

PCT ORGANIZACION MUNDIAL DE LA PROPIEDAD INTELECTUAL
 Oficina Internacional
**SOLICITUD INTERNACIONAL PUBLICADA EN VIRTUD DEL TRATADO DE COOPERACION
 EN MATERIA DE PATENTES (PCT)**

(51) Clasificación Internacional de Patentes ⁶ : G01N 33/497, C12Q 1/58, A61B 5/083	A1	(11) Número de publicación internacional: WO 98/21579 (43) Fecha de publicación internacional: 22 de Mayo de 1998 (22.05.98)		
<table style="width: 100%; border: none;"> <tr> <td style="width: 50%; vertical-align: top; border-right: 1px solid black; padding: 5px;"> (21) Solicitud internacional: PCT/ES97/00184 (22) Fecha de la presentación internacional: 21 de Julio de 1997 (21.07.97) (30) Datos relativos a la prioridad: P 9602383 12 de Noviembre de 1996 ES (12.11.96) (71) Solicitante (para todos los Estados designados salvo US): ISOMED, S.L. [ES/ES]; Alberto Alcocer, 46 Bajo b, E-28016 Madrid (ES). (72) Inventor; e (75) Inventor/solicitante (sólo US): BECERRO DE BENGEOA VALLEJO, Ana [ES/ES]; Alberto Alcocer, 46 Bajo B, E-28016 Madrid (ES). (74) Mandatario: FERNANDEZ PRIETO, Angel; Calle Recoletos, 4 4º Izq., E-28001 Madrid (ES). </td> <td style="width: 50%; vertical-align: top; padding: 5px;"> (81) Estados designados: AT, AU, BG, BR, CA, CH, CN, CU, CZ, DE, DK, ES, FI, GB, HU, IL, IS, JP, KR, LU, MX, NO, NZ, PL, PT, RO, RU, SE, SG, SI, SK, TR, UA, US, UZ, VN, Patente europea (AT, BE, CH, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE). Publicada <i>Con informe de búsqueda internacional.</i> <i>Con reivindicaciones modificadas y declaración.</i> </td> </tr> </table>			(21) Solicitud internacional: PCT/ES97/00184 (22) Fecha de la presentación internacional: 21 de Julio de 1997 (21.07.97) (30) Datos relativos a la prioridad: P 9602383 12 de Noviembre de 1996 ES (12.11.96) (71) Solicitante (para todos los Estados designados salvo US): ISOMED, S.L. [ES/ES]; Alberto Alcocer, 46 Bajo b, E-28016 Madrid (ES). (72) Inventor; e (75) Inventor/solicitante (sólo US): BECERRO DE BENGEOA VALLEJO, Ana [ES/ES]; Alberto Alcocer, 46 Bajo B, E-28016 Madrid (ES). (74) Mandatario: FERNANDEZ PRIETO, Angel; Calle Recoletos, 4 4º Izq., E-28001 Madrid (ES).	(81) Estados designados: AT, AU, BG, BR, CA, CH, CN, CU, CZ, DE, DK, ES, FI, GB, HU, IL, IS, JP, KR, LU, MX, NO, NZ, PL, PT, RO, RU, SE, SG, SI, SK, TR, UA, US, UZ, VN, Patente europea (AT, BE, CH, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE). Publicada <i>Con informe de búsqueda internacional.</i> <i>Con reivindicaciones modificadas y declaración.</i>
(21) Solicitud internacional: PCT/ES97/00184 (22) Fecha de la presentación internacional: 21 de Julio de 1997 (21.07.97) (30) Datos relativos a la prioridad: P 9602383 12 de Noviembre de 1996 ES (12.11.96) (71) Solicitante (para todos los Estados designados salvo US): ISOMED, S.L. [ES/ES]; Alberto Alcocer, 46 Bajo b, E-28016 Madrid (ES). (72) Inventor; e (75) Inventor/solicitante (sólo US): BECERRO DE BENGEOA VALLEJO, Ana [ES/ES]; Alberto Alcocer, 46 Bajo B, E-28016 Madrid (ES). (74) Mandatario: FERNANDEZ PRIETO, Angel; Calle Recoletos, 4 4º Izq., E-28001 Madrid (ES).	(81) Estados designados: AT, AU, BG, BR, CA, CH, CN, CU, CZ, DE, DK, ES, FI, GB, HU, IL, IS, JP, KR, LU, MX, NO, NZ, PL, PT, RO, RU, SE, SG, SI, SK, TR, UA, US, UZ, VN, Patente europea (AT, BE, CH, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE). Publicada <i>Con informe de búsqueda internacional.</i> <i>Con reivindicaciones modificadas y declaración.</i>			
(54) Title: METHOD AND KIT FOR DETECTING <i>HELICOBACTER PYLORI</i> (54) Título: METODO Y KIT PARA LA DETECCION DE <i>HELICOBACTER PYLORI</i> (57) Abstract The method is based on the assay of breath with urea marked with carbon-13 and which comprises (a) administering to the patient an aqueous solution of citric acid having a pH comprised between 2 and 2.5; (b) collecting a sample of the patient breath in order to determine the basal content of carbon-13; (c) administering to the patient an appropriate amount of urea marked with carbon-13; (d) collecting a sample of breath from the patient in order to determine the content of carbon-13 after administering the marked urea; and (e) analyzing the collected breath samples in order to determine the content of carbon-13 before and after the administration of urea marked with carbon-13. The kit comprises a container for the citric acid, another container for the urea marked with carbon-13, test tubes intended to receive the patient breath and means to blow the breath into the test tubes. (57) Resumen El método se basa en el ensayo del aliento con urea marcada con carbono-13 y que comprende (a) administrar al paciente una solución acuosa de ácido cítrico con un pH comprendido entre 2 y 2,5; (b) recoger una muestra del aliento del paciente para determinar el contenido basal en carbono-13; (c) administrar al paciente una cantidad apropiada de urea marcada con carbono-13; (d) recoger una muestra del aliento del paciente para determinar el contenido en carbono-13 post-administración de la urea marcada; y (e) analizar las muestras de aliento recogidas para determinar el contenido en carbono-13 antes y después de la administración de urea marcada con carbono-13. El kit contiene un recipiente para el ácido cítrico, otro para la urea marcada con carbono-13, unos exeteiners destinados a contener el aliento del paciente, y unos medios para soplar el aliento dentro de los exeteiners.				

UNICAMENTE PARA INFORMACION

Códigos utilizados para identificar a los Estados parte en el PCT en las páginas de portada de los folletos en los cuales se publican las solicitudes internacionales en el marco del PCT.

AL	Albania	ES	España	LS	Lesotho	SI	Eslovenia
AM	Armenia	FI	Finlandia	LT	Lituania	SK	Eslovaquia
AT	Austria	FR	Francia	LU	Luxemburgo	SN	Senegal
AU	Australia	GA	Gabón	LV	Letonia	SZ	Swazilandia
AZ	Azerbaiyán	GB	Reino Unido	MC	Mónaco	TD	Chad
BA	Bosnia y Herzegovina	GE	Georgia	MD	República de Moldova	TG	Togo
BB	Barbados	GH	Ghana	MG	Madagascar	TJ	Tayikistán
BE	Bélgica	GN	Guinea	MK	ExRepública Yugoslava de	TM	Turkmenistán
BF	Burkina Faso	GR	Grecia		Macedonia	TR	Turquía
BG	Bulgaria	HU	Hungría	ML	Malí	TT	Trinidad y Tabago
BJ	Benin	IE	Irlanda	MN	Mongolia	UA	Ucrania
BR	Brasil	IL	Israel	MR	Mauritania	UG	Uganda
BY	Belarús	IS	Islandia	MW	Malawi	US	Estados Unidos de América
CA	Canadá	IT	Italia	MX	México	UZ	Uzbekistán
CF	República Centroafricana	JP	Japón	NE	Níger	VN	Viet Nam
CG	Congo	KE	Kenya	NL	Países Bajos	YU	Yugoslavia
CH	Suiza	KG	Kirguistán	NO	Noruega	ZW	Zimbabwe
CI	Côte d'Ivoire	KP	República Popular	NZ	Nueva Zelandia		
CM	Camerún		Democrática de Corea	PL	Polonia		
CN	China	KR	República de Corea	PT	Portugal		
CU	Cuba	KZ	Kazakstán	RO	Rumania		
CZ	República Checa	LC	Santa Lucía	RU	Federación de Rusia		
DE	Alemania	LI	Liechtenstein	SD	Sudán		
DK	Dinamarca	LK	Sri Lanka	SE	Suecia		
EE	Estonia	LR	Liberia	SG	Singapur		

METODO Y KIT PARA LA DETECCION DE *Helicobacter pylori*

CAMPO DE LA INVENCION

La invención se refiere a un método para la detección de
5 *Helicobacter pylori* basado en el test del aliento con urea
marcada con ^{13}C , y a un kit para la realización de dicho
método. Este método puede ser utilizado en el diagnóstico de
enfermedades gastroduodenales relacionadas con *Helicobacter*
pylori.

