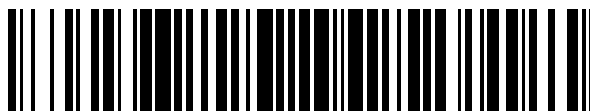


19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 791 604**

51 Int. Cl.:

**G01N 33/15** (2006.01)

**G01N 33/53** (2006.01)

**G01N 33/558** (2006.01)

**G01N 33/94** (2006.01)

12

## TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **16.07.2013 PCT/US2013/050688**

87 Fecha y número de publicación internacional: **23.01.2014 WO14014915**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **16.07.2013 E 13819718 (1)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **12.02.2020 EP 2872885**

54 Título: **Kits de detección de lectura directa para contaminación de superficie por fármacos antineoplásicos**

30 Prioridad:

**16.07.2012 US 201261672059 P**

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

**05.11.2020**

73 Titular/es:

**CENTERS FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION (100.0%)  
Technology Transfer Office, 4770 Buford Highway, MS K 79  
Atlanta, GA 30341, US**

72 Inventor/es:

**SMITH, JEROME;  
SAMMONS, DEBORAH y  
ROBERTSON, SHIRLEY**

74 Agente/Representante:

**PONS ARIÑO, Ángel**

**ES 2 791 604 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

Kits de detección de lectura directa para contaminación de superficie por fármacos antineoplásicos

### 5 CAMPO TÉCNICO

La presente descripción se refiere generalmente a procedimientos, dispositivos y kits para ensayar fármacos antineoplásicos en muestras ambientales. De acuerdo con aspectos específicos, la presente descripción se refiere a procedimientos, dispositivos y kits para el ensayo de flujo lateral de muestras recogidas para detectar o cuantificar la contaminación por fármacos antineoplásicos de una superficie de sitio de trabajo.

### ANTECEDENTES

Se usan fármacos antineoplásicos en el tratamiento del cáncer y son en sí mismos cancerosos, mutagénicos y teratogénicos. Más de ocho millones de trabajadores de la salud en EE.UU. están potencialmente expuestos durante la preparación, manipulación y administración de estos fármacos. Aunque las pautas de NIOSH y OSHA para el manejo de fármacos antineoplásicos están vigentes, los estudios continúan informando sobre la exposición de los trabajadores a estos fármacos. Informes recientes han observado contaminación externa de viales de fármacos y contaminación en las superficies de sitios de trabajo. La limpieza de áreas contaminadas es difícil y complicada por la falta de procedimientos rápidos y económicos para determinar el éxito de la limpieza. Si bien existen procedimientos analíticos para medir los fármacos antineoplásicos en muestras ambientales, estos procedimientos son complicados y requieren mucho tiempo, requiriendo el envío a laboratorios externos, lo que retrasa la recepción de los resultados del muestreo. Además, estos procedimientos analíticos requieren una considerable experiencia y pueden ser costosos de emplear de manera rutinaria.

El documento WO29008/073222 describe ensayos de flujo lateral para detectar un analito en un líquido, sin embargo, no hay una descripción específica de un ensayo de flujo lateral capaz de detectar un fármaco antineoplásico.

Pretty et al., J. Oncology Pharmacy Practice, Appleton and Lange, Norwalk, CT, US, vol. 18, n.º 1, 1 de marzo de 2012, páginas 23-36, Turci et al., J. Chromatography B: Biomedical Sciences & Applications, vol. 789, n.º 2, 15 de junio de 2003, páginas 169-209, Yoshida et al. J., Oncology Pharmacy Practice, vol. 17, n.º 1, 1 de marzo de 2010, páginas 29-38, y Kopp et al., Int. Archives Occupational and Environmental Health, vol. 86, n.º 1, 5 de febrero de 2012, páginas 46-55, describen todos procedimientos para detectar la contaminación por fármacos antineoplásicos de una superficie mediante cromatografía líquida o de gases junto con espectrometría de masas; estas referencias no describen dispositivos de flujo lateral.

Laderman et al., Clinical and Vaccine Immunology, vol. 15, n.º 1, 14 de noviembre de 2007, páginas 159-163. un análisis de flujo lateral para la detección de anticuerpos específicos del virus de Herpes Simple 2 en suero y sangre entera, la referencia no se refiere al muestreo y la recuperación de un fármaco antineoplásico de una superficie o el uso de ensayos de flujo lateral para la detección de fármacos antineoplásicos.

Kim et al., The Analyst, vol. 135, n.º 6, 1 de enero de 2010, página 1182 describe ensayos para la detección de Bacillus anthracis. Los ensayos de flujo lateral se describen como un posible medio de detección. La referencia no describe el muestreo y la recuperación de un fármaco antineoplásico de una superficie o el uso de ensayos de flujo lateral para la detección de fármacos antineoplásicos.

Existe la necesidad continua de procedimientos, dispositivos y kits para ensayar fármacos antineoplásicos en muestras ambientales, tales como superficies de sitio de trabajo.

### 50 RESUMEN DE LA INVENCION

La presente invención proporciona procedimientos para detectar la contaminación por fármacos antineoplásicos de una superficie que incluyen: proporcionar una solución humectante compatible con el fármaco antineoplásico y formulada para promover la liberación del fármaco de la superficie a ensayar, donde la solución humectante comprende un tampón biológicamente compatible, el 0,01 - 10 % v/v de un tensioactivo no iónico y/o el 0,01 - 10 % v/v de un disolvente prótico polar orgánico; proporcionar una matriz sólida para la absorción reversible del fármaco antineoplásico; poner en contacto la matriz sólida con la solución humectante, generando una matriz de ensayo; poner en contacto la matriz de ensayo y la superficie, generando una muestra de superficie; poner en contacto la muestra de superficie con un volumen de solución humectante, generando una muestra de prueba de fluido; ensayar el fármaco antineoplásico en la muestra de prueba de fluido mediante un ensayo de flujo lateral para producir un resultado de ensayo detectable; y detectar el resultado del ensayo detectable, detectando así la contaminación por fármacos antineoplásicos de la superficie.

La presente descripción proporciona procedimientos para detectar la contaminación por fármacos antineoplásicos de una superficie que incluyen: proporcionar una solución humectante compatible con el fármaco antineoplásico y formulada para promover la liberación del fármaco de la superficie a ensayar, donde la solución humectante  
 5 comprende un tampón biológicamente compatible, el 0,01 - 10 % v/v de un tensioactivo no iónico y/o el 0,01 - 10 % v/v de un disolvente prótico polar orgánico; proporcionar una matriz sólida para la absorción reversible del fármaco antineoplásico; poner en contacto la matriz sólida con la solución humectante, generando una matriz de ensayo; poner en contacto la matriz de ensayo y la superficie, generando una muestra de superficie; poner en contacto la muestra de superficie con un volumen de solución humectante, generando una muestra de prueba de fluido; ensayar el fármaco  
 10 antineoplásico en la muestra de prueba de fluido mediante un ensayo de flujo lateral para producir un resultado de ensayo detectable; detectar el resultado del ensayo detectable, detectando así la contaminación por fármacos antineoplásicos de la superficie; y comparar el resultado del ensayo con un estándar.

