringer a 37 ºC, pH 7,4. A continuación, el perfusado sanguíneo se expuso a 100 μM de histamina para inducir la secreción de ácido. El lumen del estómago se infundió con 0,5 cc de solución salina isotónica no tamponada. En algunos estudios, se añadió una de las siguientes sales de cinc al perfusado de lumen a una concentración final de 300 μM (cloruro de cinc, sulfato de cinc, acetato de cinc, citrato de cinc). Los datos son la suma de 5 estómagos distintos de 5 animales distintos para cada una de las columnas. 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 el fundus del estómago de rata. **(A)** Inmunolocalización de la subunidad α de la ATPasa gástrica de H^+, K^+ en células parietales de las glándulas fúndicas de rata (40X). **(B)** Microscopía electrónica de la proteína ATPasa de H^+, K^+ marcada con oro en una célula parietal fúndica. En este caso, pueden apreciarse el núcleo, la membrana apical y estructuras similares a canalículos (8.000x). **(C)** Un aumento mayor (25.000X) de la misma célula. En este caso, la proteína ATPasa de H^+, K^+ marcada con oro puede apreciarse distribuida en los bordes de las estructuras similares a canalículos (flechas). (En esta figura: n = núcleo, c = estructuras similares a canalículos, ma = membrana apical).

Las Figuras 8A-D muestran el trazado original de la secreción de ácido basal y la secreción de ácido inducida por histamina en el fundus y corpus gástricos. Se aislaron glándulas gástricas únicas de rata, se cargaron con colorante BCECF sensible a pH para medir el pH intracelular de las células parietales individuales y la tasa de recuperación de pH_i se calculó a partir de la pendiente después de una carga de ácido utilizando la técnica de prepulso con NH_4CL. **(A)** Trazado original de una alcalinización de una glándula F1 (eflujo de protones) después de eliminar Na^+ del baño de perfusión. **(B)** Alcalinización intracelular de una glándula F1 estimulada por histamina (100 μM) en ausencia de Na^+ extracelular como función de la ATPasa de H^+, K^+. **(C)** Trazado de la alcalinización de una glándula del corpus en estado de reposo. **(D)** Alcalinización intracelular de una glándula del corpus estimulada por histamina (100 μM) en ausencia de Na^+ extracelular como función de la ATPasa de H^+, K^+.

La Figura 9 muestra una serie de secretagogos de glándulas F1. La glándula F1 en condiciones basales sin estimulación muestra tasas de alcalinización de 0,039 ± 0,009 Δ pH_i/min (n = 52 células/8 glándulas/5 animales).

En presencia de 100 μM de histamina, las tasas de recuperación fueron de 0,042 ± 0,007 Δ pH_i/min (n = 64 células/8 glándulas/6 animales). En presencia de 100 μm de acetilcolina, las glándulas F1 se alcalinizaron a una tasa de 0,075 ± 0,0015 Δ pH_i/min (n = 86 células/10 glándulas/6 animales). En presencia de 100 μM de pentagastrina, las glándulas F1 muestran tasas de alcalinización de 0,062 ± 0,007 Δ pH_i/min (n = 49 células/6 glándulas/5 animales).

Las Figuras 10A-D muestran el trazado original de la secreción de ácido comparando las glándulas F1 y las glándulas del corpus con omeprazol y AZD0865. Se aislaron glándulas gástricas únicas de rata, se cargaron con el colorante BCECF sensible a pH para medir el pH intracelular sobre las células parietales individuales y la tasa de recuperación de pHi se calculó a partir de la pendiente después de una carga de ácido utilizando la técnica de prepulso con NH_4CL, como se ha descrito previamente. **(A)** Trazado original de una medición de pH intracelular que demuestra una alcalinización de la glándula F 1 después de la estimulación por histamina (100 μM). Este trazado muestra que el omeprazol (200 μM) no inhibe la secreción de ácido en las glándulas F1. **(B)** Trazado de la glándula del corpus 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 corpus con una tasa de alcalinización intracelular de 0,014 ± 0,002 ΔpH_i/min. (C) Trazado intracelular de las mediciones de pH que demuestran que AZD0865 no inhibe completamente la extrusión de protones en el fundus del mismo modo que lo hace en el corpus. En las glándulas fúndicas que han sido expuestas a 10 μM de AZD0865, la recuperación intracelular es 0,031 ± 0,006 ΔpH_i/min. (**D)** En el corpus, AZD0865 muestra una fuerte inhibición de la recuperación dependiente de potasio con tasas de alcalinización intracelular de 0,021 ± 0,008 ΔpH_i/min.

Objeto de la invención

La presente invención se refiere a nuevas composiciones para la rápida inhibición de la secreción de ácido que tiene potencial escaso o nulo de efectos secundarios. En un primer aspecto, la presente invención se refiere a composiciones de cinc que comprenden al menos una sal de cinc farmacéuticamente compatible (preferentemente una sal soluble en agua) en una cantidad eficaz que produce una disminución rápida (es decir, en un periodo no superior a aproximadamente 5 minutos, no superior a aproximadamente 10 minutos, no superior a aproximadamente 20 minutos, no superior a aproximadamente 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 a un nivel del pH intragástrico de al menos aproximadamente 3,0-3,5, al menos aproximadamente 4,0, aproximadamente 4,0 a aproximadamente 5,0. Un paciente en necesidad de 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 rápido inicio de la elevación del pH en el estómago. Este método de la invención se basa en la administración (preferentemente por, 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 cual una porción sustancial se disuelve en los jugos gástricos a un pH bajo (generalmente inferior a aproximadamente 2,0) y preferentemente dentro de un intervalo de pH desde pH bajo (aproximadamente 1,0 a aproximadamente 2,0) a un pH superior (aproximadamente 5,5 a aproximadamente 7,5, o superior), de manera tal que las cantidades eficaces de sal de cinc pueden ser administradas 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, la inhibición de ácido gástrico se inhibe preferentemente en un periodo rápido de aproximadamente 20 minutos a aproximadamente 1 hora (en general, en un periodo que supere aproximadamente 5 minutos, en un periodo no superior a aproximadamente 10 minutos o en un periodo no superior a aproximadamente 20 minutos, en un periodo no superior a aproximadamente 30 minutos, en un periodo no superior a aproximadamente una hora).

La rápida disminución de la secreción de ácido en el estómago del paciente se produce en todo el estómago (tanto en la parte del estómago superior como en la parte del estómago inferior mediante la inhibición de la ATPasa de H^+/K^+), aunque se localizan efectos de los compuestos de acuerdo con la presente invención en la parte del estómago superior, concretamente en la región fúndica del estómago (por la inhibición de una segunda proteína ATPasa de H^+ distinguible) y/o la parte del cuerpo superior de la parte del estómago superior (por la inhibición de la ATPasa de H^+/K^+). Por consiguiente, 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 de H^+/K^+ (generalmente a lo largo del estómago, ATPasa de H^+ (principalmente en la región fúndica del estómago) y preferentemente en ambas. El hallazgo de que los presentes compuestos pueden utilizarse para inhibir la ATPasa de H^+ en la región fúndica tiene importantes ramificaciones clínicas por los siguientes motivos:

1) La erosión del esófago por la exposición al ácido tiene consecuencias mortales debido a hemorragias internas, ulceración, y/o formación de carcinoides gástricos por la exposición prolongada al ácido. De conformidad con la presente invención, como se ha demostrado ahora, las glándulas del fundus están en proximidad directa con la unión esofágica, que segregarán ácido y pueden inhibirse por los compuestos de acuerdo con la presente invención, haciendo, en consecuencia, que los presentes compuestos sean particularmente eficaces en el tratamiento de ERGE, ERNE, y patologías relacionadas.

2) Existe un número cada vez mayor de pacientes que se están volviendo insensibles a los IBP (inhibidores de la bomba de protones) y presentan síntomas recurrentes de la enfermedad por reflujo ácido. La proteína que se

identifica 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 tratados con IBPs durante largos periodos de tiempo parecen mostrar cierto "rebote" de la secreción de ácido. Este resultado podría volver a estar vinculado a la ATPasa fúndica de H^+, mostrando que es sensible a la histamina y a los niveles de protones en la célula.

En realizaciones preferentes del aspecto de la invención, resulta preferente una única sal de cinc que sea soluble en agua independientemente del pH (es decir, en un intervalo de pH de aproximadamente 1,0 a aproximadamente 7,5, o superior). El cloruro de cinc es la sal preferente para su uso en la presente invención. En realizaciones alterativas, se proporciona una mezcla de una sal de cinc soluble de pH bajo con una sal de cinc soluble de pH alto o una sal de cinc que puede ser absorbida con facilidad por el intestino delgado (tal como un compuesto de quelato aminoácido de cinc), opcionalmente en combinación con un tampón farmacéuticamente aceptable. Una cantidad eficaz de una sal de cinc se selecciona entre el grupo que consiste en cloruro de cinc ($ZnCl_2$), acetato de cinc, ascorbato de cinc, un quelato aminoácido de 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 aminoácido de cinc en combinación con un portador, aditivo o excipiente farmacéuticamente aceptable.

En varios aspectos, la presente invención se refiere al uso de al menos una sal de cinc soluble en agua en combinación con al menos un compuesto/composición (en el contexto de enfermedad o patología a tratar) seleccionado entre el grupo que consiste en un agente antibiótico/antimicrobiano (eficaz contra *H. pylori*), para proporcionar una acción rápida en la reducción de la secreción de ácido gástrico, reducir el pH del estómago, prevenir o reducir la probabilidad de enfermedad de úlcera, tratar la enfermedad de úlcera, tratar el cáncer gástrico, tratar una enfermedad o patología seleccionada entre el grupo que consiste en enfermedad por reflujo gastroesofágico (ERGE), enfermedad de reflujo no erosiva (ERNE), síndrome de Zollinger-Ellison (enfermedad de ZE), enfermedad de úlcera, y cáncer gástrico, así como prevenir o reducir la probabilidad de enfermedad de úlcera.

Las composiciones farmacéuticas comprenden una mezcla de sales de cinc que maximizan tanto las características de liberación inmediata como prolongada de la presente invención, opcionalmente en combinación con un portador, aditivo o excipiente farmacéuticamente aceptable y además opcionalmente una cantidad eficaz de un agente antibiótico/antimicrobiano contra *H. pylori*, Una cualquiera o más de estas composiciones pueden utilizarse en el contexto para tratar las diversas patologías/enfermedades divulgadas de otra forma en el presente documento.

Descripción detallada de la invención

Los siguientes términos se utilizan a lo largo de la memoria descriptiva para describir la presente invención.

El término "paciente" o "sujeto" se refiere a un animal, preferentemente un mamífero, aún más preferentemente un ser humano, en necesidad de tratamiento o terapia al que se le administran los compuestos de acuerdo con la presente invención con el fin de tratar una patología o enfermedad tratable utilizando compuestos de acuerdo con la presente invención. En función de la enfermedad o patología tratada, el término paciente se refiere al animal tratado para esa enfermedad en el contexto.

El término "eficaz" se utiliza para describir un tratamiento, compuesto, composición, componente o un aspecto relacionado con la presente invención, que, cuando se utiliza en el contexto, produce un resultado esperado que puede incluir el aumento del pH en el estómago, la reducción de los síntomas asociados con el exceso de liberación de ácido o el tratamiento favorable de una enfermedad o patología. El término eficaz subsume una cantidad o concentración de uno o más agentes activos como se describe en el presente documento y un periodo de tiempo que es consistente con la producción de un efecto esperado.

La expresión "sal de cinc farmacéuticamente aceptable" o "sal de cinc" utilizada 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 en cierta medida en la mucosa gástrica a un pH bajo de aproximadamente 2 o menos, a un pH mayor de aproximadamente 4,0 a 5,0, o superior del estómago 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. Sales de cinc farmacéuticamente compatibles a modo de ejemplo incluyen tanto sales de cinc inorgánicas como orgánicas, por ejemplo, acetato de cinc, ascorbato de cinc, butirato de cinc, carbonato de cinc (soluble en ácido diluido a 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 aminoácido de cinc (incluyendo, en función de la concentración, mono- y bisquelatos de L- o D-aminoácidos (preferentemente, el L-aminoácido presente de manera natural que puede absorberse con más facilidad en el aparato digestivo) cuyo complejo o quelato con cinc incluye preferentemente, L-cisteína, L-cistina, L-N-acetilcisteína, L-histidina (también D-histidina), L-taurina, L-glicinato, L-aspartato y L-metionina, entre otros. Obsérvese que para fines de la presente invención, los quelatos aminoácido de cinc se consideran sales de cinc. Preferentemente, la sal de cinc farmacéuticamente aceptable es soluble en agua.

Un experto reconocerá sales de cinc favorables para su uso en la presente invención. En aspectos de la invención, al menos una sal de cinc soluble en agua farmacéuticamente compatible se administra a un paciente con el fin de proporcionar una rápida inhibición de la liberación de ácido en el estómago, dando lugar a un aumento del pH del estómago superior a 4 (generalmente entre aproximadamente 4,0 y 5,0, en algunos casos, superior a 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. Cabe señalar que en ciertos aspectos preferentes de la invención, la sal de cinc o una combinación de sales elegida para ser administrada al paciente puede ajustarse para proporcionar una concentración de cinc en bolo inicial en el estómago a un pH bajo con el fin de producir la rápida inhibición de la liberación de ácido e incrementar el pH en el estómago a un nivel superior a aproximadamente 4. Además, una sal o una combinación de sal de cinc preferente inhibe la liberación de ácido en el estómago a diferentes niveles de acidez y pH es decir, a un nivel que es bastante ácido (pH, menos de aproximadamente 2,0) a un pH de aproximadamente 4,0 o superior.

La expresión "proporcionar una acción rápida de reducción de la secreción de ácido gástrico" se utiliza para describir el hecho de que el uso de la composición de acuerdo con la presente invención se traduce en un aumento del pH a un nivel de al menos aproximadamente 4,0, más preferentemente de manera aproximada 4,0 a aproximadamente 5,0 o ligeramente superior, en un periodo no superior a aproximadamente 30 minutos, preferentemente menor a aproximadamente 20-30 minutos, incluso más preferentemente inferior a aproximadamente 10-20 minutos, en aproximadamente 15 minutos o menos, o alternativamente, menor a aproximadamente 5 minutos.