ANTECEDENTES DE LA INVENCION

El *Helicobacter pylori* es un bacilo Gram negativo aislado
por primera vez en el año 1982 y cuya presencia en el organismo
está relacionada con enfermedades gastroduodenales. En
15 concreto, este bacilo es el principal causante del desarrollo
de la úlcera péptica duodenal así como el principal agente
causal de las gastritis crónicas, donde aparece en el 90-95%
de los pacientes, detectándose también su presencia en
pacientes con úlcera duodenal, úlcera gástrica, dispepsia,
20 linfomas "no Hodgkins" gástricos e incluso en el cáncer de
estómago.

Con el fin de establecer un tratamiento correcto y eficaz
de una posible enfermedad gastroduodenal es necesario efectuar
un diagnóstico preciso y fiable de la misma. Algunos métodos
25 para el diagnóstico de enfermedades gastroduodenales se basan
en la detección de *H. pylori* mediante unos métodos que pueden
agruparse en métodos invasivos y en métodos no invasivos. Los
métodos invasivos requieren la realización de una endoscopia
en el paciente y la posterior realización de estudios
30 histológicos, cultivos o el test rápido de la ureasa en
muestras de mucosa gástrica recogidas por biopsia endoscópica.
Aunque estos métodos tienen una sensibilidad y especificidad
adecuada, son caros, requieren personal cualificado para su
realización y ocasionan molestias al paciente quien, a veces,
35 los rechaza. Entre los métodos no invasivos se encuentran los

métodos serológicos y el test del aliento con urea. Los métodos serológicos, en general, presentan una menor sensibilidad y especificidad que el test del aliento con urea y además solo detectan anticuerpos de *H. pylori* y no la presencia del mismo como lo hace el test del aliento con urea marcada con ^{13}C . La prueba serológica no es fiable para comprobar la eficacia del tratamiento erradicador porque el descenso significativo del título de anticuerpos es apreciable a partir del sexto mes post-erradicación sin que haya seguridad hasta el decimoctavo mes post-erradicación, mientras que con el test del aliento se puede demostrar con seguridad la eliminación de *H. pylori* con el tratamiento a partir del primer mes de finalizado el mismo.

El test del aliento con urea está basado en el hecho de que se observa una actividad ureasa fuera de lo normal en numerosas enfermedades gastroduodenales, en particular, en las relacionadas con la presencia de *H. pylori*, por lo que la detección de una actividad ureasa en cantidades anormales es indicativo de la existencia de *H. pylori* y, por tanto, de una posible patología gastroduodenal. La ureasa (urea amido-hidrolasa) es una enzima que cataliza la hidrólisis de la urea (carbonildiamida) en carbonato amónico que se descompone en dióxido de carbono y amoníaco. Para la realización del test del aliento con urea al paciente se le administra urea, marcada opcionalmente con carbono-13 (^{13}C), con carbono-14 (^{14}C), o bien con nitrógeno-15 (^{15}N), y posteriormente se analiza el aliento del paciente para detectar la presencia de los productos resultantes de la hidrólisis de la urea marcada. El dióxido de carbono marcado con carbono-13 o con carbono-14, producido por la hidrólisis de la urea marcada con tales isótopos, es absorbido por el sistema sanguíneo, transportado a los pulmones y finalmente espirado, por lo que puede ser detectado en el aliento del paciente.

La patente norteamericana US 4.830.010, a nombre de B.J. Marshall, describe un método para el diagnóstico de enfermedades gastroduodenales basado en el test del aliento con

urea, que presenta numerosos inconvenientes, entre los que se encuentran:

- el empleo de soluciones previas a la administración de la urea que no reproducen el pH del antro estomacal (entre 2 y 2,3), adecuado para mantener al *H. pylori* en su entorno, por lo que los resultados obtenidos presentan una fiabilidad y seguridad dudosa, y, además, tales soluciones habitualmente provocan trastornos gastrointestinales en el paciente, tales como diarrea, pesadez de estómago, vómitos, etc.;
- el empleo de urea marcada con carbono-14, un isótopo radiactivo, encarece el método y limita considerablemente su ámbito de aplicación, pues no debe aplicarse en embarazadas ni en niños, ni se puede repetir la prueba en el mismo paciente más de dos o tres veces debido a su radiactividad;
- la dosificación de la urea marcada, en función del peso del paciente, lleva consigo una cierta complejidad en la realización del ensayo así como un mayor consumo de reactivo con su consiguiente repercusión no sólo a nivel económico sino también a nivel de la posible existencia de un cierto riesgo de toxicidad y/o efectos adversos en el paciente;
- el paciente debe permanecer en posición horizontal durante la realización del ensayo, lo que puede ocasionar molestias al paciente; y
- la recogida del aliento del paciente se realiza en bolsas de plástico mediante el empleo de boquillas de plástico y posteriormente el aire se retira de las bolsas mediante el empleo de jeringuillas y se introduce en un Vacutainer® (tubo de cristal provisto de tapón de goma y a presión, que puede desarrollar a largo plazo interferencias de los gases producidos con el aire del paciente recogido en el tubo). El elevado número de componentes necesarios para recoger el aliento del paciente no sólo complica la realización del ensayo sino que además, incrementa el coste del mismo pues al coste de los componentes se debe unir el del tratamiento aplicable a los residuos generados con el fin de evitar problemas medio-

ambientales.

Por tanto, el método descrito en la patente norteamericana US 4.830.010 es un método general, poco concreto, de fiabilidad y reproducibilidad dudosa, tiene un ámbito de aplicación limitada, es complicado, caro, molesto e incómodo para el paciente.

La presente invención proporciona un método y un kit para la realización de un ensayo del aliento con urea marcada con carbono-13 para la detección de *H. pylori* que supera los inconvenientes previamente mencionados. En particular, la invención proporciona un ensayo para la detección de *H. pylori* sencillo, fácil de realizar, fiable, reproducible, de amplia aplicación, simple, económico, seguro y cómodo para el paciente.

BREVE DESCRIPCION DE LAS FIGURAS

La Figura 1 muestra el dibujo de un exeteiner del tipo utilizado en el kit objeto de esta invención, en el que se muestran, separados, los distintos componentes del exeteiner.

La Figura 2 muestra el dibujo de un exeteiner del tipo mostrado en la Figura 1, con todos sus componentes acoplados.

DESCRIPCION DETALLADA DE LA INVENCION

1. Método para la detección de *Helicobacter pylori*

En un primer objeto de esta invención, se proporciona un método para la detección de *Helicobacter pylori*, basado en el ensayo del aliento con urea marcada con carbono-13, que comprende las etapas generales de:

- administrar al paciente una cantidad apropiada de urea marcada con carbono-13; y

- determinar el contenido en carbono-13 a partir de muestras de aliento del paciente antes y después de la administración de urea marcada con carbono-13;

que se caracteriza porque:

- se administra al paciente una solución acuosa de ácido

cítrico que comprende ácido cítrico en una cantidad suficiente para dar un pH comprendido entre 2 y 2,5;

- el contenido en carbono-13 en la muestra de aliento del paciente antes de la administración de urea marcada con carbono-13 se puede realizar antes de, o alternativamente después de, administrar al paciente dicha solución acuosa de ácido cítrico; y

- la urea marcada con carbono-13 puede ser administrada al paciente después de, o simultáneamente junto con, la administración de dicha solución acuosa de ácido cítrico.

Una primera alternativa de realización del método para la detección de *Helicobacter pylori*, basado en el ensayo del aliento con urea marcada con carbono-13, proporcionado por esta invención, implica la administración al paciente de la solución acuosa de ácido cítrico antes de determinar el contenido basal en carbono-13 en la muestra de aliento y antes de administrar la urea marcada con carbono-13, y comprende las etapas de:

a) administrar al paciente una solución acuosa de ácido cítrico que comprende ácido cítrico en una cantidad suficiente para dar un pH comprendido entre 2 y 2,5;

b) recoger una muestra del aliento del paciente con el fin de determinar el contenido basal en carbono-13;

c) administrar al paciente una cantidad apropiada de urea marcada con carbono-13;

d) recoger una muestra del aliento del paciente con el fin de determinar el contenido en carbono-13 tras la administración de la urea marcada con carbono-13; y

e) analizar las muestras de aliento recogidas para determinar el contenido en carbono-13 antes y después de la administración de urea marcada con carbono-13.