Los ejemplos no limitantes de fármacos antineoplásicos ensayados de acuerdo con los procedimientos de la presente descripción incluyen, pero sin limitación, doxorubicina, paclitaxel y 5-fluorouracilo.  
 15

De acuerdo con aspectos de los procedimientos de la presente descripción, el ensayo de flujo lateral incluye: proporcionar un dispositivo de ensayo de flujo lateral, comprendiendo el dispositivo una almohadilla conjugada, un soporte poroso sólido o semisólido adyacente a la almohadilla conjugada, una zona de prueba presente en el soporte  
 20 y una zona de control presente en el soporte, donde la almohadilla conjugada comprende un agente de unión a fármaco antineoplásico marcado de forma detectable unido difusiblemente, donde la zona de detección de prueba comprende un reactivo de detección unido no difusiblemente y la zona de control comprende un reactivo de control unido no difusiblemente, el soporte poroso sólido o semisólido adyacente a una almohadilla absorbente que promueve el flujo capilar de la muestra de prueba de fluido a lo largo de una trayectoria de flujo que incluye la almohadilla conjugada y  
 25 el soporte poroso sólido o semisólido.

De acuerdo con aspectos de los procedimientos de la presente descripción, el ensayo de flujo lateral incluye: proporcionar un dispositivo de ensayo de flujo lateral, comprendiendo el dispositivo una almohadilla conjugada, un soporte poroso sólido o semisólido adyacente a la almohadilla conjugada, una zona de prueba presente en el soporte  
 30 y una zona de control presente en el soporte, donde la almohadilla conjugada comprende un agente de unión a fármaco antineoplásico marcado de forma detectable unido difusiblemente, donde el agente de unión a fármaco antineoplásico es un anticuerpo anti-fármaco antineoplásico, y donde la zona de detección de prueba comprende un reactivo de detección unido no difusiblemente y la zona de control comprende un reactivo de control unido no difusiblemente, el soporte poroso sólido o semisólido adyacente a una almohadilla absorbente que promueve el flujo capilar de la muestra de prueba de fluido a lo largo de una trayectoria de flujo que incluye la almohadilla conjugada y el soporte poroso sólido o semisólido.  
 35

De acuerdo con aspectos de los procedimientos de la presente descripción, el ensayo de flujo lateral incluye: proporcionar un dispositivo de ensayo de flujo lateral, comprendiendo el dispositivo una almohadilla conjugada, un soporte poroso sólido o semisólido adyacente a la almohadilla conjugada, una zona de prueba presente en el soporte  
 40 y una zona de control presente en el soporte, donde la almohadilla conjugada comprende un agente de unión al fármaco antineoplásico marcado de forma detectable unido difusiblemente, donde el agente de unión a fármaco antineoplásico es un anticuerpo anti-fármaco antineoplásico, y donde la zona de detección de prueba comprende un reactivo de detección unido no difusiblemente, donde el reactivo de detección es el fármaco neoplásico, y la zona de  
 45 control comprende un reactivo de control unido no difusiblemente, el soporte poroso sólido o semisólido adyacente a una almohadilla absorbente que promueve el flujo capilar de la muestra de prueba de fluido a lo largo de una trayectoria de flujo que incluye la almohadilla conjugada y el soporte poroso sólido o semisólido.

De acuerdo con aspectos de la presente descripción, el reactivo de control se une específicamente al anticuerpo anti-fármaco antineoplásico. Opcionalmente, el reactivo de control es un anticuerpo que se une específicamente al anticuerpo anti-fármaco antineoplásico.  
 50

La detección del resultado del ensayo se logra mediante observación visual o un lector electrónico de acuerdo con los procedimientos descritos en el presente documento.  
 55

#### BREVE DESCRIPCIÓN DE LOS DIBUJOS

La figura 1 es una ilustración esquemática de un dispositivo y procedimiento para el ensayo de flujo lateral de un fármaco antineoplásico de acuerdo con aspectos de la presente descripción;  
 60 la figura 2A es un gráfico que muestra la respuesta del monitor de flujo lateral para un tampón de muestreo enriquecido como % de B/Bo;  
 la figura 2B es un gráfico que muestra la respuesta del monitor de flujo lateral para el tampón de muestreo

enriquecido como una relación C/T;

la figura 2C es un gráfico que muestra la (masa observada) en función de la masa esperada utilizando curvas de % de B/Bo y C/T que indican un buen ajuste para los datos;

5 la figura 3A es un gráfico que muestra la respuesta del monitor para soluciones de hisopos enriquecidos como % de B/Bo;

la figura 3B es un gráfico que muestra la respuesta del monitor para soluciones de hisopos enriquecidos como una relación C/T;

la figura 3C es un gráfico que muestra la masa observada frente a la masa esperada como se hizo para los controles de tampón enriquecido y muestra un buen ajuste;

10 la figura 4A es un gráfico que muestra la respuesta del monitor para soluciones de bolsas enriquecidas como % de B/Bo;

la figura 4B es un gráfico que muestra la respuesta del monitor para soluciones de baldosas enriquecidas como una relación C/T;

15 la figura 5A es un gráfico que muestra la respuesta del monitor del ensayo de flujo lateral para el tampón de muestreo enriquecido con paclitaxel como % de B/Bo;

la figura 5B es un gráfico que muestra la respuesta del monitor de ensayo de flujo lateral para baldosas cerámicas enriquecidas con paclitaxel como % de B/Bo;

20 la figura 5C es un gráfico que muestra la detección de diversas cantidades de paclitaxel en tampón enriquecido o extraído de hisopos usados para limpiar baldosas cerámicas enriquecidas mediante evaluación visual de los resultados del ensayo de flujo lateral;

la figura 6A es un gráfico que muestra la respuesta del monitor del ensayo de flujo lateral para el tampón de muestreo enriquecido con doxorubicina como % de B/Bo;

la figura 6B es un gráfico que muestra la respuesta del monitor de ensayo de flujo lateral para baldosas cerámicas enriquecidas con doxorubicina como % de B/Bo; y

25 la figura 6C es un gráfico que muestra la detección de diversas cantidades de doxorubicina en tampón enriquecido o extraído de hisopos usados para limpiar baldosas cerámicas enriquecidas mediante evaluación visual de los resultados del ensayo de flujo lateral.

#### DESCRIPCIÓN DETALLADA

30 La presente invención es como se define en las reivindicaciones. Los términos científicos y técnicos utilizados en el presente documento pretenden tener los significados comúnmente entendidos por los expertos en la técnica. Dichos términos se encuentran definidos y utilizados en el contexto en diversas referencias estándar ilustrativas que incluyen J. Sambrook y D.W. Russell, *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory Press; 3ª Ed.,  
 35 2001; F.M. Ausubel, Ed., *Short Protocols in Molecular Biology*, Current Protocols; 5ª Ed., 2002; B. Alberts et al., *Molecular Biology of the Cell*, 4ª Ed., Garland, 2002; D.L. Nelson y M.M. Cox, *Lehninger Principles of Biochemistry*, 4ª Ed., W.H. Freeman & Company, 2004; Wild, D., *The Immunoassay Handbook*, 3ª Ed., Elsevier Science, 2005; Gosling, J. P., *Immunoassays: A Practical Approach*, Practical Approach Series, Oxford University Press, 2005; E. Harlow y D. Lane, *Antibodies: A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1988; F. Breitling y S. Dübel,  
 40 *Recombinant Antibodies*, John Wiley & Sons, Nueva York, 1999; H. Zola, *Monoclonal Antibodies: Preparation and Use of Monoclonal Antibodies and Engineered Antibody Derivatives*, Basics: From Background to Bench, BIOS Scientific Publishers, 2000; B.K.C. Lo, *Antibody Engineering: Methods and Protocols*, Methods in Molecular Biology, Humana Press, 2003; F. M. Ausubel et al., Eds., *Short Protocols in Molecular Biology*, Current Protocols, Wiley, 2002; Ormerod, M. G., *Flow Cytometry: a practical approach*, Oxford University Press, 2000; Givan, A. L., *Flow Cytometry: first  
 45 principles*, Wiley, Nueva York, 2001; y Herdewijn, P. (Ed.), *Oligonucleotide Synthesis: Methods and Applications*, Methods in Molecular Biology, Humana Press, 2004.