El término "secretagogo" se refiere al periodo durante el cual las células parietales del estómago segregan ácido en los jugos gástricos para reducir el pH. El periodo secretagogo suele producirse justo después de una comida, pero la secreción de ácido puede producirse en otros momentos. La fase secretagoga puede ser de corta duración o de duración más larga.

La expresión enfermedad por reflujo gastroesofágico o "ERGE" o "reflujo ácido" es una patología en la cual el contenido líquido del estómago se regurgita (regresa o refluye) en el esófago. El líquido puede inflamar y dañar el revestimiento del esófago, aunque esto se produce en una minoría de pacientes. El líquido regurgitado contiene, por lo general, ácido y pepsina que son producidos por el estómago. El líquido regurgitado también puede contener bilis que ha regresado al estómago desde el duodeno. Se cree que el ácido es el componente más perjudicial del líquido refluido. La pepsina y la bilis también pueden dañar el esófago, pero su papel en la producción de inflamación y daño del esófago (esofagitis) no es tan evidente como lo es el papel del ácido.

ERGE es una patología crónica. Una vez que comienza, por lo general, es de por vida. Si existe un daño en el revestimiento del esófago (esofagitis), esto también es una patología crónica. Además, después de que el esófago se haya sanado con el tratamiento y el tratamiento se haya suspendido, el daño volverá en la mayoría de los pacientes en unos pocos meses. Por lo tanto, una vez que se inicie el tratamiento de ERGE, puede ser necesario continuar el tratamiento de forma continua, en general, durante breves periodos.

En realidad, el reflujo del contenido líquido del estómago en el esófago se produce en la mayoría de los individuos normales. De hecho, un estudio descubrió que el reflujo se produce con tanta frecuencia en individuos normales como en los pacientes con ERGE. Sin embargo, en pacientes con ERGE, el líquido refluido contiene con mayor frecuencia ácido y el ácido permanece en el esófago más tiempo.

La gravedad, la deglución, y la saliva son mecanismos de protección importantes para el esófago, pero solo son eficaces cuando los individuos están en posición vertical. De noche, mientras se duerme, la gravedad no tiene efecto, la deglución se detiene, y la secreción de saliva se reduce. Por lo tanto, es más probable que el reflujo que se produce por la noche origine que el ácido restante permanezca en el esófago durante más tiempo y cause un mayor daño al esófago.

Ciertas condiciones hacen que una persona sea susceptible a ERGE. Por ejemplo, el reflujo puede ser un problema grave durante el embarazo. Los niveles elevados de hormonas del embarazo causan probablemente reflujo mediante la reducción de la presión en el esfínter esofágico inferior (véase más adelante). Al mismo tiempo, el feto en desarrollo aumenta la presión en el abdomen. Se espera que estos dos efectos aumenten el reflujo. Asimismo, los pacientes con enfermedades que debilitan los músculos del esófago (véase más adelante), tales como esclerodermia o enfermedad del tejido conectivo mixto, son más propensos a desarrollar reflujo.

La causa de ERGE es compleja. Probablemente sean múltiples las causas, y las diferentes causas pueden ser operativas en diferentes individuos o incluso en el mismo individuo en distintos momentos. Un número de pacientes con ERGE producen cantidades anormalmente grandes de ácido, pero esto es poco común y no un factor contribuyente en la inmensa mayoría de los pacientes. Los factores que contribuyen a causar ERGE son el esfínter esofágico inferior, hernias hiatales, contracciones esofágicas, y vaciado del estómago. A pesar de la causa de ERGE, la presente invención puede reducir la tendencia de tener reflujo ácido perjudicial en el esófago, causando daños.

Cuando la onda de contracción en el esófago es deficiente, el ácido refluido no es devuelto al estómago. En

pacientes con ERGE, se han descrito varias anomalías de contracción. Por ejemplo, las ondas de contracción no pueden comenzar después de cada deglución o las ondas de contracción pueden morir antes de alcanzar el estómago. Asimismo, la presión generada por las contracciones puede ser demasiado débil como para devolver el ácido al estómago. Dichas anomalías de contracción, que reducen la depuración de ácido en el esófago, se encuentran con frecuencia en pacientes con ERGE. De hecho, se encuentran con frecuencia en los pacientes con ERGE más grave. Se espera que los efectos de las contracciones esofágicas anormales empeoren por la noche cuando la gravedad no ayuda a regresar el ácido refluido al estómago. Obsérvese que fumar también reduce sustancialmente la depuración de ácido del esófago. Este efecto se prolonga durante al menos 6 horas después del último cigarrillo.

La mayor parte de reflujo durante el día se produce después de las comidas. Este reflujo es consecuencia probablemente de relajaciones transitorias del EEI que son causadas por la distensión del estómago con alimentos. Se ha descubierto que una minoría de pacientes con ERGE, aproximadamente el 20 %, tienen estómagos que se vacían de forma anormalmente lenta después de una comida. El vaciado lento del estómago prolonga la distensión del estómago con los alimentos después de las comidas. Por lo tanto, el vaciado más lento prolonga el periodo de tiempo durante el cual es más probable que se produzca reflujo.

La expresión "enfermedad por reflujo no erosiva" o "ERNE" se utiliza para describir una forma específica de ERGE, descrita previamente. En algunos casos, ERGE erosiona el revestimiento del esófago, creando una patología llamada esofagitis. ERNE es ERGE que no causa esofagitis. Puesto que la mayoría de los enfermos que padecen ERGE no tienen esofagitis, ERNE es la forma más común de ERGE. Ya que su nombre contiene la expresión "no erosiva", puede parecer que ERNE es la forma menos grave de ERGE, aunque esto no es necesariamente así. En realidad, es más probable que ERNE produzca complicaciones extraesofágicas, y también es menos probable que responda a fundoplicatura. En un estudio, solo el 56 % de los pacientes con ERNE (en comparación con el 90 % de los pacientes con reflujo erosivo) describieron que sus síntomas se eliminan por completo con fundoplicatura. ERNE también tiene el doble de probabilidades de causar dificultades en la deglución.

El ardor de estómago es el síntoma principal de ERNE. Tiene una serie de causas potenciales, incluyendo hernia hiatal, conductas de estilo de vida, y dieta. Muchas personas lidian con el ardor de estómago simplemente adaptando su comportamiento. En algunos casos, puede requerirse medicación o cirugía. Los antiácidos tradicionales también se han utilizado para tratar ERNE.

La expresión "síndrome de Zollinger-Ellison" o "síndrome de ZE" se utiliza a lo largo de la memoria descriptiva para describir una patología causada por la producción anormal de la hormona gastrina. En el síndrome de ZE, un pequeño tumor (gastrinoma) en el páncreas o en el intestino delgado produce los altos niveles de gastrina en la sangre. El síndrome de ZE es causado por tumores que se encuentran por lo general en la cabeza del páncreas y en el intestino delgado superior. Estos tumores producen la hormona gastrina y se denominan gastrinomas. Los altos niveles de gastrina ocasionan la sobreproducción de ácido del estómago.
Altos niveles de ácido estomacal conducen a múltiples úlceras en el estómago y en el intestino delgado. Los pacientes con síndrome de ZE pueden experimentar dolor abdominal y diarrea. También se sospecha el diagnóstico en pacientes sin síntomas que tienen ulceración grave en el estómago y en el intestino delgado.

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

Se puede intentar realizar la extirpación quirúrgica de un gastrinoma único si no hay evidencia de que se haya extendido a otros órganos (como ganglios linfáticos o hígado). La cirugía del estómago (gastrectomía) para controlar la producción de ácido rara vez es necesaria hoy en día. El diagnóstico precoz y la extirpación quirúrgica del tumor se asocian con una tasa de curación de solo el 20 % al 25 %. No obstante, los gastrinomas crecen lentamente, y los pacientes pueden vivir muchos años después de descubrir el tumor. Los medicamentos supresores de ácido son muy eficaces para controlar los síntomas de la sobreproducción de ácido.

El término "úlcera" se utiliza a lo largo de la memoria descriptiva para describir un área de erosión tisular, por ejemplo, concretamente en el revestimiento del aparato digestivo (AD), en especial del estómago (úlcera péptica), esófago o intestino delgado (úlcera duodenal). Debido a la erosión, una úlcera es cóncava. Siempre se deprime por debajo del nivel de los tejidos circundantes. Se cree que las úlceras pueden tener diversas causas, pero en el aparato digestivo AD, se debe principalmente a la infección con la bacteria *H. pyloridus* (*H. pylori*). No obstante, las úlceras en el AD pueden agravarse por el estrés, el tabaquismo y otros factores no infecciosos, incluyendo especialmente el ácido del estómago excesivo, debido a que un pH más bajo tiende a ser un mejor entorno de crecimiento para *H. pyloridus*.

Los tratamientos tradicionales para las infecciones por *H. pyloridus* incluyen antimicrobianos/antibióticos, tales como amoxicilina, claritromicina (biaxin), metronidazol (flagyl) y tetraciclina ("un agente anti-*H. pylori*"); bloqueadores H_2, tales como cimetidina (tagamet), famotidina (pepcid), nizatidina (axid), 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 de combinación, tales como Helidac (una combinación de subsalicilato de bismuto, metronidazol, y tetraciclina), Prevpac (lansoprazol, claritromicina y amoxicilina).

La presente invención puede utilizarse para tratar una infección por *H. pyloridus* en un paciente mediante la administración de una cantidad eficaz de al menos una coadministración de sal de cinc soluble en agua farmacéuticamente aceptable con al menos un agente anti-*H. pylori*, como se ha descrito previamente.

La expresión "coadministración" o "terapia de combinación" se utiliza para describir una terapia en la que se utilizan al menos dos compuestos activos en cantidades eficaces para tratar una o más enfermedades o patologías, como se describe en el presente documento simultáneamente. Aunque el término coadministración incluye, preferentemente, la administración de dos compuestos activos al paciente simultáneamente, no es necesario que los compuestos se administren al paciente simultáneamente, a pesar de que las cantidades eficaces de los compuestos individuales estarán presentes en el paciente simultáneamente. Las composiciones activas incluyen una o más sales de cinc.

La expresión "inhibidor de la bomba de protones" se utiliza a lo largo de la memoria descriptiva para describir los inhibidores de la bomba de protones como fármacos que ayudan a controlar la incomodidad dolorosa del ardor de estómago y la enfermedad por reflujo gastroesofágico (ERGE), y favorecer la cicatrización de las úlceras estomacales y duodenales. Los inhibidores de la bomba de protones solo están disponibles con receta médica. Tienen forma de comprimidos, cápsulas, inyecciones, o polvos elaborados en una suspensión.

Los inhibidores de la bomba de protones actúan 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 de "enzima adenosín trifosfato hidrógeno-potasio". Los inhibidores de la bomba de protones son bastante versátiles. Se utilizan para cicatrizar las úlceras estomacales y duodenales, incluyendo las úlceras estomacales relacionadas por haber tomado fármacos antiinflamatorios no esteroideos. También se utilizan para aliviar los síntomas de esofagitis (inflamación del esófago o la garganta) y el reflujo gastroesofágico grave (ERGE), como se ha discutido previamente.

En combinación con ciertos antibióticos (tales como amoxicilina y claritromicina) o con sales de cinc de acuerdo con la presente invención, los inhibidores de la bomba de protones son eficaces para el tratamiento de las infecciones por *Helicobacter pylori* (una infección bacteriana del estómago). La bacteria *H. pylori* es el principal sospechoso en la causa de las recidivas de las úlceras estomacales. Los IBP son también un tratamiento de primera elección para la rara patología llamada síndrome de Zollinger-Ellison, discutida previamente.

Los inhibidores de la bomba de protones exhiben efectos secundarios, aunque tienden a ser manejables, incluyen diarrea, sensación de estar enfermo, estreñimiento, flatulencia, dolor abdominal, dolores de cabeza y, raramente, reacciones alérgicas, picazón, mareos, tobillos hinchados, dolor muscular y articular, visión borrosa, depresión y sequedad de boca, entre otros. El uso a largo plazo de los inhibidores de la bomba de protones puede dar lugar a infecciones estomacales. Debido a que los inhibidores de la bomba de protones detienen por completo la producción de ácido - y el ácido del estómago ayuda a matar microbios, tales como bacterias del estómago - el uso de IBPs puede producir el crecimiento de microbios potencialmente perjudiciales en el estómago.

Los inhibidores de la bomba de protones exhiben interacciones medicamentosas significativas, algunas veces nocivas, incluyendo reacciones con fenitoína como agente epiléptico y warfarina para prevenir coágulos de sangre, para aumentar sus efectos, con ketoconazol e itraconazol para reducir su capacidad de absorción, con diazepam (valium) para disminuir 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 reaparecer cuando una persona deja de tomar un inhibidor de la bomba de protones. Los inhibidores de la bomba de protones pueden causar hemorragias internas, si desarrolla signos como vómitos de sangre, detección de una sustancia similar a posos de café en el vómito, o defecación de heces de color negro como el alquitrán, consulte inmediatamente a su médico.

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

La presente descripción desvela 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, disminuir la duración de la liberación de ácido por el estómago durante una fase secretagoga, y para tratar las patologías que incluye enfermedad por reflujo gastroesofágico (ERGE), enfermedad por reflujo no erosiva (ERNE), síndrome de Zollinger-Ellison (enfermedad de ZE), enfermedad de úlcera, y cáncer gástrico, en el que la reducción de la secreción de ácido gástrico es beneficiosa, así como prevenir o reducir la probabilidad de enfermedad de úlcera mediante la reducción de la sección de ácido gástrico. Además, los métodos resultan útiles para el

tratamiento de pacientes que no responden a los inhibidores de la bomba de protones (IBP), y como alternativa a las terapias tradicionales o patologías que son causadas por una inhibición rápida y completa de la secreción de ácido inducida por secretagogos.