La solución acuosa de ácido cítrico comprende una disolución en agua de ácido cítrico en cantidad suficiente para dar un pH comprendido entre 2 y 2,5. Normalmente, ese pH se alcanza con una disolución acuosa de ácido cítrico a una concentración de, aproximadamente, 0,021 g/ml. El empleo de

esta solución cumple dos objetivos, por una parte, contribuye al retardamiento del vaciamiento gástrico, con lo que se consigue que la urea marcada con carbono-13 permanezca más tiempo en el antro estomacal, y, por otra parte, al rendir un pH como el del antro estomacal, permite que la colonia de *H. pylori* pueda ejercer con mayor seguridad su actividad ureasa hidrolizando la urea en dióxido de carbono y urea. El empleo de esta solución es fundamental y crítico para que el ensayo sea significativamente eficaz, sensible, fiable y reproducible, y constituye uno de los aspectos esenciales de esta invención.

La solución acuosa de ácido cítrico puede contener, además, unos aditivos alimentarios o farmacéuticos aceptables, que mejoren sus propiedades y características organolépticas tales como, edulcorantes, aromatizantes, colorantes y conservantes.

Dicha solución acuosa de ácido cítrico puede obtenerse fácilmente por disolución de los componentes en la cantidad apropiada de agua. En una realización particular y preferida del método objeto de esta invención, la solución acuosa de ácido cítrico se obtiene disolviendo una cantidad comprendida entre 2 y 5 g de ácido cítrico en la cantidad apropiada de agua.

En otra realización particular del método objeto de esta invención se contempla la posibilidad de utilizar zumos de frutas, por ejemplo, de cítricos (naranja, limón, pomelo, etc.) como fuente de dicha solución acuosa de ácido cítrico siempre y cuando dicho zumo tenga un pH comprendido entre 2 y 2,5. En caso de que el zumo no tuviera dicho pH se podrían añadir los acidulantes alimentarios o farmacéuticos aceptables en la cantidad necesaria para alcanzar dicho pH.

El empleo de una solución acuosa de ácido cítrico que comprende ácido cítrico en cantidad suficiente para dar un pH comprendido entre 2 y 2,5, opcionalmente junto con otros aditivos alimentarios o farmacéuticos aceptables, en la realización de un método de detección de *H. pylori*, basado en

el ensayo del aliento con urea marcada con carbono-13, constituye un objeto adicional de esta invención.

Después de la administración de la solución acuosa de ácido cítrico se recogen muestras del aliento del paciente en
5 unos recipientes adecuados, tal como unos exeteiners, al objeto de determinar el contenido basal en carbono-13. Como es conocido, el carbono-13 es un isótopo que normalmente está presente en cantidades muy pequeñas en productos de origen natural, tal como la urea procedente del metabolismo proteico.
10 En general, los átomos de carbono presentes en una muestra de urea de origen natural comprenden mayoritariamente el isótopo carbono-12 y una muy pequeña cantidad del isótopo carbono-13 (aproximadamente el 1,1%). Normalmente las muestras se recogen por duplicado al cabo de unos 10 minutos tras la administración
15 de la solución acuosa de ácido cítrico. Los recipientes adecuados son, preferiblemente, unos exeteiners del tipo mostrado en las Figuras 1 y 2, cuyas características se mencionan con más detalle al tratar el kit proporcionado por esta invención. En una realización particular y preferida del
20 método objeto de esta invención, el paciente introduce su aliento en los exeteiners por soplado con ayuda de una pajita previamente introducida en ellos y posteriormente se cierra el exeteiner por medio de su tapón.

A continuación, se administra al paciente una cantidad
25 apropiada de urea marcada con carbono-13. El término "cantidad apropiada" se refiere a una cantidad segura y efectiva de urea marcada con carbono-13 que es suficiente para producir un nivel detectable de dióxido de carbono marcado con carbono-13 sin provocar efectos adversos, tales como toxicidad, o reacciones
30 alérgicas, en el paciente.

La urea marcada con carbono-13 se administra, normalmente, en forma de solución acuosa tras su disolución en agua. En una realización particular del método objeto de esta invención, se disuelve una cantidad de urea marcada con carbono-13
35 comprendida entre 50 y 100 mg en una cantidad de agua

comprendida entre 20 y 50 ml. En una realización preferida se administra al paciente una solución acuosa de urea marcada con carbono-13 a una concentración comprendida entre 1 y 4,5 mg/ml. Alternativamente, se puede administrar la urea marcada con carbono-13 en forma de comprimido, opcionalmente dispersable, que contiene la cantidad apropiada de urea marcada con carbono-13.

Esta dosificación, independiente del peso, constituye una simplificación operativa así como un importante ahorro económico pues se reduce el consumo de reactivo ya que, por ejemplo, para realizar el ensayo proporcionado por esta invención en un adulto de 70 kg de peso se pueden emplear 100 mg de urea marcada con carbono-13, mientras que en otros ensayos del estado de la técnica, en los que la dosificación es función del peso corporal (típicamente 2 mg/kg de peso corporal), para un adulto de 70 kg se necesitan 140 mg de urea marcada con carbono-13. El empleo de una menor cantidad de urea marcada con carbono-13 provoca un menor riesgo de toxicidad y de posibles efectos adversos en el paciente. Todo esto hace que el ensayo de la invención sea más simple, económico y seguro que otros ensayos similares conocidos. Por otra parte, el empleo de urea marcada con carbono-13 presenta la ventaja de que, al no ser radiactiva, puede administrarse tanto a adultos como a niños e, incluso, a mujeres embarazadas, y, además, se puede repetir cuantas veces sean necesarias en un mismo paciente. Adicionalmente, su realización no requiere de instalaciones especiales y las muestras pueden enviarse a otros centros para su lectura, por correo ordinario o por cualquier otro medio, sin necesidad de unos cuidados especiales.

La urea marcada con carbono-13 es un producto comercial, disponible en forma de polvo, comprimidos y otras formas de presentación, fabricado, por ejemplo, por Cambridge Isotope Laboratories, Inc.

Después de la administración de la solución acuosa de urea marcada con carbono-13 se recogen muestras del aliento del

paciente en unos recipientes adecuados, tal como los exeteiners antes citados, con el fin de determinar el contenido en carbono-13 post-administración de la urea marcada con dicho isótopo. En general, las muestras se recogen por duplicado
5 después de dejar actuar la actividad ureasa durante un periodo de tiempo adecuado, normalmente unos 30 minutos. El paciente introduce su aliento en los exeteiners mediante soplado con ayuda de una pajita tal como se ha mencionado previamente.

Los exeteiners con las muestras de aliento recogidas
10 pueden mantenerse a temperatura ambiente durante varios meses, sin que se afecte adversamente el contenido del aliento del paciente.

Las muestras de aliento recogidas en los recipientes se envían al laboratorio para efectuar el análisis del aliento y
15 determinar el contenido en carbono-13 antes y después de la administración de urea marcada con carbono-13, mediante el empleo de técnicas apropiadas. En una realización particular, la separación de los gases se lleva a cabo por cromatografía de gases y la determinación de carbono-13 se realiza por
20 espectroscopía de masas.

Una segunda alternativa de realización del método para la detección de *Helicobacter pylori*, basado en el ensayo del aliento con urea marcada con carbono-13, proporcionado por esta invención, implica determinar el contenido basal en carbono-13
25 en la muestra de aliento antes de administrar la solución acuosa de ácido cítrico y la urea marcada con carbono-13 y administrar simultáneamente al paciente la solución acuosa de ácido cítrico y la urea marcada con carbono-13, y comprende las etapas de:

30 a) recoger una muestra del aliento del paciente con el fin de determinar el contenido basal en carbono-13;

b) administrar al paciente, simultáneamente:

- una solución acuosa de ácido cítrico que comprende ácido cítrico en una cantidad suficiente para dar un pH
35 comprendido entre 2 y 2,5; y

- una cantidad apropiada de urea marcada con carbono-13;

c) recoger una muestra del aliento del paciente con el fin de determinar el contenido en carbono-13 tras la administración de la solución de ácido cítrico y de la urea marcada con carbono-13; y

d) analizar las muestras de aliento recogidas para determinar el contenido en carbono-13 antes y después de la administración de urea marcada con carbono-13.