Los términos singulares "un", "una" y "el/la" no pretenden ser limitantes e incluyen referentes plurales a menos que se indique explícitamente o el contexto indique claramente lo contrario.

50 Se proporcionan procedimientos para detectar la contaminación por fármacos antineoplásicos de una superficie de acuerdo con aspecto de la presente descripción que incluyen: proporcionar una solución humectante compatible con el fármaco antineoplásico y formulada para promover la liberación del fármaco de la superficie a ensayar, donde la solución humectante comprende un tampón biológicamente compatible, el 0,01 - 10 % v/v de un tensioactivo no iónico  
 55 y/o el 0,01 - 10 % v/v de un disolvente prótico polar orgánico; proporcionar una matriz sólida para la absorción reversible del fármaco antineoplásico; poner en contacto la matriz sólida con la solución humectante, generando una matriz de ensayo; poner en contacto la matriz de ensayo y la superficie, generando una muestra de superficie; poner en contacto la muestra de superficie con un volumen de solución humectante, generando una muestra de prueba de fluido; y cuantificar el fármaco antineoplásico en la muestra de prueba de fluido mediante un ensayo de flujo lateral  
 60 para producir un resultado de ensayo; detectando así la contaminación por fármacos antineoplásicos de la superficie.

El resultado del ensayo se compara con un estándar de acuerdo con los aspectos preferidos de la divulgación.

Una solución humectante compatible con el fármaco antineoplásico es sustancialmente inerte con respecto al fármaco.

Una solución humectante incluye un tampón biológicamente compatible y opcionalmente incluye un tensioactivo y/o una pequeña cantidad de un disolvente orgánico.

Los ejemplos de tampones biológicamente compatibles incluyen, pero sin limitación, acetato de amonio, tampones MOPS, tampones citrato, tampones HEPES, tampones carbonato, tampones Tris, tampones tricina, tampones acetato, tampones fosfato y una solución salina tamponada con fosfato.

10

Se incluye un tensioactivo en cantidades del 0,01 - 10 % v/v de acuerdo con aspectos de la presente descripción.

Un tensioactivo incluido puede ser un tensioactivo aniónico, catiónico o no iónico.

15 Los tensioactivos no iónicos incluidos en las soluciones humectantes de la presente descripción se ilustran, pero sin limitación, por ésteres de ácidos grasos y alcoholes grasos alcoxilados. Los tensioactivos no iónicos incluidos en las soluciones humectantes de la presente descripción se ilustran, pero sin limitación, por ésteres alquílicos de glicerol, éteres alquílicos de polioxietilenglicol, éteres alquílicos de polioxipropilenglicol, éteres de octilfenol de polioxietilenglicol, éteres de alquilfenol de polioxietilenglicol, ésteres alquílicos de polioxietilenglicol sorbitán, éteres de polioxietileno propoxilados, poloxámeros, polisorbatos, ésteres alquílicos de sorbitán y copolímeros de bloque de polietilenglicol y polipropilenglicol. Los tensioactivos no iónicos incluidos en las soluciones humectantes de la presente descripción se ilustran, pero sin limitación, por Brij, cocamida MEA, cocamida DEA, decil glucósido, óxido de dodecildimetilamina, laurato de glicerilo, Nonoxinol-9, octaetilenglicol monododecil éter; lauril glucósido, octil glucósido, pentaetilenglicol monododecil éter, poloxámero 407, polisorbato 20, polisorbato 40, polisorbato 60, polisorbato 80, amina de sebo polietoxilada (POEA), Spans y Triton X-100.

Los ejemplos no limitantes de tensioactivos incluidos de acuerdo con los aspectos de la presente descripción son tensioactivos no iónicos tales como polisorbato 20, disponible comercialmente como Tween® 20.

30 De acuerdo con aspectos de la presente descripción, una solución humectante incluye un tampón biológicamente compatible e incluye un tensioactivo y/o el 0,01 - 10 % v/v de un disolvente orgánico.

Un ejemplo no limitante de una solución humectante es acetato de amonio 10 mM acuoso-Tween 20 al 1 % (v/v).

35 De acuerdo con aspectos de la presente descripción, una solución humectante incluye un tampón biológicamente compatible e incluye un tensioactivo y/o el 0,01 - 10 % v/v de un disolvente prótico polar orgánico. Los disolventes próticos polares orgánicos se conocen bien en la técnica e ilustrativamente incluyen, pero sin limitación, metanol, propanol y etanol.

40 La matriz sólida utilizada permite analizar la absorción reversible del fármaco antineoplásico sin un cambio sustancial en la estructura química del fármaco. Los ejemplos no limitantes de una matriz sólida incluyen papeles de filtro, matrices de algodón, matrices de espuma y matrices celulósicas, donde dichas matrices se ilustran, pero sin limitación, por hisopos, toallitas y gasas.

45 Se recoge una muestra de una o más superficies de sitio de trabajo de acuerdo con los aspectos de la presente descripción. Dichas superficies de sitio de trabajo son las presentes en los sitios de fabricación, envasado, prueba, uso y/o eliminación del fármaco antineoplásico. Ejemplos no limitativos de las superficies de sitio de trabajo de las cuales se recoge una muestra, incluyen mesas de trabajo, mostradores, superficies de escritorio, campanas de aislamiento o de laboratorio, autoclaves, artículos de cristalería, artículos de plástico, ropa, suelos, paredes, techos, pomos que incluye una puerta, tiradores de cajones y armarios, electrodomésticos y superficies de equipos.

Se pueden analizar diversos fármacos antineoplásicos usando procedimientos, dispositivos y kits de la presente descripción, ilustrados por doxorubicina, paclitaxel y 5-fluorouracilo.

55 Los fármacos antineoplásicos se describen, por ejemplo, en Goodman et al., Goodman and Gilman's The Pharmacological Basis of Therapeutics, 8ª Ed., Macmillan Publishing Co., 1990.

Los fármacos antineoplásicos que se pueden ensayar de acuerdo con los aspectos de la presente descripción incluyen, pero sin limitación, acivicina, aclarrubicina, acodazol, acronina, adozelesina, aldesleucina, alitretinoína, alopurinol, altretamina, ambomicina, ametantrona, amifostina, aminoglutetimida, amsacrina, anastrozol, antramicina, trióxido de arsénico, asparaginasa, asperlina, azacitidina, azetepa, azotomicina, batimastat, benzodepa, bicalutamida, bisantreno, dimesilato de bisnafida, bizelesina, bleomicina, brequinar, bropirimina, busulfán, cactinomicina,