El método comprende administrar una cantidad eficaz de al menos una sal de cinc soluble en agua farmacéuticamente aceptable para aliviar o tratar la patología o enfermedad. Los métodos pueden implicar la administración de una sal de cinc soluble en agua en combinación con otros agentes desvelados en el presente documento en una sola vez, o preferentemente durante una larga duración, por lo general, de aproximadamente 2-3 días a aproximadamente 2-3 meses, con diferentes intervalos entre ambos, en función del pronóstico y el resultado del tratamiento.

Las sales de cinc de acuerdo con la presente invención pueden administrarse en combinación con agentes anti-*H. pylori*, tales como amoxicilina, claritromicina (biaxin), metronidazol (flagyl) o tetraciclina, agentes citoprotectores, tales como subsalicilato de bismuto o sucralfato, o un agente de combinación, tal como Helidac o Prevpac.

En un aspecto preferente de la invención, se utiliza 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 (por la mucosa gastrointestinal), tanto a un pH bajo (es decir, un pH de aproximadamente 1-2, que se produce en condiciones ácidas en el estómago) como a un pH más alto (es decir, un pH de aproximadamente 4-5 o ligeramente superior, después de inhibir la secreción de ácido en el estómago o incluso mayor, es decir, un pH de aproximadamente 5,5-6,0 en el duodeno hasta aproximadamente 6,5-7,5 en el yeyuno e íleon - el pH es ligeramente superior en el íleon que en el yeyuno). Al proporcionar composiciones que son a la vez solubles en agua y absorbibles por 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 maximizará al igual que la terapia favorable de las patologías o enfermedades a tratar. En este aspecto, resulta preferente una combinación de cantidades eficaces de cloruro de cinc y al menos una sal de cinc seleccionada entre el grupo que consiste en acetato de cinc, gluconato de cinc, ascorbato de cinc y un quelato aminoácido de cinc (como mono- o bis-quelato aminoácido), aunque pueden combinarse otros numerosos compuestos de ácido de cinc para producir resultados favorables.

Las sales de cinc preferentes incluyen aquellas sales en las que el contraión aniónico en forma protonada tiene un pKa de al menos aproximadamente 4 a aproximadamente 5,5 o superior. Resultan preferentes las mezclas de sales de cinc, en las que todas las sales de cinc son solubles en un intervalo de pH 1-2 a aproximadamente 7,5. El acetato de cinc, gluconato de cinc, glicolato de cinc y ascorbato de cinc solo o en combinación con otra sal de cinc, especialmente cloruro de cinc, son particularmente útiles para su uso en la presente invención. Los quelatos aminoácido de cinc (mono o bis-quelatos aminoácido) también pueden utilizarse preferentemente, en los que una combinación de cloruro de cinc y un quelato aminoácido de cinc se seleccionan entre el grupo que consiste en quelatos de cinc (mono- o bis-quelatos) de L-cisteína, L-cistina, L-N-acetilcisteína, L-histidina, D-histidina, L-taurina, L-glicinato, L-aspartato, L-metionina, y mezclas de los mismos.

Las sales de cinc preferentes de acuerdo con la invención incluyen cloruro de cinc (en el que pKa del contraión no es importante debido a su interacción con los canales de cloruro) y los ácidos orgánicos que incluyen acetato de cinc (pKa 4,75), gluconato de cinc y ascorbato de cinc (pKa de 4,2 y 11,6). Además, se pueden utilizar preferentemente glicolato de cinc y lactato de cinc también, siendo preferente glicolato de cinc. Resulta preferente que para cuando se utiliza una combinación de sales de cinc, al menos una sal de cinc que es eficaz a un pH bajo en el estómago (para la inhibición inmediata de la secreción de ácido) se combine con un agente que pueda exhibir un efecto intensificado en el estómago a un pH de 4,0-5,0 o superior, o que se absorba preferentemente en el intestino delgado (un mono- o bis-quelato aminoácido de cinc).

Sin desear quedar ligado a la teoría, se cree que una combinación de una sal de cinc que es eficaz a un bajo pH en el estómago (tal como cloruro de cinc y también sulfato de cinc) y una o más de las sales de cinc de ácido orgánico que son eficaces a un pH superior, maximizará la administración de cinc a la mucosa del estómago para obtener un efecto favorable, en un principio, por su disolución en los jugos gástricos ácidos en el estómago, en el que se produce una inhibición inicial de ácido y el pH se eleva, y posteriormente, por la absorción de cinc (a partir de una sal de cinc) a un pH superior en el estómago o en el intestino delgado, en el que los niveles sanguíneos de cinc aumentarán a niveles terapéuticos. La absorción y el efecto de una sal de cinc a niveles de pH más elevados en el estómago o a pH más alto del intestino delgado (5,5-7,5 o superior) es ventajosa porque esta absorción retardada de cinc reducirá la secreción de ácido gástrico con posterioridad (a un efecto inicial a un pH bajo) durante un periodo prolongado de tiempo. Las composiciones de acuerdo con la presente invención pueden administrarse en una sola vez, pero, por lo general, se administran preferentemente una o dos veces al día por vía oral durante un periodo que oscila de aproximadamente 2-3 días a varios meses o más.

Las composiciones de acuerdo con la presente invención también se refieren a formulaciones de liberación sostenida o prolongada que comprenden un primer componente que permite o facilita la disolución rápida en los jugos gástricos a un pH bajo de modo que se efectúa una inhibición rápida de la secreción de ácido (con un aumento concomitante en el pH a un nivel de aproximadamente 4,0 a aproximadamente 5,0 o superior) y un segundo componente que libera la sal de cinc a un nivel de pH más alto 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 con facilidad utilizando una sal de cinc que se disuelve en los jugos gástricos a un pH bajo (por ejemplo, cloruro de cinc o sulfato de cinc a un pH de aproximadamente 1,0 a aproximadamente 2,0) utilizando excipientes convencionales, tales como lactosa, azúcar de confitería en forma de polvo, diversas sales de estearato, etc., que se disuelven con rapidez en el estómago, y una segunda formulación de liberación sostenida o prolongada que emplea cualquier número de aglutinantes poliméricos, matrices (poliméricas y/o erosionables), gránulos, o recubrimientos entéricos para permitir la liberación de sal de cinc sobre la base de liberación prolongada o sostenida en el intestino delgado. Muchas de estas técnicas se conocen adecuadamente en la materia. Patentes a modo de ejemplo como la patente de Estados Unidos n.º 4.863.741 de Becker, la patente de Estados Unidos n.º 4.938.967 de Newton, *et al*., la patente de Estados Unidos n.º 4.940.556 de MacFarlane, *et al*., y la patente de Estados Unidos n.º 5.202.128 de Morella, *et al*., entre muchas otras, pueden ser útiles para proporcionar enseñanzas, todas bien conocidas en la materia, para la formulación de formulaciones de liberación rápida/sostenida o liberación prolongada útiles en la presente invención.

Las formulaciones anteriores pueden ser útiles para proporcionar una mejor biodisponibilidad de una o más sales de cinc y opcionalmente, otros agentes que pueden ser útiles en el tratamiento o la 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 de pH del estómago a aproximadamente 4,0 a aproximadamente 5,0 o más, como se desvela en la presente invención. Cabe destacar que en la inhibición de la secreción de ácido en el estómago, las concentraciones sanguíneas de sal de cinc de aproximadamente 100 micromolares (µmol) producen una inhibición de aproximadamente el 70 %. Con una concentración de 300 µmol de sal de cinc, la inhibición se acerca al 100 %. El tiempo de acción de la inhibición desde el lugar de administración sanguínea a 100 µmol o 300 µmol es inmediato (es decir, tan pronto como la sal de cinc se pone en contacto con la membrana celular, se produce la inhibición. Se puede demostrar que la inhibición se produce en aproximadamente 10-15 minutos a aproximadamente 1 hora en presencia de secretagogos. Las sales de cinc pueden administrarse por vía oral (preferentemente no más de una o dos veces al día) o por vía intravenosa, solo o en combinación, con fármacos IBP opcionales.

Resulta preferente el uso de cloruro de cinc en combinación con al menos una sal de cinc adicional, como se describe de otro modo en el presente documento. Las sales de cinc preferentes adicionales incluyen acetato de cinc, gluconato de cinc, ascorbato de cinc y quelatos aminoácido de cinc (mono- y bis-quelatos aminoácido). Estas sales de cinc y combinaciones pueden utilizarse en combinación con agentes adicionales, tales como un agente anti-*H. pylori* (amoxicilina, claritromicina, metronidazol o tetraciclina).

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 agente anti-*H. pylori*, tal amoxicilina, claritromicina (biaxin), metronidazol (flagyl) o tetraciclina, opcionalmente en combinación con un portador, aditivo o excipiente farmacéuticamente aceptable.

Las formulaciones farmacéuticas incluyen las adecuadas para administración por vía oral, rectal, nasal, tópica (incluyendo bucal y sublingual), vaginal o parenteral (incluyendo intramuscular, subcutánea e intravenosa). Resultan preferentes las composiciones orales o las composiciones parenterales (especialmente aquellas para la administración IV). Las composiciones de acuerdo con la presente invención también pueden presentarse como bolo, electuario o pasta. Los comprimidos y cápsulas para administración oral pueden contener excipientes convencionales, tales como agentes aglutinantes, materiales de relleno, lubricantes, disgregantes, o agentes humectantes. Los comprimidos pueden revestirse de acuerdo con métodos bien conocidos en la materia. Las preparaciones orales líquidas pueden encontrarse en forma de, por ejemplo, suspensiones acuosas u oleosas, soluciones, emulsiones, jarabes o elixires, o pueden presentarse como un producto seco para la constitución con agua u otro portador 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 ha discutido previamente en el presente documento, las presentes formulaciones pueden adaptarse para proporcionar características de liberación sostenida del principio activo o principios activos en la composición utilizando métodos convencionales bien conocidos en la materia. Una composición que proporciona una cantidad eficaz de la dosis inicial de sal de cinc en los jugos gástricos a un pH bajo, seguido de efectos de liberación prolongada de cinc durante periodos más prolongados, puede ser preferente.

En el aspecto farmacéutico de acuerdo con la presente invención, el compuesto o los compuestos de acuerdo con la presente invención se formulan preferentemente mezclados con un portador farmacéuticamente aceptable. En general, resulta preferente administrar la composición farmacéutica por vía oral, pero ciertas formulaciones se pueden administrar preferentemente por vía parenteral y, en particular, en forma de dosificación intravenosa o intramuscular, así como a través de otras vías parenterales, tales como transdérmica, bucal, subcutánea, supositoria u otras vías, incluso a través de la inhalación por vía intranasal. Las formas de dosificación orales se administran preferentemente en forma de comprimido o cápsula (preferentemente, gelatina dura o blanda) Las formulaciones intravenosas e intramusculares se administran preferentemente en solución salina estéril. Naturalmente, un experto

en la materia puede modificar las formulaciones dentro de las enseñanzas de la memoria descriptiva para proporcionar numerosas formulaciones para una vía de administración particular sin hacer que las composiciones de la presente invención sean inestables o comprometer su actividad terapéutica.

En particular, de forma preferente, los presentes compuestos son fácilmente solubles en agua y pueden utilizarse mezclas de cinc solubles en agua para efectuar un perfil farmacéutico de liberación inmediata/liberación sostenida. Esto puede maximizar el efecto inmediato y el efecto de mayor duración, simplemente eligiendo el tipo de sal y ajustando en consecuencia la relación de la mezcla de sal de cinc. Por supuesto, pueden elegirse excipientes para afectar a la administración y bioequivalencia de las sales de cinc utilizadas. Entra dentro de la habilidad del experto modificar la vía de administración y el régimen de dosificación de un compuesto particular con el fin de gestionar la farmacocinética de los presentes compuestos para conseguir el máximo efecto beneficioso para el paciente.

Las formulaciones que contienen los compuestos de la invención pueden adoptar la forma de polvo sólido, semisólido, liofilizado, o formas de dosificación líquida, 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 dosificación unitaria adecuadas para la administración única de dosificaciones precisas.

Las composiciones incluyen normalmente un portador o excipiente farmacéutico convencional y pueden incluir adicionalmente otros agentes medicinales, portadores, y similares. Preferentemente, la composición será un compuesto o compuestos de sal de cinc de aproximadamente 0,05 % a aproximadamente 75-80 % en peso de acuerdo con la invención, y el resto consiste en aditivos, portadores y/o excipientes farmacéuticos adecuados. Para 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 no tóxicas, tales como agentes humectantes, agentes emulsionantes, o tampones.

Las composiciones líquidas pueden prepararse disolviendo o dispersando los compuestos (aproximadamente 0,5 % a aproximadamente 20 %), y aditivos farmacéuticos opcionales, en un portador, tal como, por ejemplo, solución salina acuosa, dextrosa acuosa, glicerol, o etanol, para formar una solución o suspensión. Para el uso en la preparación oral líquida, la composición puede prepararse como una solución, suspensión, emulsión, o jarabe, siendo administrada, ya sea en forma líquida o en una forma seca adecuada para la hidratación en agua o solución salina normal.

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

Una composición inyectable para administración parenteral contendrá normalmente el compuesto en una solución IV adecuada, tal como una solución salina fisiológica estéril. La composición también puede formularse como una suspensión en un lípido o fosfolípido, en una suspensión liposomal, o en una emulsión acuosa.

Las composiciones farmacéuticas de la presente invención también pueden administrarse por aerosol nasal o inhalación. Dichas composiciones se preparan de acuerdo con técnicas bien conocidas en la materia de la formulación farmacéutica y pueden prepararse como soluciones en solución salina, empleando alcohol bencílico u otros conservantes adecuados, promotores de la absorción para potenciar la biodisponibilidad, fluorocarbonos, y/u otros agentes solubilizantes o dispersantes convencionales.

Los métodos para preparar dichas formas de dosificación se conocen o resultarán evidentes para los expertos en la materia; véase, por ejemplo, "*Remington's Pharmaceutical Sciences*" (17ª Ed., Mack Pub. Co, 1985). El experto aprovechará los parámetros farmacocinéticos favorables de las formas de profármaco de la presente invención, cuando proceda, en la administración de los presentes compuestos a un paciente que padece una infección viral para maximizar el efecto previsto del compuesto.