Mediante la realización de esta segunda alternativa, la duración del ensayo se reduce en unos 10 minutos aproximadamente y se elimina una etapa, debido a la administración simultánea de la solución acuosa de ácido cítrico y la urea marcada con carbono-13.

La recogida de muestras del aliento del paciente antes de administrarle la solución acuosa de ácido cítrico y la urea marcada con carbono-13, con el fin de determinar el contenido basal en carbono-13, se realiza en unos exetainers tal como se ha mencionado previamente en la primera alternativa de realización del método para la detección de *H. pylori* objeto de esta invención.

A continuación, se administran al paciente simultáneamente la solución acuosa de ácido cítrico y la cantidad apropiada de urea marcada con carbono-13. Al igual que en la primera alternativa, la solución acuosa de ácido cítrico comprende una disolución en agua de ácido cítrico en cantidad suficiente para dar un pH comprendido entre 2 y 2,5 y puede contener, además, unos aditivos alimentarios o farmacéuticos aceptables, que mejoren sus propiedades y características organolépticas tales como, edulcorantes, aromatizantes, colorantes y conservantes. La urea marcada con carbono-13 se administra bien en forma de solución acuosa tras su disolución en agua o bien en forma de un comprimido. En una realización particular del método objeto de esta invención, se administra una cantidad de urea marcada con carbono-13 comprendida entre 50 y 100 mg, opcionalmente

disuelta en una cantidad de agua comprendida entre 20 y 50 ml.

Después de la administración de la solución acuosa de ácido cítrico y la urea marcada con carbono-13 se recogen muestras del aliento del paciente en unos exeteiners con el fin de determinar el contenido en carbono-13 post-administración de la urea marcada con dicho isótopo. En general, las muestras se recogen por duplicado después de dejar actuar la actividad ureasa durante un periodo de tiempo adecuado, normalmente unos 30 minutos. El paciente introduce su aliento en los exeteiners mediante soplado con ayuda de una pajita tal como se ha mencionado previamente.

Los exeteiners con las muestras de aliento recogidas pueden mantenerse a temperatura ambiente durante varios meses, sin que el contenido del aliento del paciente se vea afectado adversamente.

Las muestras de aliento recogidas en los exeteiners se envían al laboratorio para efectuar el análisis del aliento y determinar el contenido en carbono-13 antes y después de la administración de urea marcada con carbono-13, mediante el empleo de técnicas apropiadas, tales como cromatografía de gases y espectroscopía de masas.

En general, para la ejecución del método para la detección de *H. pylori* objeto de esta invención, en cualquiera de sus alternativas de realización, es conveniente que el paciente se encuentre en ayunas, siendo recomendable que el paciente no haya ingerido ningún tipo de alimento en las 6-8 horas previas a la realización del ensayo.

La comparación entre el contenido basal en carbono-13 y el contenido en carbono-13 tras la administración de urea marcada con carbono-13 permite evaluar la actividad ureasa. Una actividad ureasa alta, baja o nula (punto de corte o de referencia [cut-off]: 3-5) puede ser indicativa de la presencia de un microorganismo con actividad ureasa, tal como el *H. pylori* y, por tanto, puede ser indicativo de la existencia de una enfermedad gastroduodenal.

Por consiguiente, una aplicación particular del método de detección de *H. pylori* proporcionado por esta invención consiste en el diagnóstico de la infección de *H. pylori*, agente causal directo de las enfermedades gastroduodenales antes mencionadas, mediante un método no invasivo basado en el test del aliento con urea marcada con carbono-13. Por tanto, el método de detección de *H. pylori* proporcionado por esta invención puede ser utilizado en el diagnóstico de enfermedades gastro-duodenales, tales como úlcera péptica duodenal, úlcera duodenal, úlcera gástrica, dispepsia, linfomas "no Hodgkins" gástricos e incluso en el cáncer de estómago.

Otra aplicación del método de detección de *H. pylori* objeto de esta invención es la de comprobar la evolución del tratamiento de la enfermedad gastroduodenal y, en particular, la erradicación del *H. pylori*, puesto que permite determinar la erradicación del *H. pylori* hasta en un plazo máximo de un mes después del tratamiento sin dar lugar a falsos negativos como ocurre con los métodos serológicos.

El método de detección de *H. pylori* proporcionado por esta invención, en cualquiera de sus alternativas de realización, presenta numerosas ventajas sobre otros métodos similares conocidos ya que:

- es un método no invasivo, por lo que no requiere la realización de una gastroscopia en el paciente;
- es seguro, puesto que utiliza un isótopo estable y no radiactivo (carbono-13) en cantidades moderadas;
- es fiable y reproducible, puesto que reproduce las condiciones estándar del entorno del antro estomacal y asegura la pervivencia de la posible colonia de *H. pylori*;
- es eficaz, puesto que refleja la infección de toda la superficie estomacal;
- es rápido, ya que proporciona resultados en 48 horas;
- es fácil, sencillo, no requiere personal cualificado y, de hecho, puede realizarse tanto en la propia consulta o clínica del médico como en el propio domicilio del paciente y

enviar los recipientes cerrados conteniendo las distintas muestras de aliento al laboratorio de análisis;

- es cómodo, puesto que el paciente no está obligado a mantener una determinada posición durante el desarrollo del ensayo, de hecho, durante la realización del ensayo el paciente no necesita mantenerse en posición horizontal, como en otros ensayos del estado de la técnica, sino que puede cambiar de postura y permanecer sentado o de pie, siendo la única limitación la de que durante la realización del ensayo el paciente no puede fumar ni ingerir ninguna comida ni bebida;

- la recogida del aliento es muy sencilla y económica; y
- tiene una amplia aplicación, puesto que puede ser aplicado en mujeres embarazadas, niños, adultos y ancianos.

2. Kit para la detección de *H.pylori*

En un segundo objeto, se proporciona un kit para la detección de *Helicobacter pylori*, en particular, un kit para la realización del método basado en el test del aliento con urea marcada con carbono-13 previamente descrito. En su forma más simple, el kit comprende un estuche que contiene:

- un recipiente que contiene urea marcada con carbono-13;
- al menos, dos recipientes destinados a contener el aliento del paciente, uno de los cuales está destinado a contener el aliento del paciente tras la administración del ácido cítrico pero antes de la administración de la urea marcada con carbono-13, mientras que el otro recipiente está destinado a contener el aliento del paciente tras la administración de la urea marcada con carbono-13, estando dichos recipientes constituidos por unos tubos de cristal provistos de unos tapones que van a rosca y tienen un septum;
y

- unos medios para soplar el aliento dentro de los recipientes antes citados.

El kit puede incluir, o no, además, un recipiente que contiene ácido cítrico, el cual puede encontrarse en estado

sólido, en una cantidad tal que tras disolución en la cantidad apropiada de agua rinde un pH comprendido entre 2 y 2,5. En este caso particular, el recipiente que contiene el ácido cítrico es un sobre o similar. Alternativa y opcionalmente, el
5 recipiente puede contener además del ácido cítrico unos aditivos alimentarios o farmacéuticos aceptables (edulcorantes, aromatizantes, conservantes y colorantes). Por tanto, en una realización particular del kit objeto de esta invención se proporciona un sobre que contiene entre 2 y 5 g de ácido
10 cítrico, típicamente 4,2 g de ácido cítrico, opcionalmente junto con otros aditivos, para su disolución en 200 ml de agua.

El recipiente que contiene la urea marcada con carbono-13 puede ser un sobre conteniendo la cantidad apropiada de urea marcada con carbono-13 en forma de polvo, o un blister
15 conteniendo un comprimido de urea marcada con carbono-13 con la dosis apropiada, o, alternativamente, un frasco cerrado que contiene la cantidad apropiada de urea marcada con carbono-13 y el frasco tiene el volumen adecuado para obtener la disolución acuosa de urea marcada con carbono-13 a la
20 concentración deseada. En una realización particular, el recipiente que contiene la urea marcada con carbono-13 es un frasco de, al menos, 20 a 50 ml, que contiene entre 50 y 100 mg de urea marcada con carbono-13 en polvo. En otra realización particular, dicho recipiente es un blister que contiene un
25 comprimido, opcionalmente dispersable, que contiene entre 75 y 100 mg de urea marcada con carbono-13.