calusterona, capecitabina, caracemida, carbetimer, carboplatino, carmustina, carrubicina, carzelesina, cedefingol, celecoxib, clorambucilo, cirolemicina, cisplatino, cladribina, mesilato de crisnatol, ciclofosfamida, citarabina, dacarbazina, dactinomicina, daunorrubicina, decitabina, dexormaplatino, dezaguanina, mesilato de dezaguanina, diazicuona, docetaxel, doxorubicina, droloxifeno, dromostanolona, duazomicina, edatrexato, eflomitina, elsamitrucina, 5 enloplatino, enpromato, epipropidina, epirubicina, erbulozol, esorrubicina, estramustina, etanidazol, etopósido, etoprina, fadrozol, fazarabina, fenretinida, floxuridina, fludarabina, fluorouracilo, flurocitabina, fosquidona, fostriecina, fulvestrant, gemcitabina, hidroxurea, idarrubicina, ifosfamida, ilmofosina, interleucina II (IL-2, incluyendo interleucina recombinante II o rIL2), interferón alfa-2a, interferón alfa-2b, interferón alfa-n1, interferón alfa-n3, interferón beta-la, interferón gamma-lb, iproplatino, irinotecán, lanreotida, letrozol, leuprolida, liarozol, lometrexol, lomustina, 10 losoxantrona, masoprocol, maitansina, clorhidrato de mecloretamina, megestrol, acetato de melengestrol, melfalano, menogaril, mercaptopurina, metotrexato, metoprina, meturedepa, mitindomida, mitocarcina, mitocromina, mitogilina, mitomalcina, mitomicina, mitosper, mitotano, mitoxantrona, ácido micofenólico, nelarabina, nocodazol, nogalamicina, ormaplatino, oxisuran, paclitaxel, pegaspargasa, peliomicina, pentamustina, peplomicina, perfosfamida, pipobromano, piposulfan, clorhidrato de piroxantrona, plicamicina, plomestano, porfímero, porfiromicina, 15 prednimustina, procarbazona, puromicina, pirazofurina, riboprina, roglitimida, safingol, semustina, simtrazeno, esparfosato, esparomicina, espirogermanio, espiromustina, espiroplatino, estreptonigrina, estreptozocina, sulofenur, talisomicina, tamoxifeno, tecogalano, tegafur, teloxantrona, temoporfina, tenipósido, teroxirona, testolactona, tiamiprina, tioguanina, tiotepa, tiazofurina, tirapazamina, topotecán, toremifeno, trestolona, triciribina, trimetrexato, triptorelina, tubulozol, mostaza de uracilo, uredepa, vaporetida, verteporfina, vinblastina, sulfato de vincristina, 20 vindesina, vinepidina, vinglicinato, vinleurosina, vinorelbina, vinrosidina, vinzolidina, vorozol, zeniplatino, zinostatina, zoledronato, y zorrubicina.

De acuerdo con aspectos de la presente descripción, el inmunoensayo incluye el ensayo de un fármaco antineoplásico en una muestra de prueba de fluido mediante una técnica de inmunocromatografía. En términos generales, las técnicas 25 de inmunocromatografía incluyen hacer fluir una muestra de prueba de fluido que contiene o se sospecha que contiene un analito de interés a lo largo de un soporte sólido o semisólido que incluye un anticuerpo anti-analito para detectar la unión específica del anticuerpo y el analito.

De acuerdo con aspectos de la presente descripción, el ensayo de un fármaco antineoplásico en una muestra incluye 30 la captura antigénica, tal como mediante un ensayo de flujo lateral.

Un ensayo de flujo lateral de acuerdo con los aspectos de la presente descripción incluye hacer fluir una muestra de prueba de fluido que contiene o se sospecha que contiene un fármaco antineoplásico a lo largo de un soporte sólido o semisólido que incluye un agente de unión a anti-fármaco antineoplásico para detectar la unión específica del agente 35 de unión a anti-fármaco antineoplásico y el fármaco antineoplásico en la muestra de prueba de fluido.

Un ensayo de flujo lateral de acuerdo con los aspectos de la presente descripción incluye hacer fluir una muestra de prueba de fluido obtenida a lo largo de un soporte sólido o semisólido que incluye un agente de unión a anti-fármaco antineoplásico, tal como un anticuerpo, en presencia de un competidor para detectar la competencia por la unión del 40 agente de unión a anti-fármaco antineoplásico, tal como un anticuerpo, con el fármaco antineoplásico en la muestra de prueba de fluido.

De acuerdo con aspectos de la presente descripción, un procedimiento de ensayo de flujo lateral para el ensayo de un fármaco antineoplásico incluye proporcionar: una almohadilla conjugada donde el agente de unión a anti-fármaco 45 antineoplásico marcado de forma detectable, tal como un anticuerpo, o el fármaco antineoplásico marcado de forma detectable está unido difusiblemente, la almohadilla conjugada adyacente a un soporte poroso sólido o semisólido que permite el flujo lateral de la muestra de prueba de fluido y que tiene al menos una zona de detección de prueba que incluye un reactivo de detección unido no difusiblemente y al menos una zona de control que incluye un reactivo de control unido no difusiblemente, el soporte poroso sólido o semisólido adyacente a una almohadilla absorbente que 50 promueve el flujo capilar de la muestra de prueba de fluido a lo largo de una trayectoria de flujo que incluye la almohadilla conjugada y el soporte poroso sólido o semisólido.

Un reactivo de detección unido no difusiblemente es un agente de unión a anti-fármaco antineoplásico, tal como un anticuerpo. De acuerdo con los aspectos de la presente descripción en la que la almohadilla conjugada contiene un 55 agente de unión a anti-fármaco antineoplásico marcado de forma detectable, el reactivo de detección no es competitivo con el agente de unión a anti-fármaco antineoplásico marcado de forma detectable.

Una muestra de prueba de fluido que contiene o se sospecha que contiene un fármaco antineoplásico de interés se aplica a la almohadilla conjugada. 60

De acuerdo con aspectos de la presente descripción donde se incluye un agente de unión a fármaco antineoplásico marcado de forma detectable en la almohadilla conjugada, el marcador detectable se detecta en la zona de prueba

para ensayar el fármaco antineoplásico en la muestra, y mayores cantidades de marcador detectable detectado son indicativas de mayores cantidades de fármaco antineoplásico en la muestra. De acuerdo con aspectos de la presente descripción donde se incluye un fármaco antineoplásico marcado de forma detectable en la almohadilla conjugada, el marcador detectable se detecta en la zona de prueba para ensayar el fármaco antineoplásico en la muestra de prueba  
5 de fluido, y menores cantidades de marcador detectable detectado son indicativas de mayores cantidades de fármaco antineoplásico en la muestra de prueba de fluido.

Se pueden usar uno o más estándares para asociar una cantidad de marcador detectable detectado con una cantidad de fármaco antineoplásico en una muestra.

10

La almohadilla conjugada y/o el soporte están opcionalmente bloqueados para inhibir una unión no específica. Los ejemplos no limitativos de un reactivo de bloqueo aplicado opcionalmente incluyen una solución, opcionalmente tamponada, de leche en polvo desnatada, albúmina sérica bovina al 1-5 %, e incluyendo además opcionalmente un detergente al 0,1 -0,3 %, tal como Tween® 20 o TRITON-X 100. Un ejemplo no limitativo adicional de un reactivo de  
15 bloqueo es borato 10 mM, BSA al 3 %, PVP-40 al 1 %, TRITON X-100 al 0,25 %, pH 8.

Se puede usar cualquier reacción o tampón de diluyente compatible con la muestra, los reactivos y la reacción, incluyendo, pero sin limitación, una solución salina tamponada con fosfato, acetato de amonio, tampón fosfato sódico, tampón fosfato potásico, tampón Tris-HCl y tampón tricina.