Las composiciones farmacéuticas de acuerdo con la invención contienen otros principios activos, tales como inhibidores de la bomba de protones, bloqueadores H_2, agentes antimicrobianos, agentes citoprotectores o agentes de combinación. Además, los compuestos de acuerdo con la presente invención también pueden contener agentes anti-cáncer (para tratar el cáncer gástrico). Las cantidades o concentraciones eficaces de cada uno de los compuestos activos eficaces han de incluirse dentro de las composiciones farmacéuticas de acuerdo con la presente invención.

Cuando uno o más de los compuestos de acuerdo con la presente invención se utiliza en combinación con un segundo agente terapéutico activo, la dosis de cada compuesto puede ser

Cuando uno o más de los compuestos de acuerdo con la presente invención se utiliza en combinación con un

segundo agente terapéutico activo, la dosis de cada compuesto puede ser o bien la misma o diferir cuando el compuesto se utilice solo. El experto en la materia apreciará con facilidad las dosis apropiadas.

Los ejemplos siguientes se utilizan para describir la presente invención. Se entiende que son meramente ejemplares y se entienden que no limitan la amplitud de la invención en modo alguno.

Ejemplos

El estómago produce ácido para ayudar a descomponer los alimentos, haciendo que la digestión sea más liviana. En algunos casos, el ácido del estómago puede irritar en realidad el revestimiento del estómago y el duodeno (extremo superior del intestino delgado). A veces, el ácido "refluye" hacia arriba e irrita el revestimiento del esófago. La irritación del revestimiento del estómago o del esófago causa indigestión ácida (ardor de estómago) y, a veces, provoca úlceras o hemorragia.

En la presente solicitud particular se muestra que $ZnCl_2$ tiene un potente efecto inhibidor sobre la secreción de ácido gástrico a nivel celular mediante la supresión de la actividad de la ATPasa gástrica de H^+/K^+ en las glándulas gástricas de rata y humanas. También se demuestra que la adición de concentraciones micromoles de $ZnCl_2$ puede prevenir con eficacia la secreción de ácido dependiente de histamina en estómagos de rata enteros y a través de una dieta enriquecida en $ZnCl_2$.

Material y métodos

Animales. Ratas Sprague-Dawley de 150-250 g (Charles River Laboratory) se alojaron en habitáculos con ciclos de luz con control de humedad y climatización, se alimentaron con alimento balanceado comercial con acceso libre al agua, y se manipularon de acuerdo con las prácticas humanas para el cuidado de animales establecidas por el Cuidado de Animales de Yale. Antes de los experimentos, a los animales se les mantuvo en ayunas 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 corpus y el antro se aislaron y se cortaron en secciones de 0,5 cm cuadrados, y se lavaron con solución de Ringer fría para eliminar las partículas de alimentos residuales. Los tejidos se transfirieron a la platina de un microscopio de disección. Las glándulas individuales se aislaron utilizando una técnica de disección manual como se ha descrito previamente[36]. Después del aislamiento, las glándulas aisladas individuales se adhieren a los cubreobjetos que se habían pre-recubierto 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 almacenó en hielo e inmediatamente las glándulas aisladas se diseccionaron como se ha descrito previamente.

Diagnóstico por imágenes digitales para pH intracelular. Las glándulas gástricas aisladas se incubaron en una solución de Ringer tamponada con HEPES que contenía 10 µmol de colorante BCECF-AM (2', 7')-bis-(2-carboxietil)-5-(y-6)-carboxi-fluoresceína, éster aceto-metílico (Molecular Probes, Eugene, OR) sensible a pH durante 10 minutos, como se ha descrito previamente[37-39]. Después de la carga de colorante, la cámara se lavó con una solución de HEPES para eliminar todo el colorante sin desesterificar. La cámara de perfusión se montó en la platina de un microscopio invertido (Olympus IX50), que se utilizó en el modo de epifluorescencia con un objetivo de 40x. BCECF se excitó sucesivamente a 440 nm y 490 nm a partir de una fuente de luz monocromador, y la señal fluorescente resultante se controló a 535 nm utilizando una cámara con dispositivo acoplado de carga intensificada. Las regiones individuales de interés se esbozaron y controlaron de forma simultánea cada 15 s durante el curso del experimento. Un mínimo de 8 células o regiones se seleccionaron por glándula.

La extrusión de protones por las células parietales individuales se controló mediante la observación de la recuperación de pH_i después de la carga de ácido de las células con la solución de HEPES exenta de Na^+ que contenía 20 mM de NH_4Cl. Las células parietales se perfundieron posteriormente con HEPES exento de Na^+, que suprimió toda la actividad del intercambiador Na^+/H^+ (AIN), atrapando H^+ en el citosol e iniciando una caída inmediata del pHi. En estas condiciones, la única vía de extrusión de H^+ potencial es a través de activación de la ATPasa de H^+/K^+.

Los datos de la relación de intensidad (490/440) se convirtieron a valores de pH utilizando la técnica de calibración con alto K^+/nigericina[40]. Las tasas de recuperación del pH intracelular se calcularon a partir del mismo pH de partida inicial para eliminar la variación potencial en el poder tampón intracelular individual de las células en las diferentes condiciones experimentales. Todos los datos, incluyendo las imágenes individuales para todas las longitudes de onda, se registraron en el disco duro, permitiendo volver a las imágenes individuales después del experimento para su posterior análisis. Las tasas de recuperación se expresan como ΔpH/min, y se calcularon sobre el intervalo de pH de 6,5-6,8. Todos los productos químicos se obtuvieron de Sigma y Molecular Probes. Todos los datos se resumieron como medias ± EE. y se analizaron mediante la agrupación de las mediciones en valores basales.

Mediciones de pH de estómago entero. Antes de los experimentos, a los animales se les mantuvo en ayunas durante 24 h para reducir la secreción de ácido basal a un mínimo consistente. Los animales se sacrificaron con una sobredosis de isoflurano y se realizó una incisión abdominal. El estómago se ligó en la unión duodenal y esofágica y se extirpó. A continuación, se infundió 1 ml de solución salina no isotónica sin tamponar (140 mM) en el lumen del estómago. Este volumen no se distiende en el estómago, evitando así la estimulación potencial de la secreción de ácido por el estiramiento. Los estómagos se colocaron a continuación en solución de Ringer oxigenada tamponada con HEPES o en la misma solución que contenía 100 μM de histamina solo o adicionalmente 300 μM de $ZnCl_2$ (pH 7,4) y se mantuvieron a 37 ºC. Tras haber transcurrido 1 hora, el contenido del estómago se aspiró y el pH se registró.

Complementos orales de cinc en ratas. Estos estudios se diseñaron para modular la secreción de ácido por el aumento de cinc en la dieta. En estos estudios, se utilizó una solución oral de $ZnCl_2$ (cloruro de cinc en agua del grifo). Los animales tuvieron acceso libre a la comida y al agua que contenía cinc durante la duración del estudio. Se añadieron 150 mg/kg/día o 0,5 mg/kg/d de $ZnCl_2$ al agua para consumo durante 5 días. Los animales tuvieron libre acceso al agua antes del experimento y se alimentaron con alimento balanceado comercial hasta 24 horas antes del experimento, momento en el que tuvieron solo acceso libre 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 en los animales. Las glándulas gástricas individuales se aislaron con la técnica de disección manual descrita previamente.

RESULTADOS

La secreción de ácido inducida por histamina en ratas y humanos se inhibe por $ZnCl_2$. En la primera serie, se utilizaron mediciones de pH_i de las células parietales individuales en las glándulas gástricas recién aisladas para medir la actividad de la ATPasa de H^+/K^+. La actividad de la bomba de protones se calculó a partir de la tasa de alcalinización del pH_i (ΔpH_i/min) después de la acidificación mediante 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 de H^+/K^+, como se ha mostrado previamente[41]. En ausencia de cualquier estimulación, solo se observó una baja tasa de recuperación de pHi (0,011 ± 0,002 unidades de pH_i/min, n = 32 células de 3 glándulas de 3 animales; Fig. 1 E). Después de la exposición de las glándulas gástricas de rata a histamina (100 μM), la tasa de alcalinización aumentó a 0,051 ± 0,004 unidades de pH/min (n = 60 células de 15 glándulas de 8 animales; Fig. 1 A). La adición de 300 μM de $ZnCl_2$ al baño de superfusión en presencia de histamina (100 μM) impidió el efecto estimulante de la histamina en la tasa de recuperación de pH_i independiente de Na^+ (0,0012 ± 0,004 unidades de pH/min) y lo redujo al mismo nivel que se aprecia en las glándulas de control no expuestas a histamina (n = 60 células de 6 glándulas de 4 animales); Fig. 1 B). Las glándulas gástricas humanas mostraron también un eflujo fuerte de protones bajo la estimulación por histamina. Este efecto se suprimió por $ZnCl_2$ (Fig. 1C, D); (n = 26 células, 3 glándulas). Por consiguiente, las glándulas gástricas recién aisladas de rata y humanas mostraron que la actividad de la ATPasa de H^+/K^+ puede estimularse por histamina e inhibirse por $ZnCl_2$.

$ZnCl_2$ inhibe la secreción de ácido de ratas de manera dependiente de la dosis. $ZnCl_2$ inhibió la extrusión de H^+ de manera dependiente de la dosis (Fig. 2). En este protocolo, la secreción de ácido se estimuló por histamina y se expresó como ΔpH_i/min. Por lo tanto, las glándulas gástricas de ratas se incubaron con 100 μM de histamina (15 min) y la histamina estuvo presente durante todo el experimento. Para investigar la potencia inhibidora de $ZnCl_2$, se utilizaron diferentes concentraciones (25 μM-300μM). $ZnCl_2$ estuvo presente durante todo el experimento, incluyendo el periodo de incubación con histamina de 15 min. 300 μM de $ZnCl_2$ mostraron una inhibición al 98 % de la extrusión de protones en comparación con la tasa inducida por histamina y el control.

Inicio rápido e inhibición reversible de la secreción de ácido gástrico por $ZnCl_2$. Existen bloqueadores de ácido irreversibles (por ejemplo, omeprazol) y reversibles (BAC-P) disponibles[42]. Se investiga la reversibilidad del efecto inhibidor de $ZnCl_2$ en nuestro escenario *in vitro*. Por consiguiente, se estimula la secreción de ácido con histamina (100 μM) durante todo el experimento. Cuando se observó la alcalinización intracelular (secreción de ácido), se añadió $ZnCl_2$ (300 μM) al baño de superfusión. La secreción de ácido se suprimió después de unos segundos (Fig. 3 A). Después de la eliminación de $ZnCl_2$ en el mismo experimento, la secreción de ácido regresa a niveles normales. Asimismo se pudo demostrar reversibilidad después de la incubación y la superfusión de las células parietales durante 20 min con $ZnCl_2$ (300 μM) e histamina (100 μM). Después de la eliminación de $ZnCl_2$ del baño de superfusión, la alcalinización intracelular (extrusión de protones) procedió a una tasa normal no inhibida (Fig. 3 B).

El complemento oral de cinc reduce la secreción de ácido gástrico basal en ratas. Estos estudios se concibieron para modular la secreción de ácido mediante el aumento de cinc en la dieta. Se añadieron 150 mg/kg/día o 0,5 mg/kg/d de $ZnCl_2$ al agua para consumo durante 5 días. La tasa de extrusión de H^+ se midió con BCECF como se ha descrito previamente. Las células parietales estimuladas con histamina mostraron una fuerte tasa de recuperación (extrusión de protones) de 0,051 ± 0,004 (n = 120 células de 15 glándulas de 8 animales). La Fig. 4 muestra que el $ZnCl_2$ (150 mg/kg/día o 0,5 mg/kg/d) en el agua para consumo disminuyó significativamente la secreción de ácido inducida por histamina en comparación con el grupo control con solo histamina. 150 mg/kg/d: 0,022 ± 0,0045; (n = 60 células de 10 glándulas de 3 animales), 0,05 mg/kg/d: 0,034 ± 0,0036; (n = 60 células de 6 glándulas de 4 animales).

$ZnCl_2$ disminuyó la producción de ácido gástrico *ex vivo*. Para determinar si $ZnCl_2$ podría inhibir la secreción de ácido gástrico en el órgano entero, se analizó el pH luminal en los estómagos de ratas recién aislados después de la incubación en HEPES o en la misma solución en presencia de 100 μM de histamina o ambos, 100 μM de histamina y 300 μM de $ZnCl_2$. Como se ilustra en Figura 5, en presencia de histamina, significa que el pH luminal era inferior a las preparaciones estomacales de control incubadas con solo HEPES (3,15 ± 0,27 frente a 4,59 ± 0,48, n = 9 para cada una, P <0,005). En presencia de histamina y $ZnCl_2$, el pH luminal era casi tan alto como en el grupo control sin estimulación, aunque estos hallazgos no fueron significativos (4,54 ± 0,065 frente a 4,59 ± 0,48, n = 8 cada grupo, P> 0,005).

Diferentes sales de cinc muestran una eficacia diferente en la elevación del pH intraluminal. Se realizaron mediciones del pH intraluminal del estómago entero utilizando una serie de sales de cinc de acuerdo con la presente invención para evaluar el efecto de la sal y la concentración en el pH intraluminal. Preparaciones de estómago entero aislado de ratas se canularon en la unión esofágica y duodenal y se perfundieron *in vitro* con solución de Ringer a 37 ºC, pH 7,4. A continuación, el perfusado sanguíneo se expuso a 100 μM de histamina para inducir la secreción de ácido. El lumen del estómago se infundió con 0,5 cc de solución salina isotónica no tamponada. En algunos estudios, una de las siguientes sales de cinc se añadió al perfusado de lumen a una concentración final de 300 μM (cloruro de cinc, sulfato de cinc, acetato de cinc, citrato de cinc). Los datos son la suma de 5 estómagos distintos de 5 animales distintos para cada una de las columnas. Los datos son la media de todos los estudios con el error estándar de la media mostrado. Estos resultados aparecen en la figura 6 adjunta.