Los recipientes destinados a contener el aliento del paciente son unos exeteiners como los que se muestran en las Figuras 1 y 2, donde puede apreciarse que dichos exeteiners
30 están constituidos por un tubo (1), preferentemente de cristal, cuyos tapones (2) van a rosca y tienen un septum (3) en el centro, hecho de un material elastómero apto para farmacia, que permite su penetración por medio de una aguja que recoge el aire contenido en el exeteiner para su análisis posterior. El
35 septum (3) está especialmente diseñado para que la aguja de la

máquina de recogida de aire pueda pinchar y realizar su función sucesivas veces sin romperse.

Para evaluar la fiabilidad y reproducibilidad del ensayo objeto de esta invención es conveniente recoger las muestras de aliento, tanto antes como después de la administración de urea marcada con carbono-13, por duplicado, por lo que, el kit de la invención contendrá, preferentemente, cuatro exeteiners, de los cuales dos se utilizarán para recoger el aliento del paciente tras la administración del ácido cítrico pero antes de la administración de la urea marcada con carbono-13, mientras que los otros dos recogerán el aliento del paciente tras la administración de la urea marcada con carbono-13. Para facilitar la interpretación de los resultados obtenidos es conveniente que los exeteiners lleven alguna marca que permita distinguir entre los que recogen el aliento antes de la administración de urea marcada con carbono-13 y los que recogen el aliento tras la administración de la urea marcada con carbono-13.

En general, los medios para soplar el aliento dentro de los recipientes son unas pajitas o similares.

Por tanto, en una realización particular y preferida de esta invención se proporciona un kit para la detección de *H. pylori*, en particular, un kit para la realización del test del aliento con urea marcada con carbono-13 previamente descrito, que comprende un estuche que contiene:

- un sobre que contiene ácido cítrico, en estado sólido, en cantidad suficiente para que, tras disolución en la cantidad adecuada de agua, rinda un pH comprendido entre 2 y 2,5, junto con opcionalmente, unos aditivos, tales como edulcorantes, aromatizantes, conservantes y colorantes;

- un frasco que contiene la cantidad apropiada de urea marcada con carbono-13 en forma de polvo, conteniendo dicho frasco el volumen necesario para disolver la urea y alcanzar la concentración deseada, o alternativamente, un blister conteniendo un comprimido con la cantidad apropiada de urea

marcada con carbono-13;

- cuatro exeteiners destinados a contener el aliento del paciente, dos de los cuales se utilizan para recoger el aliento del paciente tras la administración de la solución acuosa de ácido cítrico pero antes de la administración de la solución acuosa de urea marcada con carbono-13, mientras que los otros dos están destinados a contener el aliento del paciente tras la administración de la solución acuosa de urea marcada con carbono-13; y

- unas pajitas para soplar el aliento dentro de los exeteiners.

Ventajosamente, los exeteiners están marcados de forma que se puedan distinguir de manera sencilla los exeteiners destinados a ser utilizados para recoger el aliento antes de la administración de la urea marcada con carbono-13 de los que se utilizan para recoger el aliento después de la administración de la urea marcada con carbono-13.

Los siguientes ejemplos ilustran la invención.

EJEMPLO 1

Preparación de una solución acuosa de ácido cítrico

Se prepara una solución acuosa de ácido cítrico con un pH comprendido entre 2 y 2,5, disolviendo en 200 ml de agua una mezcla formada por:

	<u>Gramos</u>	<u>Porcentaje</u>
Acido cítrico	4,2	96,1
Carbonato sódico	0,1	2,24
Aroma de limón (polvo)	0,04	0,9
Aspartamo	0,03	0,67
Sunset-Yellow	0,002	0,04
TOTAL	4,472	99,95

EJEMPLO 2

Ensayo para la detección de *H. pylori*

Un paciente sospechoso de padecer una enfermedad gastro-

duodenal relacionada con *H. pylori*, se somete al ensayo que se describe a continuación. El ensayo se realiza sobre un paciente adulto, que haya permanecido 8 horas en ayuno.

Al paciente se le administran 200 ml de una solución acuosa de ácido cítrico como la preparada en el Ejemplo 1. Al cabo de 10 minutos se recogen unas muestras de aliento del paciente, por duplicado, en unos exeteiners identificados con el indicativo "BASAL" que se utilizan para determinar el contenido basal en carbono-13. Para la recogida del aliento, el paciente hace uso de una pajita previamente situada dentro del exeteiner y sopla lentamente el aire espirado hasta que aparece condensación del aliento en las paredes internas del exeteiner, y a continuación sigue espirando el aliento a la vez que retira la pajita y finalmente cierra el exeteiner mediante el tapón correspondiente.

Posteriormente, al paciente se le administran 50 ml de una solución acuosa de urea marcada con carbono-13 [Cambridge Isotope Laboratories, Inc.], a una concentración de 1,5 mg/ml. Al cabo de 30 minutos se recogen unas muestras del aliento del paciente, por duplicado, tal como se ha mencionado previamente, en unos exeteiners identificados con el indicativo "POST", que se utilizan para determinar el contenido en carbono-13 tras la administración de la urea marcada con dicho isótopo.

Los exeteiners se envían al laboratorio de análisis para analizar las muestras de aliento recogidas y determinar el contenido en carbono-13 antes y después de la administración de urea marcada con carbono-13. Para ello, las muestras se envían a un analizador automático de carbono en aliento (ABCA) [Europa Científica, S.L.] previa extracción del aire contenido en los exeteiners con ayuda de una aguja que atraviesa el septum del tapón sin romperlo. Los gases contenidos en las muestras de aliento se separan por cromatografía de gases y el contenido en carbono-13 se determina por espectroscopía de masas siguiendo las instrucciones del fabricante.

La comparación entre el contenido basal en carbono-13

[BASAL] y el contenido en carbono-13 tras administrar la urea marcada con carbono-13 [POST] permite al médico evaluar la actividad ureasa y consecuentemente el diagnóstico de una posible enfermedad gastroduodenal asociada con la presencia de

5 *H. pylori*.

REIVINDICACIONES

1. Un método para la detección de *Helicobacter pylori*, basado en el ensayo del aliento con urea marcada con carbono-13, que comprende las etapas de:

a) administrar al paciente una solución acuosa de ácido cítrico que comprende ácido cítrico en una cantidad suficiente para dar un pH comprendido entre 2 y 2,5;

b) recoger una muestra del aliento del paciente con el fin de determinar el contenido basal en carbono-13;

c) administrar al paciente una cantidad apropiada de urea marcada con carbono-13;

d) recoger una muestra del aliento del paciente con el fin de determinar el contenido en carbono-13 tras la administración de la urea marcada con carbono-13; y

e) analizar las muestras de aliento recogidas para determinar el contenido en carbono-13 antes y después de la administración de urea marcada con carbono-13.

2. Un método según la reivindicación 1, en el que dicha solución acuosa de ácido cítrico comprende, además, unos aditivos alimentarios o farmacéuticos aceptables, seleccionados del grupo formado por edulcorantes, aromatizantes, colorantes y conservantes.

3. Un método según la reivindicación 1, en el que dicha solución acuosa de ácido cítrico procede de un zumo de frutas, opcionalmente acidulado con un acidulante alimentario o farmacéutico aceptable.

4. Un método según la reivindicación 1, en el que la recogida de las muestras del aliento del paciente para determinar el contenido basal en carbono-13 se realiza al cabo de unos 10 minutos tras la administración de la solución acuosa de ácido cítrico.

5. Un método según la reivindicación 1, en el que la urea marcada con carbono-13 se administra en forma de una solución acuosa.

5

6. Un método según la reivindicación 5, en el que dicha solución acuosa de urea marcada con carbono-13 tiene una concentración comprendida entre 1 y 4,5 mg/ml.

10

7. Un método según la reivindicación 1, en el que la urea marcada con carbono-13 se administra en forma de un comprimido.

8. Un método según la reivindicación 7, en el que dicho comprimido contiene entre 50 y 100 mg de urea marcada con carbono-13.

15

9. Un método según la reivindicación 1, en el que la recogida de las muestras del aliento del paciente para determinar el contenido en carbono-13 tras la administración de urea marcada con carbono-13 se realiza al cabo de unos 30 minutos después de administrar la urea marcada con carbono-13.

20

10. Un método según la reivindicación 1, en el que el aliento del paciente se recoge en unos exetainers.

25

11. Un método según la reivindicación 1, en el que el análisis del aliento y la determinación del contenido en carbono-13 se lleva a cabo mediante cromatografía de gases y espectroscopía de masas.