20

La almohadilla conjugada está dispuesta adyacente al soporte poroso sólido o semisólido y el soporte poroso sólido o semisólido está dispuesto adyacente a la almohadilla absorbente. De acuerdo con los aspectos de la presente descripción del dispositivo descrito, cada componente, la almohadilla conjugada, el soporte poroso sólido o semisólido y la almohadilla absorbente tienen una superficie superior sustancialmente en el mismo plano que la superficie superior  
25 de cada componente diferente. La almohadilla conjugada, el soporte poroso sólido o semisólido y la almohadilla absorbente pueden unirse para que puedan moverse como una sola unidad. Como alternativa o adicionalmente, la almohadilla conjugada, el soporte poroso sólido o semisólido y la almohadilla absorbente pueden estar todos unidos a un soporte estructural, tal como un material de apoyo para soporte y de modo que puedan moverse como una sola unidad.

30

Se puede incluir una almohadilla de muestra dispuesta adyacente a la almohadilla conjugada de manera que la muestra de prueba de fluido fluya en la dirección de la almohadilla conjugada adyacente. De acuerdo con los aspectos del dispositivo descrito, cada componente, la almohadilla de muestra, la almohadilla conjugada, el soporte poroso sólido o semisólido y la almohadilla absorbente tienen una superficie superior sustancialmente en el mismo plano que  
35 la superficie superior de cada componente diferente. La almohadilla de muestra, la almohadilla conjugada, el soporte poroso sólido o semisólido y la almohadilla absorbente pueden unirse para que puedan moverse como una sola unidad. Como alternativa o adicionalmente, la almohadilla de muestra, la almohadilla conjugada, el soporte poroso sólido o semisólido y la almohadilla absorbente pueden estar todos unidos a un soporte estructural, tal como un material de apoyo para soporte y de modo que puedan moverse como una sola unidad.

40

De acuerdo con aspectos de la presente descripción, un procedimiento de ensayo de flujo lateral para detectar un fármaco antineoplásico en una muestra de prueba de fluido es competitivo o no competitivo.

De acuerdo con los aspectos de la presente descripción, se proporciona un dispositivo de ensayo de flujo lateral que  
45 incluye 1) una almohadilla conjugada donde el anticuerpo anti-fármaco antineoplásico marcado de forma detectable o el fármaco antineoplásico marcado de forma detectable se une difusiblemente, 2) un soporte poroso sólido o semisólido que permite el flujo lateral de la muestra de prueba de fluido y que tiene al menos una zona de detección de prueba que incluye un reactivo de detección unido no difusiblemente y al menos una zona de control que incluye un reactivo de control unido no difusiblemente, y 3) una almohadilla absorbente que permite el flujo capilar de la  
50 muestra de prueba de fluido.

De acuerdo con los aspectos de la presente descripción, se proporciona un dispositivo de ensayo de flujo lateral que incluye 1) una almohadilla conjugada donde el anticuerpo anti-5-fluorouracilo marcado de forma detectable o el 5-fluorouracilo marcado de forma detectable se une difusiblemente, 2) un soporte poroso sólido o semisólido que permite  
55 el flujo lateral de la muestra de prueba de fluido y que tiene al menos una zona de detección de prueba que incluye un reactivo de detección unido no difusiblemente y al menos una zona de control que incluye un reactivo de control unido no difusiblemente, y 3) una almohadilla absorbente que permite el flujo capilar de la muestra de prueba de fluido.

De acuerdo con los aspectos de la presente descripción, se proporciona un dispositivo de ensayo de flujo lateral que  
60 incluye 1) una almohadilla conjugada donde el anticuerpo anti-paclitaxel marcado de forma detectable o el paclitaxel marcado de forma detectable se une difusiblemente, 2) un soporte poroso sólido o semisólido que permite el flujo lateral de la muestra de prueba de fluido y que tiene al menos una zona de detección de prueba que incluye un reactivo

de detección unido no difusiblemente y al menos una zona de control que incluye un reactivo de control unido no difusiblemente, y 3) una almohadilla absorbente que permite el flujo capilar de la muestra de prueba de fluido.

De acuerdo con los aspectos de la presente descripción, se proporciona un dispositivo de ensayo de flujo lateral que incluye 1) una almohadilla conjugada donde el anticuerpo anti-doxorrubicina marcado de forma detectable o la doxorrubicina marcada de manera detectable se une difusiblemente, 2) un soporte poroso sólido o semisólido que permite el flujo lateral de la muestra de prueba de fluido y que tiene al menos una zona de detección de prueba que incluye un reactivo de detección unido no difusiblemente y al menos una zona de control que incluye un reactivo de control unido no difusiblemente, y 3) una almohadilla absorbente que permite el flujo capilar de la muestra de prueba de fluido.

La figura 1 es una ilustración esquemática de un dispositivo y procedimiento para el ensayo de flujo lateral de un fármaco antineoplásico de acuerdo con aspectos de la presente descripción. La almohadilla conjugada, el soporte poroso sólido o semisólido (aquí indicado como membrana de nitrocelulosa) y la almohadilla absorbente están unidos y dispuestos adyacentes entre sí. La almohadilla conjugada, el soporte poroso sólido o semisólido y la almohadilla absorbente tienen cada uno al menos una superficie superior sustancialmente en el mismo plano que cada superficie superior diferente. Se muestra la dirección del flujo lateral. Se muestran una zona de prueba y una zona de control.

De acuerdo con aspectos de la presente descripción, un ensayo de flujo lateral competitivo incluye aspectos mostrados en la figura 1. Un primer agente de unión marcado de forma detectable capaz de unirse específicamente a un fármaco antineoplásico (aquí ilustrado por "anticuerpos marcados con oro para fármaco antineoplásico") está unido difusiblemente a la almohadilla conjugada. Una muestra de prueba de fluido que contiene o se sospecha que contiene un fármaco antineoplásico se añade a una almohadilla de muestra dispuesta adyacente a la almohadilla conjugada de modo que la muestra de prueba de fluido fluya en la dirección de la almohadilla conjugada adyacente. La muestra de prueba de fluido también puede depositarse directamente sobre la almohadilla conjugada o una porción de la almohadilla conjugada designada como la almohadilla de muestra. El fármaco antineoplásico y el primer agente de unión marcado de forma detectable capaz de unirse específicamente al fármaco antineoplásico forman un complejo en la almohadilla conjugada. El complejo, junto con cualquier primer agente de unión marcado de forma detectable no unido, se mueve mediante flujo lateral en la dirección de la zona de prueba y la zona de control. La zona de prueba contiene un fármaco antineoplásico fijado no difusiblemente en la zona de prueba. La zona de control contiene un segundo agente de unión específico para el primer agente de unión marcado de forma detectable. El exceso del primer agente de unión marcado de forma detectable capaz de unirse específicamente al fármaco antineoplásico se mueve por flujo lateral a las zonas de prueba y control. Si el exceso del primer agente de unión marcado de forma detectable se une al fármaco antineoplásico en la zona de prueba, está presente una señal detectable indicativa que varía directamente con la cantidad de fármaco antineoplásico en la muestra de prueba de fluido, donde una señal fuertemente detectable es indicativa de poco o ningún fármaco antineoplásico en la muestra, y donde la señal indetectable en la zona de prueba es indicativa de la presencia del fármaco antineoplásico en la muestra de prueba de fluido. Pueden usarse estándares para obtener resultados cuantitativos o semicuantitativos indicativos de la cantidad del fármaco antineoplásico en la muestra. La interacción del primer agente de unión marcado de forma detectable con el segundo agente de unión específico para el primer agente de unión marcado de forma detectable produce una señal detectable indicativa de un ensayo que funciona correctamente.