DISCUSIÓN

En este estudio, se examinó la inhibición dependiente de la dosis de la secreción de ácido gástrico por $ZnCl_2$ en glándulas gástricas humanas y de rata. Además, se trató de evaluar el inicio del efecto de $ZnCl_2$ y se utilizó la preparación de estómago entero, así como el complemento oral de cinc para investigar el efecto sobre la secreción de ácido gástrico.

La secreción de ácido se indujo por la tradicionalmente conocida histamina secretagoga, que dio lugar a una fuerte extrusión de protones a través de la ATPasa de H^+, K^+ en comparación con la secreción de ácido basal en la glándula en estado de reposo no estimulada, (Fig. 1e). En estudios posteriores se examinaron los efectos inhibidores de $ZnCl_2$ en la secreción de ácido gástrico sensible a secretagogos. Se confirmó la potencia inhibidora de $ZnCl_2$ (300 μM) en la secreción de ácido inducida por histamina. $ZnCl_2$ inhibe la secreción de ácido en la glándula gástrica única de manera dependiente de la dosis. $ZnCl_2$ suprimió la extrusión de protones a un nivel comparable al de los experimentos de control tanto en las glándulas gástricas humanas como de rata (Fig. 1). Esta dosis sería equivalente al complemento de 40 mg por día en los seres humanos. La cantidad diaria recomendada de ingesta de cinc es de 11 mg. En la literatura, la cantidad considerada tóxica es 10 veces mayor. Por lo tanto, 40 mg de $ZnCl_2$ como bloqueador de ácido oral sería significativamente menor que las dosis tóxicas descritas. Además, una cantidad similar de $ZnCl_2$ también impidió la secreción de ácido en las preparaciones *ex vivo* de estómago entero (Fig. 5). En estos experimentos, $ZnCl_2$ se aplicó en la cara luminal del estómago y, por consiguiente, se puede concluir que el ion metálico está funcionando directamente sobre la ATPasa de H^+/K^+ de la célula parietal o se introduce en la célula para modular la vía de señalización de la secreción de ácido. No queda claro cómo $ZnCl_2$ se introduce en la célula. Estudios previos describen la entrada de cinc en la célula a través de canales de Ca^{2+} dependientes de voltaje y/o el intercambiador HCO_3/Cl^- de la membrana basolateral. La aplicación por vía oral de $ZnCl_2$ confirmó nuestros resultados previos. La extrusión de protones en 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 las estimuladas con histamina. En la figura, las glándulas tratadas con cinc son aún mayores que solo el control (sin tratar con histamina).

Como se menciona en la introducción, los inhibidores de la bomba de protones presentan un inicio retrasado de la acción agudo y el efecto inhibidor completo es lento, requiriendo varios ciclos de dosis. Por ejemplo, omeprazol solo alcanza el 30 % de inhibición de la secreción de ácido en el primer día de tratamiento[43]. Nuestro estudio caracteriza el inicio rápido de acción de $ZnCl_2$, así como su reversibilidad. Un inicio más rápido del efecto y una mayor duración de la acción ofrecerá una mejora a los pacientes con ERGE y otros trastornos relacionados con el ácido. De hecho, como se muestra en la Fig. 5A, se fue capaz de inhibir la secreción de ácido inducida por histamina durante la extrusión de protones máxima mediante la adición de 300 μM de $ZnCl_2$. Por otra parte, la secreción de ácido inducida por histamina continuó después de la eliminación de $ZnCl_2$ del baño de superfusión, demostrando el carácter reversible de $ZnCl_2$ (Fig. 3 b).
En resumen nuestros hallazgos indican que $ZnCl_2$ 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 entero.
Dicho tratamiento puede proporcionar un beneficio significativo para los pacientes con ERGE. Los futuros estudios que investiguen el mecanismo exacto por el cual $ZnCl_2$ inhibe la secreción de ácido son necesarios y ayudarán a definir su futuro lugar en el tratamiento de enfermedades relacionadas con el ácido en el ámbito clínico.

Región fúndica

En los siguientes ejemplos, se muestra que la región fúndica del estómago y las glándulas fúndicas contienen

proteínas de secreción de ácido funcionales. Además, se muestra que las glándulas fúndicas tienen una proteína independiente de sodio y potasio, la ATPasa de protones, referida comúnmente como ATPasa vacuolar de H^+. La evidencia consiste en datos de inmunofluorescencia utilizando un anticuerpo dirigido contra la subunidad a de la ATPasa de H^+ y los datos funcionales (figuras 7-10) en los que se mide la tasa de extrusión de los protones a partir 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 tenía influencia en la ATPasa gástrica de H, K hallada en las células parietales del cuerpo del estómago. Esta actividad se demuestra tanto en el modelo de rata como en los seres humanos en las resecciones gástricas tomadas de pacientes sometidos a cirugía de reducción gástrica.

Materiales y métodos

Animales y productos químicos

Las ratas Sprague Dawley con un peso de 200-300 g se alojaron en habitáculos con ciclos de luz con control de humedad y climatización, y se alimentaron con alimento balanceado comercial con acceso libre al agua. Antes de los experimentos, a los animales se les mantuvo en ayunas durante 18-24 horas al tiempo que se les permitía acceso libre al agua para reducir la secreción de ácido basal. Después de la anestesia con isoflurano, los animales se sacrificaron, se realizó una incisión abdominal exponiendo el estómago. Después de aislar las uniones del esófago y duodeno, se realizó una gastrectomía total, dejando unidos 1-2 cm de esófago a la gastrectomía. Se incluyó la unión esofágica para tener un punto de referencia común para todos los aislamientos fúndicos. Mientras se sostenía el esófago con un fórceps, se extrajeron aproximadamente 3 mm del fundus con 5 mm de esófago intacto.

Aislamiento de las glándulas fúndicas

El tejido fúndico extraído se colocó en una solución de Ringer tamponada con HEPES enfriada con hielo (pH ajustado a 7,4 a 4 ºC), y se transfirió a la platina de un microscopio de disección. Las glándulas fúndicas se visualizaron en el microscopio con un aumento de 50X. Se diseccionaron a mano las glándulas adyacentes a la unión esofágica. Después del aislamiento, las glándulas individuales se adhirieron a los cubreobjetos que habían sido pretratados con el adhesivo biológico Cell-Tak (adhesivo celular Cell-Tak™, BD Biosciences; Bedford, MA).

Inmunohistoquímica/inmunofluorescencia

Se anestesiaron ratas macho Wistar (200-250 g) con pentobarbital IP y se perfundieron a través del ventrículo izquierdo con TFS seguido de un fijador de paraformaldehído-lisina-periodato (PLP), como se ha descrito previamente[19a]. Los estómagos se extirparon, se limpiaron los residuos de alimentos, y se fijaron durante la noche a 4 ºC por inmersión en PLP. Los estómagos se lavaron tres veces con TFS y se cortaron secciones con un grosor de 5 µm después de crioprotección con 2,3 M en TFS 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 TFS y se incubaron con TFS que contenía albúmina de suero bovino al 1 % durante 15 min antes del anticuerpo primario. Los anticuerpos primarios (monoclonal de ratón anti-ATPasa gástrica de H^+, K^+ β humana (Affinity Bioreagents, CA, EE. UU.)) se diluyeron a 1:50 con TFS y se aplicaron durante una noche a 4 ºC. A continuación, las secciones se lavaron dos veces durante 5 min con TFS con NaCl alto (TFS + NaCl al 2,7 %), una vez con TFS, y se incubaron con el anticuerpo secundario (Alexa 546 anti-conejo burro, Molecular Probes, Oregon) a una dilución de 1:1.000 durante 1 h a temperatura ambiente. Las secciones se lavaron dos veces con TFS con NaCl alto y una vez con TFS antes de montarse con VectaMount (Vector Laboratories, Burlingame, CA). Los especímenes se vieron con un microscopio Nikon E-800.

Inmunomarcado con oro

Las ratas se anestesiaron utilizando 5 ml de pentobarbital sódico al 10 % administrado IP. La fijación se realizó a través de una perfusión cardiaca del ventrículo izquierdo utilizando TFS y después PLP. El estómago se extrajo y se fijó en PLP durante 4 horas y luego se transfirió a un tampón de mantenimiento durante la noche. Se realizaron secciones congeladas y en Epon de la unión gastroesofágica y se tomaron cortes para el marcado con oro y microscopía electrónica.

Tinción con hematoxilina y eosina

Las ratas se anestesiaron utilizando 5 ml de un pentobarbital sódico al 10 % administrado IP. La fijación se realizó a través de una perfusión cardiaca del ventrículo izquierdo utilizando TFS para lavar al animal y después un fijador Karnovsky durante 2 horas, y luego en un tampón de mantenimiento durante la noche. Se realizaron secciones de la unión gastroesofágica y se tomaron cortes por microscopía electrónica de la morfología de la proteína ATPasa de H^+, K^+ y la tinción con hematoxilina/eosina de las glándulas de la unión gastroesofágica.

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

Utilizando el mismo protocolo que se desarrolló para la perfusión de la glándula del corpus aisladas[20a, 21a], las

glándulas fúndicas individuales se cargaron con una concentración de 10 μM de colorante sensible al pH (BCECF, (2', 7')-bis-(2-carboxietil)-5-(y-6)-carboxi-fluoresceína, éster aceto-metílico; 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 IX50) unido a un sistema de diagnóstico por imágenes digitales (Universal Imaging Corp; Downingtown, PA), y se perfundieron con solución de Ringer tamponada con HEPES durante 5 min a 37 ºC para eliminar cualquier colorante no esterificado. Las mediciones se realizaron en el modo de epifluorescencia con los objetivos de 60x/.80/ y 40x/.90. BCECF se excitó sucesivamente a 440 ± 10 nm y 490 ± 10 nm, la señal fluorescente intracelular resultante se controló a 535 nm con una cámara con dispositivo de carga acoplada intensificada. Los puntos de datos se adquirieron cada 15 s. Los datos de la relación de intensidad 490/440 resultantes se convirtieron a valores de pH intracelular (pH_i) utilizando la técnica de calibración con K^+ alto/nigericina[22as, 22as]. La extrusión de ácido se controló en ausencia de bicarbonato. La tasa de alcalinización intracelular se midió después de utilizar la técnica de prepulso con NH_4Cl[22a, 23a], lo que resultó en una acidificación intracelular reproducible y sostenida. Las tasas de recuperación de pH intracelular (actividad de la ATPasa de H^+, K^+) se midieron en soluciones de HEPES exentas de Na^+ que contenían: 1) 100 μM de histamina, 2) 100 μM de pentagastrina, 3) 100 μM de acetilcolina, 4) 100 μM de histamina + omeprazol a concentraciones de 100 μM y 200 μM. Las tasas de recuperación del pH intracelular se calcularon a partir del mismo pH de partida inicial para eliminar la variación potencial en el poder tampón intracelular individual de las células en las diferentes condiciones experimentales. Todos los datos, incluyendo las imágenes individuales para todas las longitudes de onda, se registraron en el disco duro, permitiendo volver a las imágenes individuales después del experimento para su posterior análisis. Las tasas de recuperación se expresan como ΔpH_i/min, y se calcularon en el intervalo de pH de 6,5-6,9.

La activación de la secreción de ácido a través de la histamina, acetilcolina o pentagastrina se indujo por la preincubación de las glándulas durante 15 min antes del experimento combinado con una carga de BCECF (100 μM). Todos los datos se resumen como medias ± EE. La significación se determinó mediante la prueba de ANOVA de una vía con $p < 0,05$ considerara estadísticamente significativa. Todos los productos químicos utilizados se obtuvieron de Sigma y Molecular Probes.

Resultados

Localización inmunohistoquímica de la ATPasa de H^+, K^+

La inmunohistoquímica que utiliza anticuerpos específicos dirigidos contra epítopos muy conservados en las subunidades α o ß de la ATPasa gástrica de H^+, K^+ identificó la tinción específica para ambas subunidades en las glándulas fúndicas (Figura 7 A).

Microscopía electrónica

Tras obtener secciones en Epon de la unión gastroesofágica de rata en ayunas, se realizó microscopía electrónica en las glándulas gástricas que se encontraban justo después de esta unión y se llamaron F1 y se utilizaron en todos nuestros experimentos. Las Figuras 7 B, C muestran la localización de la etiqueta con oro de la ATPasa de H^+, K^+ en la célula parietal de la glándula fúndica. Se notó una mayor densidad de tinción en el polo apical de la célula en los canalículos secretores o vacuolares. Esto puede correlacionarse con las tasas altas de extrusión basal de protones de las regiones fúndicas en comparación con el corpus debido al hecho de que la proteína está siempre en la membrana de la glándula fúndica, mientras que en el corpus el receptor está dentro del canalículo secretor hasta la estimulación.

Tinción del receptor H2

La tinción del receptor H2 se realizó tanto en el fundus como en el corpus para examinar la presencia y la densidad del receptor en las zonas del estómago. Se halló una clara tinción basolateral en las glándulas del corpus y no se pudo 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 fúndica. Se aprecia claramente que el receptor H2 está ausente en las glándulas del fundus y presente en las del corpus (datos no mostrados).

<u>Secreción de ácido inducida por secretagogos</u>

El pH intracelular se midió utilizando el colorante BCECF sensible a pH y se controló de forma continua utilizando un sistema de diagnóstico por imágenes de fluorescencia en tiempo real para identificar los cambios en el pH intracelular. Las tasas de eflujo de protones se calcularon como ΔpH_i/min utilizando una técnica desarrollada en nuestro laboratorio para las glándulas del corpus[21a-25a]. Se midió el cambio en la tasa de eflujo en presencia y ausencia de secretagogos.

Efecto de la histamina en la ATPasa de H^+, K^+ fúndica y del corpus

Se incubaron glándulas individuales con 100 μM de histamina durante 20 minutos. La histamina estuvo presente durante todo el protocolo de superfusión. En la glándula del corpus, se midió una tasa de extrusión de protones

estimula por histamina de 0,056 ± 0,008 ΔpH_i/min, mientras que la secreción de ácido basal sin secretagogos era 0,011 ± 0,002 ΔpH_i/min (Figuras 8C, D). En comparación con el corpus, el fundus mostró incluso por debajo de las condiciones basales una tasa de extrusión de protones alta (0,039 ± 0,009 ΔpH_i/min). Esto es similar a la secreción de ácido inducida por histamina (0,040 ± 0,0079 ΔpH_i/min, Figuras 8 A, B). Estos datos muestran que no se produce efecto alguno de la histamina en las glándulas de la zona F1 en comparación con los controles.