30

12. Un método según la reivindicación 1, en el que la comparación entre el contenido basal en carbono-13 y el contenido en carbono-13 tras la administración de urea marcada con carbono-13 es indicativo de la actividad ureasa existente en el paciente.

35

13. Un método para la detección de *Helicobacter pylori*, basado en el ensayo del aliento con urea marcada con carbono-13, que comprende las etapas de:

5 a) recoger una muestra del aliento del paciente con el fin de determinar el contenido basal en carbono-13;

b) administrar al paciente, simultáneamente:

- una solución acuosa de ácido cítrico que comprende ácido cítrico en una cantidad suficiente para dar un pH comprendido entre 2 y 2,5; y

10 - una cantidad apropiada de urea marcada con carbono-13;

15 c) recoger una muestra del aliento del paciente con el fin de determinar el contenido en carbono-13 tras la administración de la solución de ácido cítrico y de la urea marcada con carbono-13; y

d) analizar las muestras de aliento recogidas para determinar el contenido en carbono-13 antes y después de la administración de urea marcada con carbono-13.

20 14. Un método según la reivindicación 13, en el que dicha solución acuosa de ácido cítrico comprende, además, unos aditivos alimentarios o farmacéuticos aceptables, seleccionados del grupo formado por edulcorantes, aromatizantes, colorantes y conservantes.

25 15. Un método según la reivindicación 13, en el que dicha solución acuosa de ácido cítrico procede de un zumo de frutas, opcionalmente acidulado con un acidulante alimentario o farmacéutico aceptable.

30 16. Un método según la reivindicación 13, en el que la urea marcada con carbono-13 se administra disuelto en una solución acuosa.

35 17. Un método según la reivindicación 16, en el que dicha

solución acuosa de urea marcada con carbono-13 tiene una concentración comprendida entre 1 y 4,5 mg/ml.

18. Un método según la reivindicación 13, en el que la urea marcada con carbono-13 se administra en forma de un comprimido.

19. Un método según la reivindicación 18, en el que dicho comprimido contiene entre 50 y 100 mg de urea marcada con carbono-13.

20. Un método según la reivindicación 13, en el que la recogida de las muestras del aliento del paciente para determinar el contenido en carbono-13 tras la administración de urea marcada con carbono-13 se realiza al cabo de unos 30 minutos después de administrar la urea marcada con carbono-13.

21. Un método según la reivindicación 13, en el que el aliento del paciente se recoge en unos exetainers.

22. Un método según la reivindicación 13, en el que el análisis del aliento y la determinación del contenido en carbono-13 se lleva a cabo mediante cromatografía de gases y espectroscopía de masas.

23. Un método según la reivindicación 13, en el que la comparación entre el contenido basal en carbono-13 y el contenido en carbono-13 tras la administración de urea marcada con carbono-13 es indicativo de la actividad ureasa existente en el paciente.

24. Un kit para la detección de *Helicobacter pylori*, mediante la realización de un método basado en el test del aliento con urea marcada con carbono-13 según la reivindicación 1 ó 13, que comprende un estuche que contiene:

- un recipiente que contiene urea marcada con carbono-13;
- al menos, dos recipientes destinados a contener el aliento del paciente, uno de los cuales está destinado a contener el aliento del paciente tras la administración del ácido cítrico pero antes de la administración de la urea marcada con carbono-13, mientras que el otro recipiente está destinado a contener el aliento del paciente tras la administración de la urea marcada con carbono-13, estando dichos recipientes constituidos por unos tubos de cristal provistos de unos tapones que van a rosca y tienen un septum;
y

- unos medios para soplar el aliento dentro de los recipientes antes citados.

25. Un kit según la reivindicación 24, que comprende además un recipiente que contiene ácido cítrico.

26. Un kit según la reivindicación 25, en el que el ácido cítrico se encuentra en estado sólido, en una cantidad tal que tras disolución en la cantidad apropiada de agua rinde un pH comprendido entre 2 y 2,5.

27. Un kit según la reivindicación 26, en el que el recipiente que contiene el ácido cítrico es un sobre.

28. Un kit según la reivindicación 25, en el que el recipiente del ácido cítrico contiene, además del ácido cítrico unos aditivos alimentarios o farmacéuticos aceptables seleccionados del grupo formado por edulcorantes, aromatizantes, conservantes y colorantes.

29. Un kit según la reivindicación 24, en el que el recipiente que contiene la urea marcada con carbono-13 es un frasco que contiene la cantidad apropiada de urea marcada con carbono-13 y el frasco tiene el volumen adecuado para obtener

la disolución acuosa de urea marcada con carbono-13 a la concentración deseada.

5 30. Un kit según la reivindicación 24, en el que el recipiente que contiene la urea marcada con carbono-13 es un blister que contiene un comprimido, opcionalmente dispersable, que contiene la cantidad apropiada de urea marcada con carbono-13.

10 31. Un kit según la reivindicación 24, en el que los recipientes destinados a contener el aliento del paciente son unos exeteiners y están constituidos por un tubo (1) de cristal, cuyos tapones (2) van a rosca y tienen un septum (3) en el centro, hecho de un material elastómero apto para
15 farmacia, que permite su penetración por medio de una aguja para recoger el aire contenido en el exeteiner para su análisis posterior.

20 32. Un kit según la reivindicación 24, en el que dichos medios para soplar el aliento dentro de los recipientes son unas pajitas.

25 33. Un kit para la detección de *H. pylori*, adecuado para la realización de un método basado en el test del aliento con urea marcada con carbono-13, según la reivindicación 1 ó 13, que comprende un estuche que contiene:

30 - un sobre que contiene ácido cítrico, en estado sólido, en cantidad suficiente para que, tras disolución en la cantidad adecuada de agua, rinda un pH comprendido entre 2 y 2,5, junto con opcionalmente, unos aditivos, tales como edulcorantes, aromatizantes, conservantes y colorantes;

- un recipiente que contiene urea marcada con carbono-13 seleccionado entre:

35 i) un frasco que contiene la cantidad apropiada de urea marcada con carbono-13, conteniendo dicho frasco el

volumen necesario para disolver la urea y alcanzar la concentración deseada, o alternativamente,

- ii) un blister conteniendo un comprimido, opcionalmente dispersable, que contiene la cantidad apropiada de urea marcada con carbono-13;

- cuatro exeteiners destinados a contener el aliento del paciente, dos de los cuales se utilizan para recoger el aliento del paciente tras la administración de la solución acuosa de ácido cítrico pero antes de la administración de la solución acuosa de urea marcada con carbono-13, mientras que los otros dos están destinados a contener el aliento del paciente tras la administración de la solución acuosa de urea marcada con carbono-13; y

- unas pajitas para soplar el aliento dentro de los exeteiners.

34. Un kit según la reivindicación 33, en el que el dicho sobre contiene entre 2 y 5 g de ácido cítrico, opcionalmente junto con otros aditivos, para su disolución en la cantidad apropiada de agua.

35. Un kit según la reivindicación 33, en el que el frasco que contiene la urea marcada con carbono-13 es un frasco de, al menos, 20 a 50 ml y contiene entre 50 y 100 mg de urea marcada con carbono-13.

36. Un kit según la reivindicación 33, en el que dicho comprimido contiene entre 50 y 100 mg de urea marcada con carbono-13.

37. Un kit según la reivindicación 33, en el que dichos exeteiners están marcados de forma que se puedan distinguir de manera sencilla los exeteiners destinados a ser utilizados para recoger el aliento antes de la administración de la urea marcada con carbono-13 de los que se utilizan para recoger el

aliento después de la administración de la urea marcada con carbono-13.

- 5 38. Empleo de una solución acuosa de ácido cítrico que comprende ácido cítrico en cantidad suficiente para dar un pH comprendido entre 2 y 2,5, opcionalmente junto con otros aditivos farmacéuticamente aceptables, en la realización de un método de detección de *H. pylori*, basado en el ensayo de la urea marcada con carbono-13.