En el ejemplo mostrado en la figura 1, el primer agente de unión marcado de forma detectable es un anticuerpo generado en ratón y el segundo agente de unión específico para el primer agente de unión marcado de forma detectable es IgG anti-ratón de cabra. Cuando el primer agente de unión marcado de forma detectable es un anticuerpo IgG (u otro) generado en ratón, el segundo agente de unión puede ser un anticuerpo anti-IgG de ratón (u otro) en cualquier especie adecuada para generar, por ejemplo, anti-ratón de oveja, anti-ratón de conejo o anti-ratón de ratón. De forma similar, si el primer agente de unión marcado de forma detectable es un anticuerpo IgG (u otro) generado en conejo, el segundo agente de unión puede ser un anticuerpo anti-IgG de conejo (u otro) en cualquier especie adecuada para generar, por ejemplo, anti-conejo de oveja, anti-conejo de cabra o anti-conejo de ratón.

De acuerdo con aspectos de la presente descripción, un dispositivo de ensayo de flujo lateral, también denominado monitor, de la presente divulgación emplea un inmunoensayo de flujo lateral competitivo para detectar la presencia de fármacos antineoplásicos en las superficies. Un dispositivo de monitor de análisis de flujo lateral de acuerdo con los aspectos de la presente descripción incluye: 1) un anticuerpo específico para el fármaco antineoplásico a ensayar, el anticuerpo conjugado con partículas de oro en la almohadilla conjugada, y 2) una cantidad predeterminada del mismo fármaco antineoplásico conjugado con BSA está presente en la línea de prueba. Si hay un fármaco antineoplásico en la muestra aplicada a la almohadilla de muestra, se unirá a los anticuerpos conjugados con partículas de oro específicos para el fármaco y, por lo tanto, disminuirá la unión de estos anticuerpos al conjugado fármaco-BSA en la línea de prueba. Por lo tanto, una mayor cantidad de fármaco antineoplásico presente en la muestra de prueba de fluido aplicada a la almohadilla de muestra da como resultado la unión de menos partículas de oro a la línea de prueba en comparación con una muestra de prueba de fluido que contiene una cantidad menor del fármaco antineoplásico.



Dado que las partículas de oro imparten un color rojo a la línea de prueba, la intensidad del color rojo en la línea de prueba es indicativa de la cantidad del fármaco antineoplásico en una muestra, indicando menos color más fármaco. También se incluye una línea de control de acuerdo con los aspectos de la presente descripción de un dispositivo de monitor de ensayo de flujo lateral y el procedimiento de la presente descripción. La línea de control emplea una interacción de anticuerpos diferente a la línea de prueba y proporciona un control positivo para el ensayo de flujo lateral, asegurando que el dispositivo de monitor de ensayo de flujo lateral esté funcionando correctamente. Ensayo competitivo: El fármaco en solución se une a los anticuerpos marcados con oro, dando como resultado resulta una menor unión de anticuerpo al conjugado fármaco-BSA en la línea de prueba. En este ejemplo, la línea de prueba se vuelve menos intensa al aumentar la cantidad de fármaco en la muestra de prueba de fluido, mientras que la línea de control es relativamente constante, lo que indica que el dispositivo de monitor de ensayo de flujo lateral está funcionando.

El término "unido difusiblemente" se refiere a una unión o adsorción reversible de un material a la almohadilla conjugada de modo que el material se mueve con el flujo lateral cuando se pone en contacto con la muestra biológica. El término "unión no difusiblemente" se refiere a una unión de un material al soporte sólido donde un material unido no difusiblemente está inmovilizado y, por lo tanto, no se mueve con el flujo lateral cuando se pone en contacto con la muestra de prueba de fluido.

El término "zona de detección de prueba" se refiere a una región del soporte poroso sólido o semisólido donde un reactivo de detección está unido no difusiblemente. La zona de detección de prueba puede tener cualquiera de las diversas formas y tamaños configurados para permitir la determinación de la unión de un analito al reactivo de detección. Típicamente, la zona de detección de prueba es una línea de reactivo de detección unido no difusiblemente, denominada "línea de prueba".

El término "zona de control" se refiere a una región del soporte poroso sólido o semisólido donde un reactivo de control está unido no difusiblemente. La zona de control puede tener cualquiera de las diversas formas y tamaños configurados para permitir la determinación de la unión de una sustancia de control al reactivo de control. Típicamente, la zona de control es una línea de reactivo de control unido no difusiblemente, denominada "línea de control".

Un reactivo de control permite al usuario confirmar que el inmunoensayo funciona correctamente. Por ejemplo, un reactivo de control puede ser un anticuerpo que se une específicamente al anticuerpo anti-fármaco antineoplásico marcado de forma detectable.

Como se ha señalado anteriormente, de acuerdo con los aspectos de la presente descripción, la zona de prueba contiene un fármaco antineoplásico unido no difusiblemente a la zona de prueba. El fármaco antineoplásico se fija opcionalmente directamente al soporte poroso sólido o semisólido en una ubicación deseada. En una opción adicional, el fármaco antineoplásico se conjuga con un vehículo para ayudar a unir el fármaco antineoplásico al soporte en una ubicación deseada, y el conjugado vehículo-fármaco antineoplásico se une al soporte poroso sólido o semisólido. Los vehículos adecuados son moléculas aptos para la adsorción o unión covalente al soporte, incluyendo, pero sin limitación, polipéptidos tales como albúmina sérica bovina (BSA), lactoalbúmina, polilisina y hemocianina de lapa californiana.

De acuerdo con aspectos de la presente descripción, un dispositivo de ensayo de flujo lateral incluye 1) un anticuerpo anti-fármaco antineoplásico marcado de forma detectable unido difusiblemente a la almohadilla conjugada, 2) un soporte poroso sólido o semisólido que tiene una zona de detección de prueba que incluye un segundo anticuerpo anti-fármaco antineoplásico unido no difusiblemente, y 3) una almohadilla absorbente. De acuerdo con este aspecto, el anticuerpo anti-fármaco antineoplásico marcado de forma detectable unido difusiblemente a la almohadilla conjugada y el segundo anticuerpo anti-fármaco antineoplásico unido no difusiblemente al soporte poroso sólido o semisólido se unen específicamente a diferentes epítopos del fármaco antineoplásico.

De acuerdo con aspectos de la presente descripción, un dispositivo de ensayo de flujo lateral incluye 1) un epítipo de fármaco antineoplásico marcado de forma detectable unido difusiblemente a la almohadilla conjugada, 2) un soporte poroso sólido o semisólido que tiene una zona de detección de prueba que incluye un anticuerpo anti-fármaco antineoplásico unido no difusiblemente, y 3) una almohadilla absorbente. De acuerdo con este aspecto, el epítipo de fármaco antineoplásico marcado de forma detectable unido difusiblemente a la almohadilla conjugada se une específicamente al anticuerpo anti-fármaco antineoplásico unido no difusiblemente al soporte poroso sólido o semisólido y, por lo tanto, compete con el fármaco antineoplásico en una muestra de prueba de fluido.

La almohadilla de muestra es un material que facilita el flujo lateral de la muestra de prueba de fluido a la almohadilla conjugada adyacente y que no interfiere con el flujo lateral del fármaco antineoplásico a ensayar, incluyendo, pero sin limitación, fibra de vidrio, fibra de vidrio unida, poliéster, celulosa y derivados de celulosa que incluyen acetato de celulosa y nitrocelulosa, nylon, fluoruro de polivinilideno, polietileno, policarbonato, polipropileno, polietersulfona y

combinaciones de cualquiera de estos.