Acetilcolina y secreción de ácido fúndica

En la siguiente serie se investigó las propiedades funcionales de las glándulas fúndicas de acuerdo con la estimulación neuronal a través de ACH. En cambio, con la histamina, se produjo un cambio notable en las tasas de extrusión de protones después de la estimulación. Aunque los controles aún estaban bombeando activamente protones, las glándulas se estimularon con 100 µM de acetilcolina durante 20 minutos durante la carga de colorante y a lo largo de la perfusión. Se determinó que la acetilcolina causó un aumento en la tasa de alcalinización (0,075 ± 0,0015 ΔpH_i/min frente a los controles 0,039 ± 0,009 ΔpH_i/min), mostrando un efecto directo de la acetilcolina en la extrusión de ácido fúndica (Figura 9).

Efecto de la pentagastrina en la zona F1

Para determinar si la gastrina también podría activar la ATPasa fúndica de H^+, K^+, se llevaron a cabo estudios que utilizan pentagastrina, un péptido sintético que contiene cinco aminoácidos terminales de la gastrina, que se sabe que causa una fuerte secreción de ácido en glándulas del corpus. En una dosis de 100 µM de pentagastrina, se observó tasas de alcalinización de 0,062 ± 0,007 ΔpH_i/min similares a la acetilcolina en términos de potenciar la tasa de extrusión de protones de las células fúndicas (Figura 9).

<u>Inhibidores de la secreción de ácido gástrico</u>

En la siguiente serie de estudios, se trató de determinar si las glándulas fúndicas tenían perfiles similares del inhibidor de la ATPasa de H^+, K^+ al igual que los observados en el corpus. Se eligió el inhibidor bien caracterizado de la ATPasa gástrica de H^+, K^+ omeprazol y BAC-P AZD0865 (bloqueador de ácido competitivo con potasio)[26,27].

Efecto del omeprazol en la zona F1 y en el corpus

Como se muestra en la Figura 10 A, el omeprazol no inhibió la secreción de ácido utilizando la misma concentración que inhibió completamente la secreción de ácido inducida por secretagogos en el corpus (Figura 10 B). Incluso en una dosis mayor de la que inhibe normalmente la secreción de ácido en el corpus, el fundus continuó extruyendo protones. Las glándulas fúndicas se preincubaron con 200 µM de omeprazol y 100 µM de histamina y luego se perfundieron con omeprazol e histamina a lo largo de todo el experimento. Las tasas de alcalinización fueron 0,045 ± 0,002 ΔpH_i/min en comparación con los controles estimulados solo con histamina a una tasa de 0,042 ± 0,007 ΔpH_i/min. En cambio, la secreción de ácido en las glándulas del corpus se suprimió mediante 200 µmol de omeprazol (0,014 ± 0,002 ΔpH_i/min), (Figura 10 B).

Efecto de AZD0865 en la zona F1 en comparación con el corpus:

También se muestra en la Figura 10(C, D), que BCA-P AZD0865 inhibe eficazmente la secreción de ácido en el corpus a una concentración de 10 µM; no obstante, a la misma concentración, la zona F1 aún tiene una recuperación dependiente de potasio. En el fundus, el pH intracelular aumentó a una tasa de 0,031 ± 0,006 ΔpH_i/min. En el corpus a la misma concentración de 10 µM, la tasa de recuperación fue de 0,021 ± 0,008 ΔpH_i/min.

Tabla 1

Composición de las soluciones utilizadas para las mediciones de pH intracelular en las glándulas gástricas únicas de rata. Todas las concentraciones se presentan en mM. NMDG es N-metil-*D*-glucosamina, todas las soluciones se ajustaron a pH 7,4, a 37 ºC utilizando NaOH o KOH. NMDG se ajustó con HCl.

Tabla 1

	Solución 1: HEPES convencional	Solución 2: HEPES exento de Na^+	Solución 3: HEPES exento de Na^++ NH_4Cl	Solución 4: calibración con K^+ alto
NaCl	125	-	-	-
NMDG	-	125	125	125
NH_4Cl	-	-	20	-
KCl	3	3	3	105
$MgSO_4$	1,2	1,2	1,2	1,2

	Solución 1: HEPES convencional	Solución 2: HEPES exento de Na^+	Solución 3: HEPES exento de Na^++ NH_4Cl	Solución 4: calibración con K^+ alto
$CaCl_2$	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

Discusión

En este estudio se proporcionaron pruebas de que la región fúndica del estómago contiene glándulas que son capaces de segregar ácido gástrico a través de la ATPasa de H^+, K^+. En nuestro estudio, se ha caracterizado por vez primera las propiedades de secreción de ácido del fundus. Se proporcionó evidencia morfológica, inmunohistoquímica y funcional para la actividad de la proteína ATPasa de H^+, K^+ en el fundus. En nuestros estudios morfológicos, primero se tuvo que delimitar donde se inició y terminó el fundus. Como se entiende que esta región comienza en la unión gastroesofágica, se decidió coger glándulas de este punto de unión hasta el inicio de la curvatura mayor del fundus. Se cogieron secciones de tejido de lo que llamamos la zona F1, que comenzaba a partir de la unión gastroesofágica y continuaba 2 mm en sentido distal. Se descubrió que estas glándulas eran bastante diferentes en forma y también en la densidad similar a células parietales. Para confirmar que las células parietales en F1 contenían ATPasa de H^+, K^+, se tiñó la subunidad α y ß (la Figura 7 muestra la tinción de la subunidad α).

Durante nuestra investigación de la secreción de ácido fúndica inducida por secretagogos, se ha sido capaz de demostrar que la histamina no es el estimulador más potente de la secreción de ácido en el fundus, ya que lo es en el corpus. De hecho, se aprecia muy poca diferencia en las glándulas que no se estimularon en comparación con las estimuladas con histamina (Figuras 8 y 9). Este resultado se confirmó por la falta de tinción del receptor H2 en el fundus (datos no mostrados). La acetilcolina fue el más fuerte de los tres secretagogos en el fundus, que puede referirse a la proximidad del nervio vago a la región fúndica. Como esta sección del estómago se extiende cuando el alimento está presente, se produce una estimulación vagal[28a-30a] con secreción de acetilcolina asociada. Este hallazgo es especialmente importante cuando se consideran los problemas clínicos en pacientes obesos que padecen la enfermedad por reflujo gastroesofágico (ERGE). Esto se puede correlacionar con los beneficios que obtienen los pacientes con enfermedad de úlcera grave cuando se someten a una vagotomía después de no conseguir alivio de la gestión médica[31a-33a].

Otro hallazgo interesante es la falta de inhibición de omeprazol sobre la secreción de ácido fúndica pese a que son inmunorreactivos con anticuerpos para la ATPasa gástrica de H^+, K^+. Se fue incapaz de inhibir la secreción de ácido basal fúndica o inducida por secretagogos (histamina) con el inhibidor de la bomba de protones omeprazol (Figura 10 A) a dosis que eran el doble de las que eliminaron eficazmente toda la secreción de ácido en el corpus (Figura 10 B). Estos resultados están en contraste directo con nuestros datos (Figuras 8 C, D)[20a, 21a, 24a, 25a] y otros hallazgos en las glándulas del corpus[34a-38]. Este hallazgo tiene una correlación clínica interesante en que hay un número creciente de pacientes que padecen ERGE que no son tratados eficazmente con IBPs[39a]. Una posible explicación para la falta de sensibilidad a omeprazol podría ser que a medida que el omeprazol necesita activarse por el ácido, la falta de un espacio similar a los canalículos impediría la concentración de ácido y potencialmente prevendría la activación de del fármaco por el ácido. Como se muestra en las Figuras 7 B, C utilizando el inmunomarcado con oro, se aprecia, de hecho, un espacio secretor y que las bombas parece que recubren la superficie apical de este espacio. Con las teorías previas de la secreción de ácido aparecieron los numerosos dictados de modalidades de tratamiento quirúrgicas y médicas que se centraron en el corpus. Es de interés que la reciente incidencia de síntomas similares a ERGE en pacientes con derivación gástrica después del procedimiento se deja solamente con una pequeña parte del fundus, y con escaso o nada de corpus funcional. En esos pacientes sintomáticos ha habido escaso o ningún éxito en el uso de IBP clásicos[40a], que puede explicarse posiblemente ahora por nuestros hallazgos recientes.
Nuestros hallazgos demuestran que la región fúndica del estómago es mucho más que un área de almacenamiento y, de hecho, puede segregar ácido en respuesta a la estimulación por secretagogos, además de la ATPasa de H^+, K^+ encontrada en este segmento parece insensible al omeprazol. Estos resultados pueden conducir a importantes dianas nuevas para los pacientes que son resistentes a IBPs o que tienen síntomas de reflujo recurrentes en presencia de la terapia con IBPs.

Resultados:

Las glándulas fúndicas mostraron una morfología distinta en comparación con las glándulas del corpus (alargadas y que carecen de células típicas parietales protuberantes). La inmunofluorescencia (subunidad α y ß de la ATPasa de H^+, K^+) e inmunomarcado con oro (subunidad ß) fueron positivos en la región fúndica.
Las tasas de extrusión de protones de las glándulas fúndicas se estimularon con gastrina y acetilcolina, pero no se vieron influenciadas por la histamina. Finalmente, la secreción de ácido de glándulas fúndicas estimuladas no pudo inhibirse por la ATPasa de H^+, K^+ omeprazol.

Conclusión:

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

La digestión de los alimentos por el estómago requiere una combinación compleja de acontecimientos hormonales y neuronales. Generalmente, se ha pensado que el corpus o cuerpo del estómago segrega ácido a través de las células parietales y el antro segrega bicarbonato para neutralizar el digestato elevando el pH del contenido del estómago[1a-9a]. Durante este proceso, los movimientos peristálticos del estómago dan lugar a contracciones que empujan la comida hacia arriba en la sección fúndica del estómago en la que transita antes de salir en el intestino delgado[10a]. En este modelo de digestión, el fundus actúa solo como una zona de almacenamiento y no está implicado en la secreción de ácido[4a, 11a]. La secreción de ácido gástrico clásica en el corpus se produce cuando la ATPasa de H^+, K^+ es estimulada por secretagogos y comienza a segregar protones en el canalículo secretor después de ser transportada a la membrana apical desde su túbulo-vesículas citoplásmicas[12a]. La célula parietal tiene al menos tres receptores activadores en su membrana basolateral, es decir, histamina H2, acetilcolina M3 y gastrina CCK-B. Es un hecho comúnmente aceptado que el receptor H2 se acopla con Gs a la adenilato ciclasa activada produciendo AMPc y la posterior activación de la proteína quinasa dependiente de AMPc. La acetilcolina y el receptor de gastrina se acoplan a través de un sistema sin Gs, probablemente Gq que activa la fosfolipasa C, que produce IP3 y diacilglicerol. La acetilcolina libera Ca^{2+} intracelular y la proteína quinasa C activa la gastrina[13a]. Después de esta cascada de acontecimientos intracelulares, la célula parietal extruye protones a través de la bomba de la ATPasa de H^+, K^+ que intercambia iones H^+ intracelulares por iones K^+ extracelulares en una relación electroneutral[14a].

Observaciones recientes en pacientes sometidos a cirugía de derivación gástrica presentan un paradigma interesante, concretamente, solo se les ha dejado una pequeña región fúndica después de la operación, aún tienen secreción de ácido, que en algunos pacientes conduce a síntomas de reflujo, úlceras y pérdidas de contenido entérico[15a]. Cabe destacar que muchos de estos pacientes tienen poco éxito al disminuir los síntomas, a pesar de la terapia con inhibidor de la bomba de protones (IBP)[16a-18a]. A partir de estas observaciones clínicas iniciales, se plantea la pregunta: ¿desempeña el fundus un papel en la producción de ácido, y hasta qué punto son similares sus propiedades a las proteínas secretoras del corpus. También se tuvo interés en determinar la sensibilidad fúndica a secretagogos clásicos y, por lo tanto, se llevaron a cabo los estudios utilizando histamina, pentagastrina, y acetilcolina.

En el presente experimento, se investigó las propiedades de secreción de ácido del fundus de rata en estados de reposo y estimulados por secretagogos, además, se esclareció la respuesta fúndica a un fármaco inhibidor de la secreción de ácido. Nuestros datos demuestran que la región fúndica es una zona de secreción activa en el estómago y contiene una ATPasa gástrica de H^+, K^+ que puede ser estimulada 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 fundus.

Referencias:

Primer grupo

1. Hersey SJ, Sachs G. *Gastric acid secretion. Physiol Rev* 1995; 75:155-189.

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.

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.

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.

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.

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.

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.

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.

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.

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.

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 pylorinegative subjects: effects of different regimens. J Gastroenterol* 2003; 38:830-835.

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.

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.

24. Tytgat GN. *Shortcomings of the first-generation proton pump inhibitors. Eur J Gastroenterol Hepatol* 2001; 13 Supl. 1:S29-S33.

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.

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, Newberne 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.

29. Ng WL, Fong LY, Ma L, Newberne PM. *Dietary zinc deficiency and tumorigenesis: a scanning electron microscope study. J Electron Microsc* (Tokyo) 1984; 33:344-348.

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.

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.

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.

37. McDaniel N, Lytle C. P*arietal cells express high levels of Na-K-2Cl cotransporter on migrating into the gastric gland neck. Am J Physiol* 1999; 276:G1273-G1278.

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.

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.

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.

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.

Segundo grupo de referencias

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

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* Supl. 1990; 732:3-8.

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.

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.

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.

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.

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.

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.

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.

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 mealstimulated gastric acid secretion. Aliment Pharmacol Ther* 1992; 6:187-193.