REIVINDICACIONES MODIFICADAS

[recibidas por la oficina Internacional el 10 de marzo de 1998 (10.03.98);
reivindicaciones 1-38 reemplazadas por las reivindicaciones
1-14 modificadas (4 paginas)]

1. Un kit para la detección de *Helicobacter pylori*,
mediante la realización de un método basado en el test del
5 aliento con urea marcada con carbono-13, que comprende un
estuche que contiene:

- un recipiente que contiene urea marcada con carbono-13;
- al menos, dos recipientes destinados a contener el
aliento del paciente, uno de los cuales está destinado a
10 contener el aliento del paciente tras la administración del
ácido cítrico pero antes de la administración de la urea
marcada con carbono-13, mientras que el otro recipiente está
destinado a contener el aliento del paciente tras la
administración de la urea marcada con carbono-13, estando
15 dichos recipientes constituidos por unos tubos de cristal
provistos de unos tapones que van a rosca y tienen un septum;
y

- unos medios para soplar el aliento dentro de los
recipientes antes citados.

2. Un kit según la reivindicación 1, que comprende además
un recipiente que contiene ácido cítrico.

3. Un kit según la reivindicación 2, en el que el ácido
25 cítrico se encuentra en estado sólido, en una cantidad tal que
tras disolución en la cantidad apropiada de agua rinde un pH
comprendido entre 2 y 2,5.

4. Un kit según la reivindicación 3, en el que el
30 recipiente que contiene el ácido cítrico es un sobre.

5. Un kit según la reivindicación 2, en el que el
recipiente del ácido cítrico contiene, además del ácido cítrico
unos aditivos alimentarios o farmacéuticos aceptables
35 seleccionados del grupo formado por edulcorantes,

aromatizantes, conservantes y colorantes.

6. Un kit según la reivindicación 1, en el que el recipiente que contiene la urea marcada con carbono-13 es un frasco que contiene la cantidad apropiada de urea marcada con carbono-13 y el frasco tiene el volumen adecuado para obtener la disolución acuosa de urea marcada con carbono-13 a la concentración deseada.

7. Un kit según la reivindicación 1, en el que el recipiente que contiene la urea marcada con carbono-13 es un blister que contiene un comprimido, opcionalmente dispersable, que contiene la cantidad apropiada de urea marcada con carbono-13.

8. Un kit según la reivindicación 1, en el que los recipientes destinados a contener el aliento del paciente son unos exeteiners y están constituidos por un tubo (1) de cristal, cuyos tapones (2) van a rosca y tienen un septum (3) en el centro, hecho de un material elastómero apto para farmacia, que permite su penetración por medio de una aguja para recoger el aire contenido en el exeteiner para su análisis posterior.

9. Un kit según la reivindicación 1, en el que dichos medios para soplar el aliento dentro de los recipientes son unas pajitas.

10. Un kit para la detección de *H. pylori*, adecuado para la realización de un método basado en el test del aliento con urea marcada con carbono-13, que comprende un estuche que contiene:

- un sobre que contiene ácido cítrico, en estado sólido, en cantidad suficiente para que, tras disolución en la cantidad adecuada de agua, rinda un pH comprendido entre 2 y 2,5, junto

con opcionalmente, unos aditivos, tales como edulcorantes, aromatizantes, conservantes y colorantes;

- un recipiente que contiene urea marcada con carbono-13 seleccionado entre:

- 5 i) un frasco que contiene la cantidad apropiada de urea marcada con carbono-13, conteniendo dicho frasco el volumen necesario para disolver la urea y alcanzar la concentración deseada, o alternativamente,
- 10 ii) un blister conteniendo un comprimido, opcionalmente dispersable, que contiene la cantidad apropiada de urea marcada con carbono-13;

- cuatro exeteiners destinados a contener el aliento del paciente, dos de los cuales se utilizan para recoger el aliento del paciente tras la administración de la solución acuosa de ácido cítrico pero antes de la administración de la solución acuosa de urea marcada con carbono-13, mientras que los otros dos están destinados a contener el aliento del paciente tras la administración de la solución acuosa de urea marcada con carbono-13; y

15

20 - unas pajitas para soplar el aliento dentro de los exeteiners.

11. Un kit según la reivindicación 10, en el que el dicho sobre contiene entre 2 y 5 g de ácido cítrico, opcionalmente junto con otros aditivos, para su disolución en la cantidad apropiada de agua.

25

12. Un kit según la reivindicación 10, en el que el frasco que contiene la urea marcada con carbono-13 es un frasco de, al menos, 20 a 50 ml y contiene entre 50 y 100 mg de urea marcada con carbono-13.

30

13. Un kit según la reivindicación 10, en el que dicho comprimido contiene entre 50 y 100 mg de urea marcada con carbono-13.

35

14. Un kit según la reivindicación 10, en el que dichos exeteiners están marcados de forma que se puedan distinguir de manera sencilla los exeteiners destinados a ser utilizados para recoger el aliento antes de la administración de la urea marcada con carbono-13 de los que se utilizan para recoger el aliento después de la administración de la urea marcada con carbono-13.

Declaración según el Artículo 19

Las reivindicaciones 1 al 23 han sido retiradas porque se refieren a un método de diagnóstico del cuerpo humano o animal.

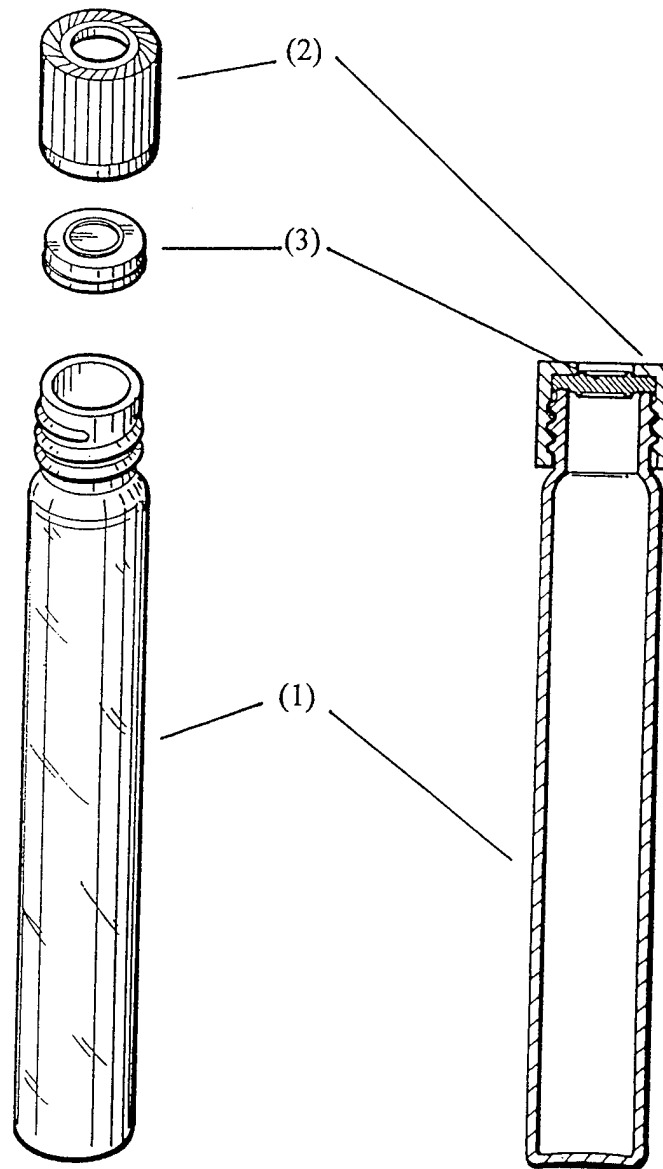


FIGURA 1

FIGURA 2

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/ES 97/00184

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

IPC⁶: G01N 33/497, C12Q 1/58, A61B 5/083

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

IPC⁶: G01N, A61B, A61K, C12Q

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

CIBEPAT, EPODOC, WPIL, CAS

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
P,X	DOMINGUEZ-MUNOZ, J.E. et al., "A citric acid solution is an optimal test drink in the 13C-urea breath test for the diagnosis of Helicobacter pylori infection", 1997, Gut, vol. 40, pages 459-462, the whole document	1-31, 33-38
X	WO 96/14091 A (DIABACT AB) 17 May 1996 (17.05.96), the whole document, specially page 5, lines 26-31; page 6, lines 1-5, and page 8, lines 25-27	1-23, 38
XX	LOTTERE, E. et al.; "The simplified 13C-urea breath test- One point analysis for detection of Helicobacter pylori infection", 1991, Z., the whole document	1-23, 38
Y		25-28, 34-37
X	US 4830010 A (MARSHALL, B.J.) 16 May 1989 (16.05.89)	24, 29-31
Y	the whole document	25-28, 34-37

☐ Further documents are listed in the continuation of Box C.☒ See patent family annex.