La almohadilla conjugada es un material al que se puede unir difusiblemente un agente de unión a fármaco antineoplásico marcado de forma detectable incluyendo, pero sin limitación, fibra de vidrio, fibra de vidrio unida, 5 poliéster, celulosa y derivados de celulosa que incluyen acetato de celulosa y nitrocelulosa, nylon, fluoruro de polivinilideno, polietileno, policarbonato, polipropileno, polietersulfona y combinaciones de cualquiera de estos.

El soporte poroso sólido o semisólido puede ser cualquier material poroso adsorbente sólido o semisólido adecuado para aplicaciones de cromatografía incluyendo, pero sin limitación, fluoruro de polivinilideno, nylon, polietersulfona, 10 poliéster, polipropileno, papel, sílice, rayón, celulosa y derivados de celulosa que incluyen acetato de celulosa y nitrocelulosa, fibras naturales o sintéticas tejidas o no tejidas y geles porosos tales como agarosa, gelatina, dextrano y gel de sílice. El soporte poroso sólido o semisólido puede ser autoportante, tal como una membrana, o puede depositarse sobre un soporte estructural, tal como una capa fina de agarosa depositada sobre un portaobjetos de vidrio. De acuerdo con aspectos de la descripción, el soporte poroso sólido o semisólido es una membrana de 15 nitrocelulosa.

La almohadilla absorbente es un material absorbente que facilita el flujo lateral al absorber el fluido incluyendo, pero sin limitación, un polímero sintético o natural absorbente, tal como celulosa.

20 Un soporte estructural al que están unidas la almohadilla de muestra, la almohadilla conjugada, el soporte poroso sólido o semisólido y/o la almohadilla absorbente puede ser cualquier material que proporcione soporte, incluyendo, pero sin limitación, una cartulina de soporte, vidrio, sílice, cerámica y/o membrana de plástico. Se puede usar un adhesivo para unir la almohadilla conjugada, el soporte poroso sólido o semisólido y/o la almohadilla absorbente al soporte estructural.

25 Se incluye opcionalmente un alojamiento para encerrar, al menos parcialmente, la almohadilla de muestra, la almohadilla conjugada, el soporte poroso sólido o semisólido y la almohadilla absorbente. El alojamiento define opcionalmente una o más aberturas, tal como para la aplicación de una muestra a ensayar para un fármaco antineoplásico, visualización u otro análisis de resultados de prueba y/o control. El alojamiento define una abertura 30 para la inserción y extracción de la almohadilla de muestra, la almohadilla conjugada, el soporte poroso sólido o semisólido y la almohadilla absorbente.

El alojamiento define opcionalmente aberturas para permitir al usuario visualizar directamente los resultados del ensayo. Como alternativa, el alojamiento puede incluir un dispositivo de detección, tal como un escáner óptico, para 35 la detección de los resultados del ensayo.

La detección de un resultado de ensayo se puede lograr mediante observación visual y/o el uso de un dispositivo de detección, tal como un lector electrónico. Un lector electrónico utilizado para detectar los resultados de un ensayo de flujo lateral está configurado para detectar el marcador o marcadores detectables utilizados en el ensayo. Por lo tanto, 40 por ejemplo, cuando el marcador detectable son partículas de oro, tal como oro coloidal, o partículas de látex coloreadas, se puede usar una cámara de dispositivo de carga acoplada (CCD) para detectar la señal del marcador detectable. En un ejemplo adicional, cuando el marcador detectable es fluorescente, se puede usar una fuente de excitación adecuada y un sensor de la señal emitida resultante. Un lector electrónico puede generar datos para el análisis utilizando uno o más procedimientos implementados por ordenador. El lector electrónico puede incluir 45 componentes de hardware y software para procedimientos implementados por ordenador para analizar los resultados del ensayo de flujo lateral detectados.

La muestra de prueba de fluido fluye por acción capilar a una línea de control y una línea de prueba que tienen agentes de unión, preferentemente anticuerpos, dispuestos a una concentración precisa determinada mediante experimentos 50 de validación. La línea de control es un control de calidad interno que garantiza que la muestra haya migrado adecuadamente y valida el ensayo. La línea de prueba determina un resultado positivo o negativo para el analito analizado.

Los ensayos de unión incluyen el uso de un agente de unión para detectar un analito.

55 El término "agente de unión", como se usa en el presente documento, se refiere a un agente caracterizado por una unión sustancialmente específica a una sustancia especificada. La expresión "unión sustancialmente específica" y equivalentes gramaticales, como se usa en el presente documento en referencia a la unión de un agente de unión a una sustancia especificada, se refiere a la unión del agente de unión a la sustancia especificada sin unión sustancial 60 a otras sustancias presentes en una muestra a ensayar para determinar la presencia de la sustancia especificada. El experto en la técnica entiende que la unión específica se refiere a la unión específica como determinable mediante el uso de controles apropiados para distinguirla de la unión no específica.

Los agentes de unión sustancialmente específicos para fármacos antineoplásicos pueden obtenerse de fuentes comerciales o generarse para su uso en procedimientos de la presente descripción de acuerdo con metodologías bien conocidas.

5

El término "unión" se refiere a una interacción física o química entre un agente de unión y el objetivo. La unión incluye, pero sin limitación, unión iónica, unión no iónica, unión covalente, unión de hidrógeno, interacción hidrófoba, interacción hidrófila e interacción de Van der Waals.

10 El ensayo de un fármaco antineoplásico en una muestra de prueba de fluidos de acuerdo con aspectos de la presente descripción puede incluir la detección de un marcador detectable unido directa o indirectamente al fármaco antineoplásico. El término "marcador detectable" se refiere a cualquier átomo o resto que pueda proporcionar una señal detectable y que pueda unirse a un agente de unión o analito. Los ejemplos de dichos marcadores detectables incluyen restos fluorescentes, restos quimioluminiscentes, restos bioluminiscentes, ligandos, partículas, partículas magnéticas, partículas fluorescentes, oro coloidal, enzimas, sustratos enzimáticos, radioisótopos y cromóforos. Los procedimientos para unir directa o indirectamente un marcador detectable a un fármaco antineoplásico se conocen bien en la técnica.

15

Se usa cualquier procedimiento apropiado, incluyendo, pero sin limitación, uno espectroscópico, óptico, fotoquímico, bioquímico, enzimático, eléctrico y/o inmunológico, para detectar un marcador detectable en un ensayo descrito en el presente documento.

Se proporcionan composiciones y procedimientos de acuerdo con los aspectos de la presente descripción donde un agente de unión es un anticuerpo anti-fármaco antineoplásico caracterizado por una unión sustancialmente específica para el fármaco antineoplásico. Se proporcionan composiciones y procedimientos de acuerdo con aspectos de la presente descripción donde un agente de unión es un anticuerpo anti-5-fluorouracilo caracterizado por una unión sustancialmente específica para 5-fluorouracilo (5-FU o FU). Se proporcionan composiciones y procedimientos de acuerdo con los aspectos de la presente descripción donde un agente de unión es un anticuerpo anti-paclitaxel caracterizado por una unión sustancialmente específica para paclitaxel. Se proporcionan composiciones y procedimientos de acuerdo con los aspectos de la presente descripción donde un agente de unión es un anticuerpo anti-doxorrubicina caracterizado por una unión sustancialmente específica para doxorrubicina.