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* USA 2001; 98:9425-9430.

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.

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.

23a. Waisbren SJ, Geibel JP, Modlin IM, Boron WF. *Unusual permeability properties of gastric gland cells. Nature* 1994; 368:332-335.

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.

25a. 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.

26a. Sachs G, Scott D, Reuben M. *Omeprazole and the gastric mucosa. Digestion* 1990; 47 Supl. 1:35-38.

27a. Sachs G, Wallmark B. *The gastric H+,K+-ATPase: the site of action of omeprazole. Scand J Gastroenterol* Supl. 1989; 166:3-11.

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.

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.

30a. Singh J. *Prostaglandin release from rat stomach following vagal stimulation or administration of acetylcholine. Eur J Pharmacol* 1980; 65:39-48.

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.

32a. Amdrup E. *The surgical treatment of duodenal ulcer. Schweiz Med Wochenschr* 1979; 109:583-585.

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 Supl. 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 adaptada para ser administrada al estómago de un paciente que comprende una cantidad eficaz de al menos una sal de cinc farmacéuticamente aceptable en combinación con una cantidad eficaz de un agente anti-*H. pylori*, opcionalmente en combinación con un portador, aditivo o excipiente farmacéuticamente aceptable, para su uso para aumentar con rapidez el pH de los jugos gástricos en el estómago de un paciente en necesidad del mismo hasta al menos 3,0 en un periodo no superior a una hora después de la administración.

2. La composición para su uso según la reivindicación 1, en la que dicho agente anti-*H. pylori* se selecciona entre el grupo que consiste en amoxicilina, claritromicina (biaxin), metronidazol (flagyl), tetraciclina y mezclas de los mismos.

3. La composición para su uso según cualquiera de las reivindicaciones 1-2, en la que dicha sal de cinc es una mezcla de al menos dos sales de cinc.

4. La composición para su uso según la reivindicación 3, en la que dicha sal de cinc se selecciona entre el grupo que consiste en acetato de cinc, cloruro de cinc, gluconato de cinc, ascorbato de cinc, butirato de cinc, carbonato de cinc, citrato de cinc, yoduro de cinc, sulfato 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 aminoácido de cinc y mezclas de los mismos.

5. La composición según cualquiera de las reivindicaciones 1-4, para su uso en el tratamiento de una úlcera secundaria causada por una infección por *H. pylori*, en la que dicha sal de cinc se contiene en una cantidad eficaz para elevar el pH de los jugos gástricos de un paciente al que se le administra dicha composición hasta al menos 3,5 en un periodo no superior a 30 minutos.

6. La composición según cualquiera de las reivindicaciones 1-5, para su uso en el tratamiento de un paciente que padece una patología o enfermedad seleccionadas entre el grupo que consiste en enfermedad por reflujo gastroesofágico (ERGE), enfermedad por reflujo no erosiva (ERNE), síndrome de Zollinger-Ellison (síndrome de ZE), enfermedad de úlcera, y cáncer gástrico.

7. La composición para su uso según la reivindicación 6, en la que la 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 4,0 en un periodo no superior a 20 minutos después de la administración.

8. La composición para su uso según cualquiera de las reivindicaciones 1-7, en la que dicha sal de cinc se selecciona entre el 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, quelato aminoácido de cinc o mezclas de los mismos.

9. La composición para su uso según cualquiera de las reivindicaciones 1-8, en la que dicha composición es un líquido.

Figuras 1A-E

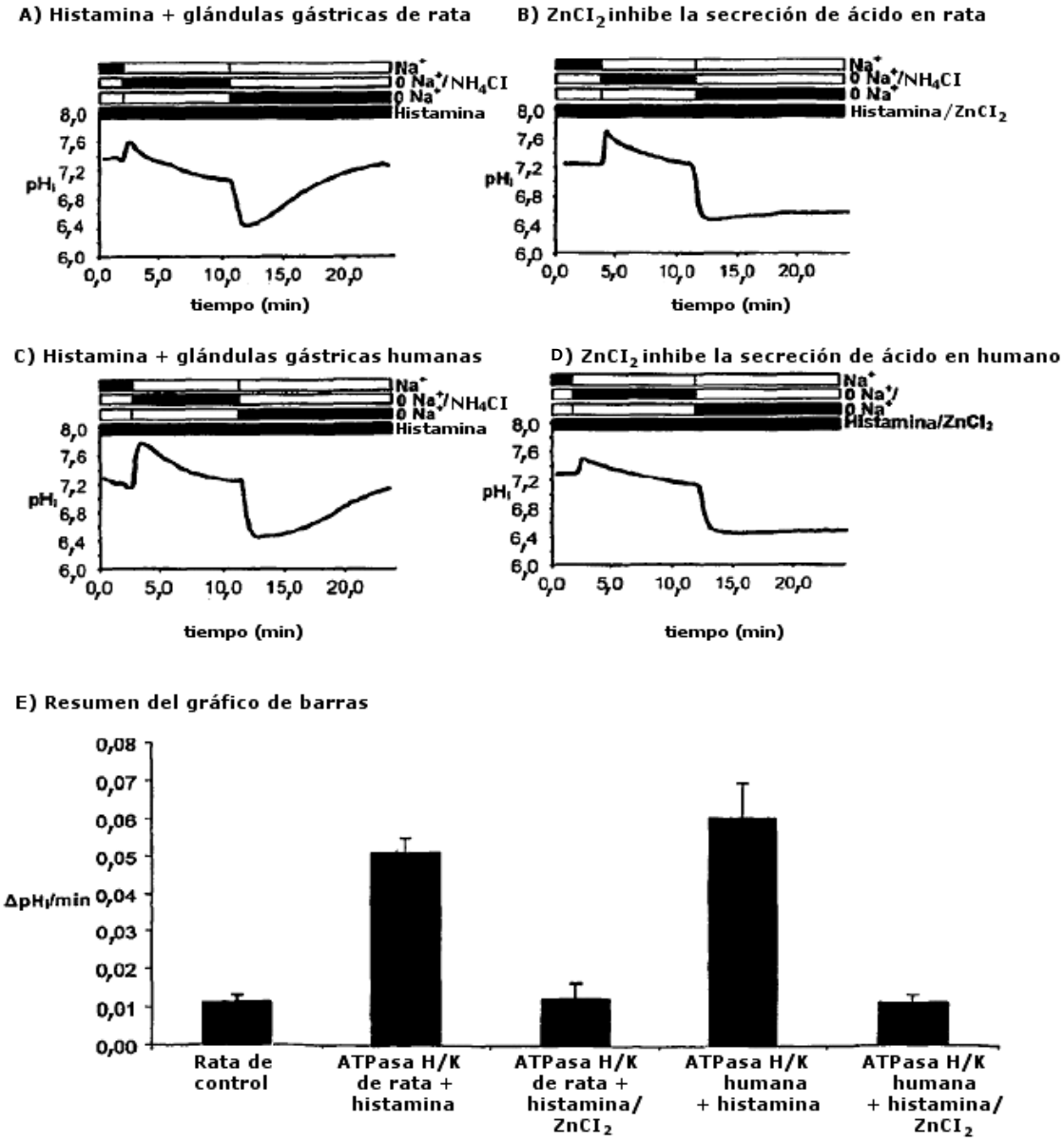

A) Histamina + glándulas gástricas de rata
B) ZnCl2 inhibe la secreción de ácido en rata
C) Histamina + glándulas gástricas humanas
D) ZnCl2 inhibe la secreción de ácido en humano
Na+
0 Na+/NH4Cl
0 Na+
Histamina
Histamina/ZnCl2
pHi
tiempo (min)
E) Resumen del gráfico de barras
ΔpHi/min
Rata de control
ATPasa H/K de rata + histamina
ATPasa H/K de rata + histamina/ ZnCl2
ATPasa H/K humana + histamina
ATPasa H/K humana + histamina/ ZnCl2

Figura 2

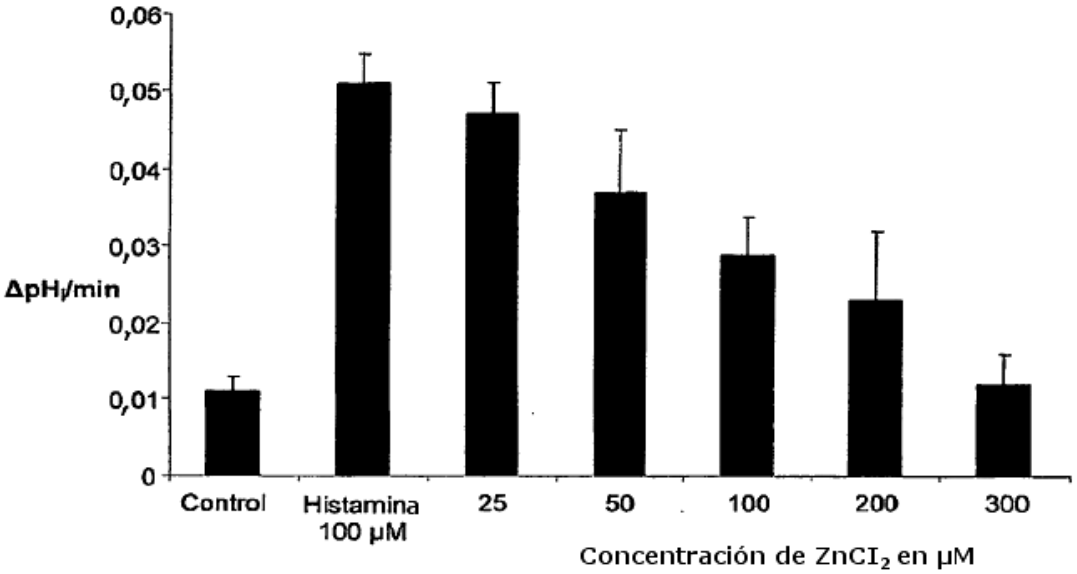

0,06
0,05
0,04
0,03
ΔpHi/min
0,02
0,01
0
Control
Histamina 100 µM
25
50
100
200
300
Concentración de ZnCI2 en µM

Figura 3

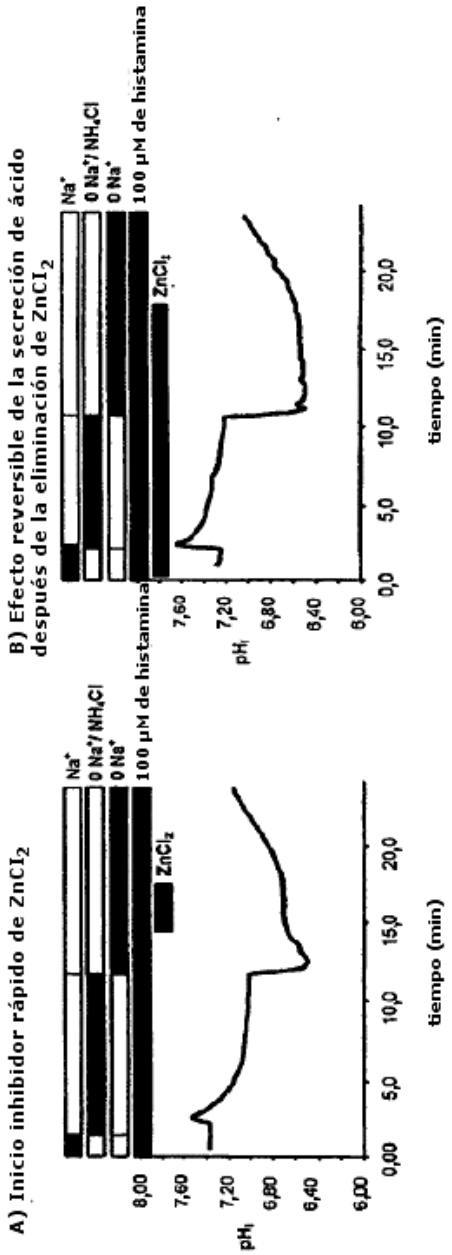

A) Inicio inhibidor rápido de $ZnCl_2$
Na+
0 Na+/ NH_4Cl
0 Na+
100 µM de histamina
$ZnCl_2$
8,00
7,60
7,20
6,80
6,40
6,00
pH_i
0,00
5,0
10,0
15,0
20,0
tiempo (min)
B) Efecto reversible de la secreción de ácido después de la eliminación de $ZnCl_2$
Na+
0 Na+/ NH_4Cl
0 Na+
100 µM de histamina
$ZnCl_2$
7,60
7,20
6,80
6,40
6,00
pH_i
0,0
5,0
10,0
15,0
20,0
tiempo (min)

Figura 4

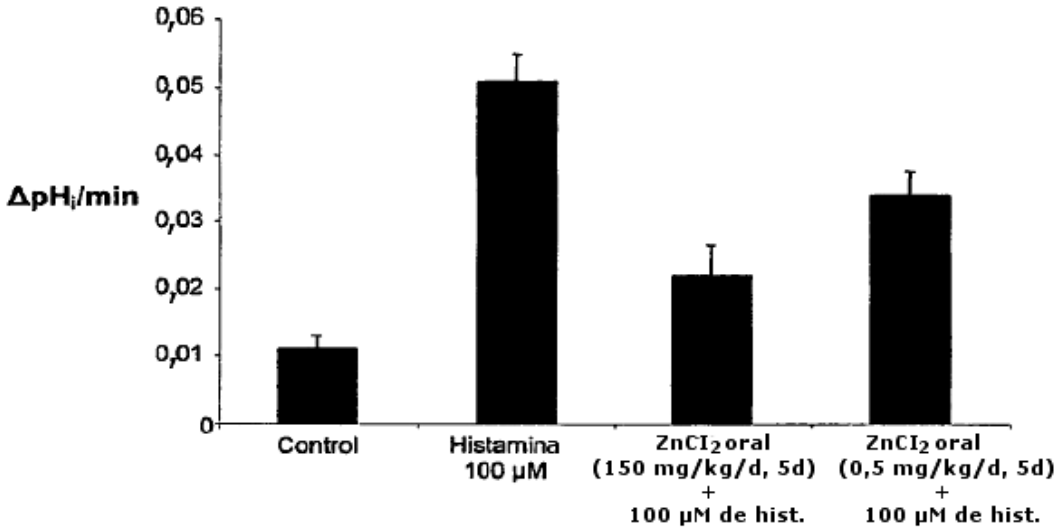

0,06
0,05
0,04
ΔpHi/min
0,03
0,02
0,01
0
Control
Histamina
100 µM
ZnCI2 oral
(150 mg/kg/d, 5d)
+
100 µM de hist.
ZnCI2 oral
(0,5 mg/kg/d, 5d)
+
100 µM de hist.