* Special categories of cited documents:

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

"E" earlier document but published on or after the international filing date

"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art

"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

07 November 1997 (07.11.97)

Date of mailing of the international search report

11 November 1997 (11.11.97)

Name and mailing address of the ISA/

S.P.T.O.

Facsimile No.

Authorized officer

Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/ES 97/00184

Box I Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 1 of first sheet)

This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1. ☒ Claims Nos.: 1-23
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:
Said claims concern a diagnostic method for the human or animal body - However, the search has been carried out based on the compounds used.
2. ☐ Claims Nos.:
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:
3. ☐ Claims Nos.:
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

Box II Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 2 of first sheet)

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:

1. ☐ As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.
2. ☐ As all searchable claims could be searched without effort justifying an additional fee, this Authority did not invite payment of any additional fee.
3. ☐ As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:
4. ☐ No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:

Remark on Protest

- ☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest.
☐ No protest accompanied the payment of additional search fees.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International Application No

PCT/ES 97/00184

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 96/14091 A	17.05.96	SE 9403755 A AU 9538610 A EP 787017 A	03.05.96 31.05.96 06.08.97
----- US 4830010 A -----	----- 16.05.89 -----	----- NONE -----	----- ----- -----

INFORME DE BÚSQUEDA INTERNACIONAL

Solicitud internacional n°
PCT/ES 97/00184

A. CLASIFICACIÓN DEL OBJETO DE LA SOLICITUD

CIP⁶ G01N33/497, C12Q1/58, A61B5/083

De acuerdo con la Clasificación Internacional de Patentes (CIP) o según la clasificación nacional y la CIP.

B. SECTORES COMPRENDIDOS POR LA BÚSQUEDA

Documentación mínima consultada (sistema de clasificación, seguido de los símbolos de clasificación)

CIP⁶ G01N, A61B, A61K, C12Q

Otra documentación consultada, además de la documentación mínima, en la medida en que tales documentos formen parte de los sectores comprendidos por la búsqueda

Bases de datos electrónicas consultadas durante la búsqueda internacional (nombre de la base de datos y, si es posible, términos de búsqueda utilizados)

CIBEPAT, EPODOC, WPIL, CAS

C. DOCUMENTOS CONSIDERADOS RELEVANTES

Categoría*	Documentos citados, con indicación, si procede, de las partes relevantes	Relevante para las reivindicaciones n°
P,X	DOMÍNGUEZ-MUÑOZ, J.E. et al., "A citric acid solution is an optimal test drink in the ¹³ C-urea breath test for the diagnosis of Helicobacter pylori infection", 1997, Gut, vol. 40, págs.: 459-462 Todo el documento	1-31,33-38
X	WO 96/14091 A (DIABACT AB) 17.05.96 Todo el documento, en especial pág. 5, líneas 26-31; pág. 6, líneas 1-5, y pág. 8, líneas 25-27	1-23,38
X	LOTTERER, E. Et al., "The simplified ¹³ C-urea breath test - One point analysys for detection of Helicobacter pylori infection", 1991, Z. Gastroenterol., vol. 29, págs.: 590-594	1-23,38
Y	Todo el documento	25-28,34-37

☒ En la continuación del recuadro C se relacionan otros documentos ☒ Los documentos de familias de patentes se indican en el anexo

* Categorías especiales de documentos citados:

"A" documento que define el estado general de la técnica no considerado como particularmente relevante.

"E" documentos anterior aunque publicado en la fecha de presentación internacional o en fecha posterior.

"L" documento que puede plantear dudas sobre una reivindicación de prioridad o que se cita para determinar la fecha de publicación de otra cita o por una razón especial (como la indicada).

"O" documento que se refiere a una divulgación oral, a una utilización, a una exposición o a cualquier otro medio.

"P" documento publicado antes de la fecha de presentación internacional pero con posterioridad a la fecha de prioridad reivindicada.

"T" documento ulterior publicado con posterioridad a la fecha de presentación internacional o de prioridad, que no pertenece al estado de la técnica pertinente pero que se cita por permitir la comprensión del principio o teoría que constituye la base de la invención.

"X" documento particularmente relevante; la invención reivindicada no puede considerarse nueva o que implique una actividad inventiva por referencia al documento aisladamente considerado.

"Y" documento particularmente relevante; la invención reivindicada no puede considerarse que implique una actividad inventiva cuando el documento se asocia a otro u otros documentos de la misma naturaleza, resultando dicha combinación evidente para un experto en la materia.

"&" documento que forma parte de la misma familia de patentes.

Fecha en que se ha concluido la búsqueda internacional.

7 Noviembre 1997 (07.11.97)

Fecha de expedición del Informe de Búsqueda Internacional

11 NOV 1997

Nombre y dirección postal de la Administración encargada de la Búsqueda Internacional O.E.P.M.
C/Panamá 1, 28071 Madrid, España.
n° de fax +34 1 3495304

Funcionario autorizado
ALFONSO MAQUEDANO
n° de teléfono +34 1 34955474

INFORME DE BÚSQUEDA INTERNACIONAL

Solicitud internacional n° PCT/ES 97/00184

C (Continuación). DOCUMENTOS CONSIDERADOS RELEVANTES		
Categoría *	Documentos citados, con indicación, si procede, de los pasajes relevantes	Nº de las reivindicaciones a que se refieren
X Y	US 4830010 A (MARSHALL, B.J.) 16.05.89 Todo el documento	24,29-31 25-28, 34-37

INFORME DE BÚSQUEDA INTERNACIONAL

Solicitud internacional n°

PCT/ES 97/00184

Recuadro I Observaciones cuando se estime que algunas reivindicaciones no pueden ser objeto de búsqueda (Continuación del punto 1 de la primera hoja)

De conformidad con el Artículo 17.2.a), algunas reivindicaciones no han podido ser objeto de búsqueda por los siguientes motivos:

1. ☒ Las reivindicaciones n°s: 1-23 se refieren a un objeto con respecto al cual esta Administración no está obligada a proceder a la búsqueda, a saber:
Dichas reivindicaciones están dirigidas a un método de diagnóstico del cuerpo humano o animal. A pesar de ello, la búsqueda ha sido llevada a cabo sobre la base de los compuestos utilizados.
2. ☐ Las reivindicaciones n°s: se refieren a elementos de la solicitud internacional que no cumplen con los requisitos establecidos, de tal modo que no puede efectuarse una búsqueda provechosa, concretamente:
3. ☐ Las reivindicaciones n°s: son reivindicaciones dependientes y no están redactadas de conformidad con las frases segunda y tercera de la Regla 6.4.a).

Recuadro II Observaciones cuando falta unidad de invención (Continuación del punto 2 de la primera hoja)

Esta Administración encargada de la Búsqueda Internacional ha detectado varias invenciones en la presente solicitud internacional, a saber:

1. ☐ Dado que todas las tasas adicionales han sido satisfechas por el solicitante dentro del plazo, el presente informe de búsqueda internacional comprende todas las reivindicaciones que pueden ser objeto de búsqueda.
2. ☐ Dado que todas las reivindicaciones que pueden ser objeto de búsqueda no han requerido un esfuerzo particular que justifique el abono de una tasa adicional, esta Administración no ha invitado al pago de ninguna tasa de esta naturaleza.
3. ☐ Dado que tan sólo una parte de las tasas adicionales solicitadas ha sido satisfecha dentro del plazo por el solicitante, el presente informe de búsqueda internacional comprende solamente aquellas reivindicaciones respecto de las cuales han sido satisfechas las tasas, concretamente las reivindicaciones n°s:
4. ☐ Ninguna de las tasas adicionales solicitadas ha sido satisfecha por el solicitante dentro de plazo. En consecuencia, el presente informe de búsqueda internacional se limita a la invención mencionada en primer término en las reivindicaciones. Tal invención está cubierta por las reivindicaciones n°s:

Indicación en cuanto a la reserva

- ☐ Las tasas adicionales han sido acompañadas de una reserva por parte del solicitante.
- ☐ El pago de las tasas adicionales no ha sido acompañado de ninguna reserva.

INFORME DE BÚSQUEDA INTERNACIONAL

Información relativa a miembros de familias de patentes

Solicitud internacional n°

PCT/ ES 97/00184

Documento de patente citado en el informe de búsqueda	Fecha de publicación	Miembro(s) de la familia de patentes	Fecha de publicación
WO 96/14091 A	17.05.96	SE 9403755 A AU 9538610 A EP 787017 A	03.05.96 31.05.96 06.08.97
US 4830010 A	16.05.89	NINGUNO	