Figura 5

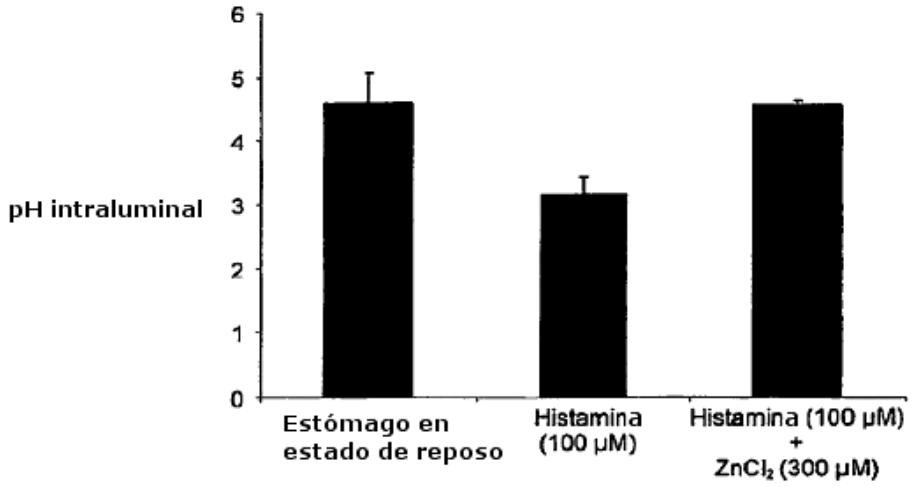
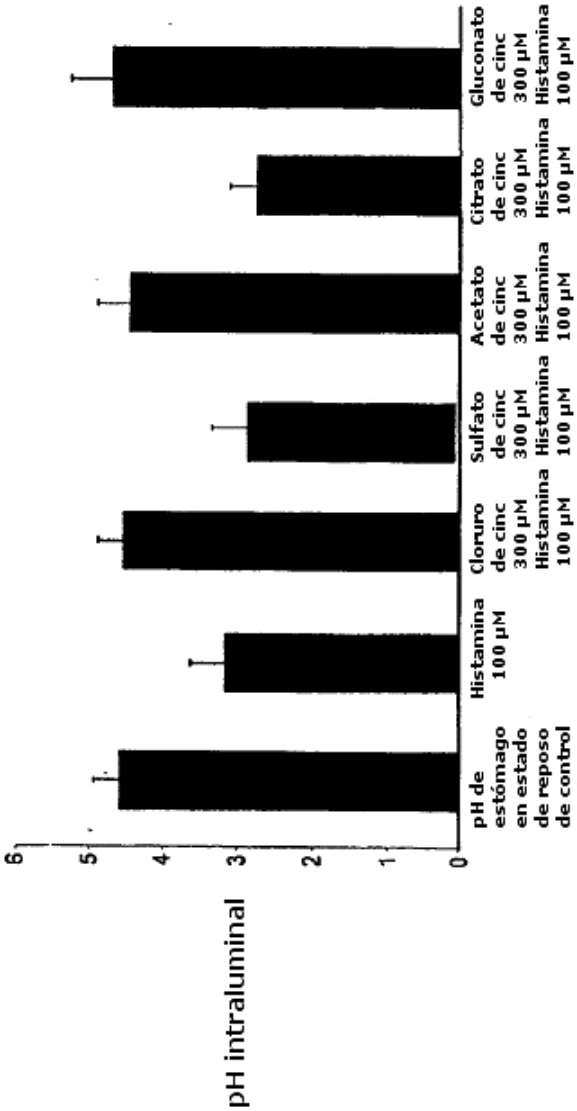
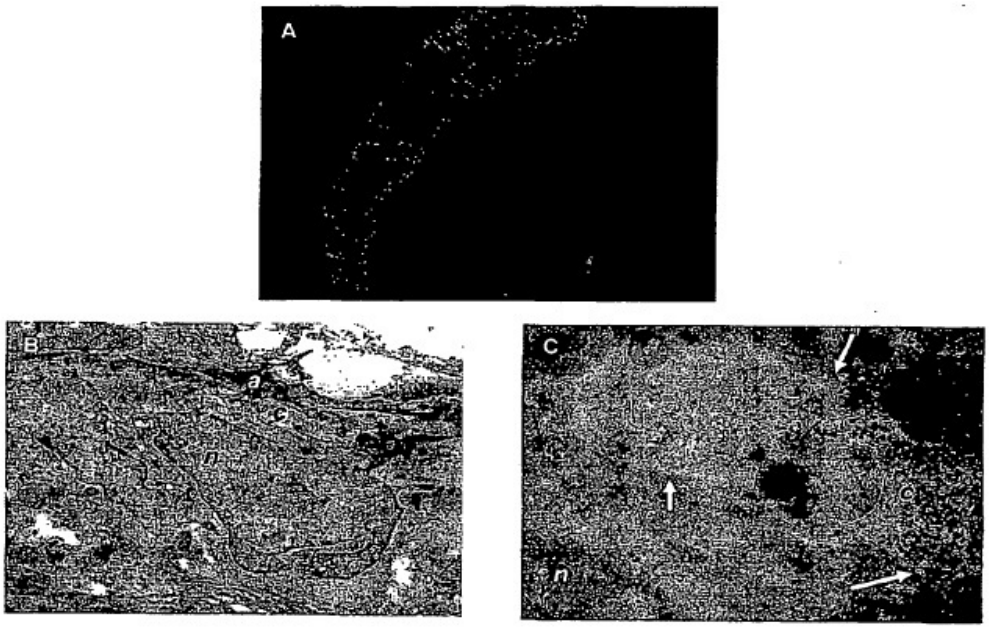

pH intraluminal
6
5
4
3
2
1
0
Estómago en estado de reposo
Histamina (100 μM)
Histamina (100 μM) + ZnCl₂ (300 μM)

Figura 6


pH intraluminal
6
5
4
3
2
1
0
pH de estómago en estado de reposo de control
Histamina 100 µM
Cloruro de cinc 300 µM Histamina 100 µM
Sulfato de cinc 300 µM Histamina 100 µM
Acetato de cinc 300 µM Histamina 100 µM
Citrato de cinc 300 µM Histamina 100 µM
Gluconato de cinc 300 µM Histamina 100 µM

Figuras 7A-C



Figuras 8A-D

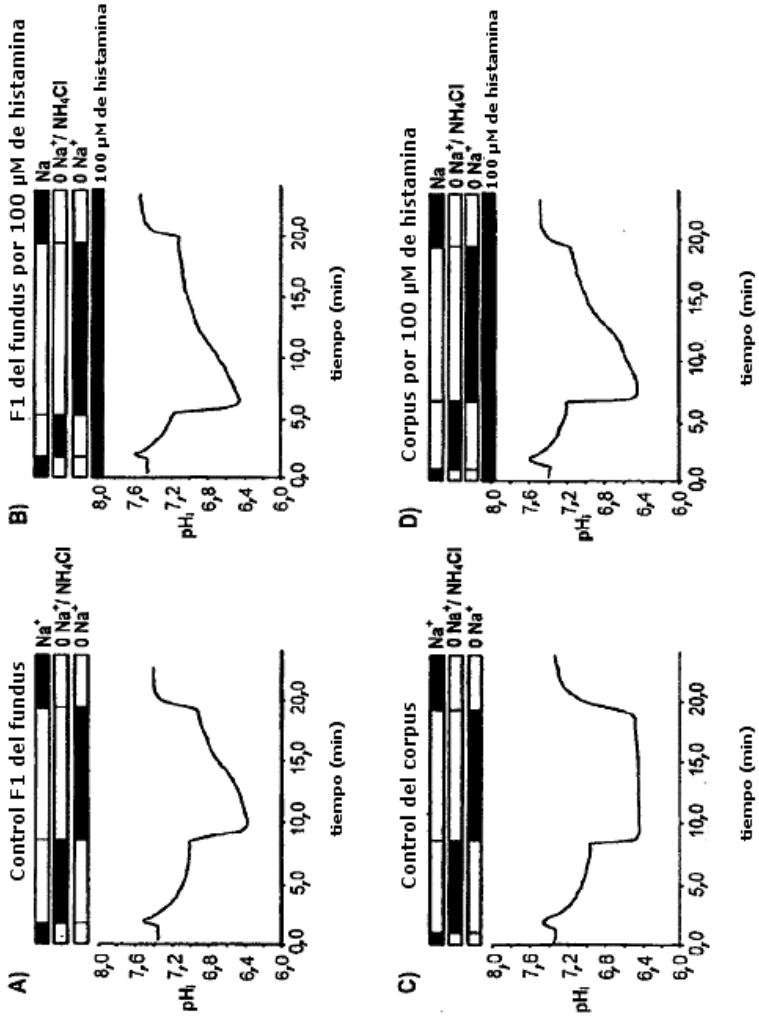
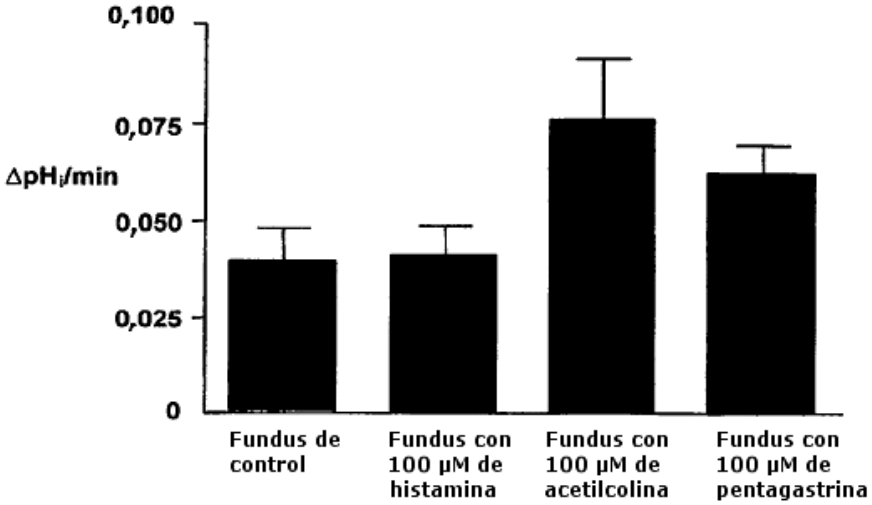
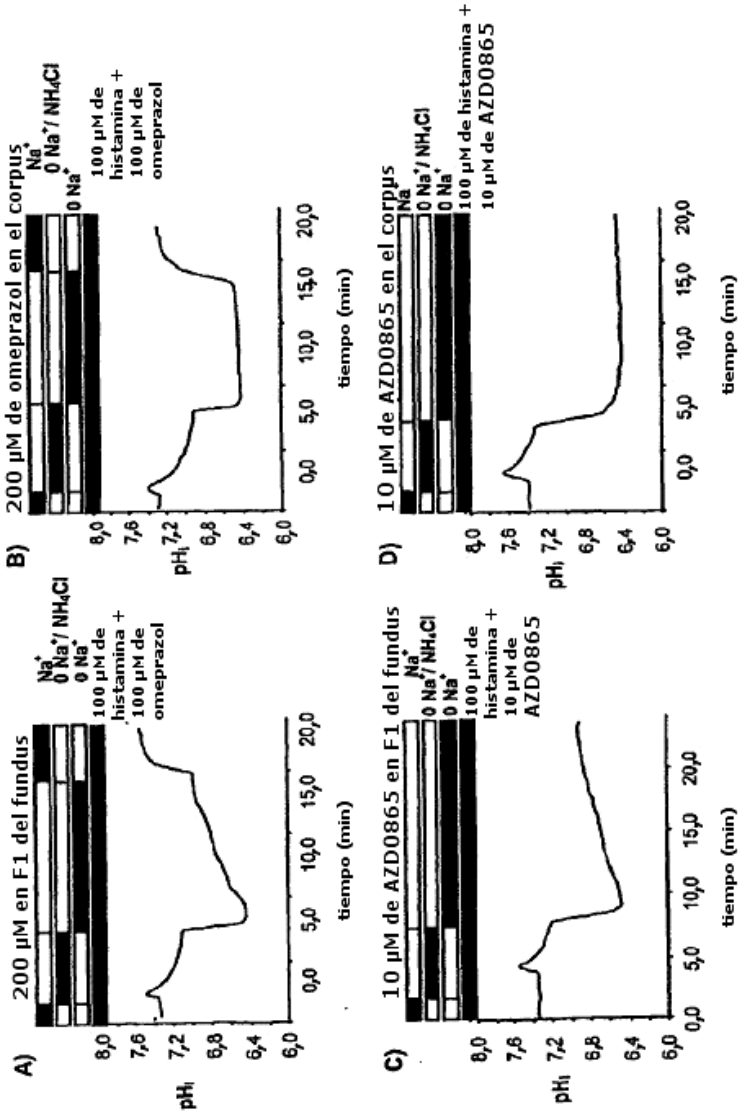

A)
Control F1 del fundus
Na+
0 Na+/ NH4Cl
0 Na+
pHi
8,0
7,6
7,2
6,8
6,4
6,0
0,0
5,0
10,0
15,0
20,0
tiempo (min)
B)
F1 del fundus por 100 µM de histamina
Na
0 Na+/ NH4Cl
0 Na+
100 µM de histamina
C)
Control del corpus
D)
Corpus por 100 µM de histamina

Figura 9


0,100
0,075
ΔpHi/min
0,050
0,025
0
Fundus de control
Fundus con 100 μM de histamina
Fundus con 100 μM de acetilcolina
Fundus con 100 μM de pentagastrina

Figuras 10A-D