25

El término "anticuerpo" se usa en el presente documento en su sentido más amplio e incluye anticuerpos individuales y mezclas de anticuerpos caracterizados por una unión sustancialmente específica a un antígeno. Un anticuerpo proporcionado de acuerdo con las composiciones y procedimientos es ilustrativamente un anticuerpo policlonal, un anticuerpo monoclonal, un anticuerpo quimérico, un anticuerpo humanizado, y/o un fragmento de anticuerpo de unión a antígeno, por ejemplo. El término anticuerpo se refiere a una inmunoglobulina intacta estándar que tiene cuatro cadenas de polipéptidos que incluyen dos cadenas pesadas (H) y dos cadenas ligeras (L) unidas por enlaces disulfuro en realizaciones particulares de la presente descripción. Los fragmentos de anticuerpos de unión a antígeno incluyen ilustrativamente un fragmento Fab, un fragmento Fab', un fragmento F(ab')<sub>2</sub>, un fragmento Fd, un fragmento Fv, un fragmento scFv y un anticuerpo de dominio (dAb), por ejemplo. Además, el término anticuerpo se refiere a anticuerpos de diversas clases que incluyen IgG, IgM, IgA, IgD e IgE, así como a subclases, que incluyen ilustrativamente, por ejemplo, las subclases humanas IgG1, IgG2, IgG3 e IgG4 y las subclases murinas IgG1, IgG2, IgG2a, IgG2b, IgG3 e IgGM, por ejemplo.

30

En realizaciones particulares de la presente descripción, un anticuerpo que está caracterizado por una unión sustancialmente específica tiene una constante de disociación, K<sub>d</sub>, menor de aproximadamente 10<sup>-7</sup> M, tal como menor de aproximadamente 10<sup>-8</sup> M, menor de aproximadamente 10<sup>-9</sup> M o menor de aproximadamente 10<sup>-10</sup> M, o menos dependiendo de la composición específica. La afinidad de unión de un anticuerpo puede determinarse mediante análisis de Scatchard tal como se describe en P.J. Munson y D. Rodbard, Anal. Biochem., 107:220-239, 1980 o por otros procedimientos tal como el análisis de interacción biomolecular usando resonancia por plasmones.

35

Los anticuerpos y los procedimientos para la preparación de anticuerpos se conocen bien en la técnica.

55 En términos generales, un inmunógeno, tal como una proteína, péptido, fármaco antineoplásico, o una porción inmunógena de los mismos, se administra a un animal en procedimientos particulares, tales como un conejo, cabra, ratón, rata, oveja o pollo, y las inmunoglobulinas producidas en el animal se obtienen del animal y, opcionalmente, se purifican para su cribado y uso.

60 Un inmunógeno, tal como una proteína, péptido, fármaco antineoplásico, o porciones inmunógenas de los mismos, usado para generar anticuerpos específicos para el inmunógeno puede conjugarse con un vehículo, tal como hemocianina de lapa californiana o albúmina sérica bovina.

Los detalles de los procedimientos de generación de anticuerpos y cribado de anticuerpos generados para la unión sustancialmente específica a un antígeno se describen en referencias estándar tales como E. Harlow y D. Lane, *Antibodies: A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1988; F. Breitling y S. Dübel, *Recombinant Antibodies*, John Wiley & Sons, Nueva York, 1999; H. Zola, *Monoclonal Antibodies: Preparation and Use of Monoclonal Antibodies and Engineered Antibody Derivatives, Basics: From Background to Bench*, BIOS Scientific Publishers, 2000; y B.K.C. Lo, *Antibody Engineering: Methods and Protocols*, Methods in Molecular Biology, Humana Press, 2003.

Pueden usarse anticuerpos monoclonales en los ensayos de acuerdo con aspectos de la presente descripción. Los anticuerpos monoclonales se preparan usando técnicas conocidas en la técnica, tal como se describe en E. Harlow y D. Lane, *Antibodies: A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1988; F. Breitling y S. Dübel, *Recombinant Antibodies*, John Wiley & Sons, Nueva York, 1999; H. Zola, *Monoclonal Antibodies: Preparation and Use of Monoclonal Antibodies and Engineered Antibody Derivatives, Basics: From Background to Bench*, BIOS Scientific Publishers, 2000; y B.K.C. Lo, *Antibody Engineering: Methods and Protocols*, Methods in Molecular Biology, Humana Press, 2003, por ejemplo. Los anticuerpos monoclonales de acuerdo con la presente descripción y/o usados en procedimientos de acuerdo con la presente descripción se producen mediante técnicas que incluyen, de manera ilustrativa, pero sin limitación, técnicas de hibridoma, metodología de ácido nucleico recombinante y/o aislamiento de una biblioteca de fagos, por ejemplo como se describe en las referencias citadas anteriormente. Los anticuerpos monoclonales se usan ventajosamente en realizaciones particulares de la presente descripción debido a la especificidad de la unión de anticuerpos monoclonales que reconocen un único epítipo.

Los procedimientos particulares de preparación de anticuerpos monoclonales incluyen la obtención de células esplénicas de un animal inmunizado con un inmunógeno y la fusión de los linfocitos secretores de anticuerpos con mieloma o células transformadas para obtener una célula de hibridoma capaz de replicarse indefinidamente en cultivo.

Los anticuerpos obtenidos se prueban para determinar la unión sustancialmente específica al inmunógeno mediante procedimientos que incluyen, de forma ilustrativa, ELISA, Western blot, e inmunocitoquímica.

#### **Puntos**

Un procedimiento para detectar la contaminación por fármacos antineoplásicos de una superficie que comprende: proporcionar una solución humectante compatible con el fármaco antineoplásico y formulada para promover la liberación del fármaco de la superficie a ensayar, proporcionar una matriz sólida para la absorción reversible del fármaco antineoplásico; poner en contacto la matriz sólida con la solución humectante, generando una matriz de ensayo; poner en contacto la matriz de ensayo y la superficie, generando una muestra de superficie; poner en contacto la muestra de superficie con un volumen de solución humectante, generando una muestra de prueba de fluido; ensayar el fármaco antineoplásico en la muestra de prueba de fluido mediante un ensayo de flujo lateral para producir un resultado de ensayo; y detectar el resultado del ensayo, detectando así la contaminación por fármacos antineoplásicos de la superficie.

El procedimiento del punto 1, que comprende además comparar el resultado del ensayo con un estándar.

El procedimiento del punto 1 o 2, donde el fármaco antineoplásico se selecciona del grupo que consiste en: doxorubicina, paclitaxel y 5-fluorouracilo.

El procedimiento de cualquiera de los puntos 1-3, donde el ensayo de flujo lateral comprende: proporcionar un dispositivo de ensayo de flujo lateral, comprendiendo el dispositivo una almohadilla conjugada, un soporte poroso sólido o semisólido adyacente a la almohadilla conjugada, una zona de prueba presente en el soporte y una zona de control presente en el soporte, donde la almohadilla conjugada comprende un agente de unión a fármaco antineoplásico marcado de forma detectable unido difusiblemente, donde la zona de detección de prueba comprende un reactivo de detección unido no difusiblemente y la zona de control comprende un reactivo de control unido no difusiblemente, el soporte poroso sólido o semisólido adyacente a una almohadilla absorbente que promueve el flujo capilar de la muestra de prueba de fluido a lo largo de una trayectoria de flujo que incluye la almohadilla conjugada y el soporte poroso sólido o semisólido.

El procedimiento del punto 4, donde el agente de unión a fármaco antineoplásico es un anticuerpo anti-fármaco antineoplásico.

El procedimiento del punto 5, donde el anticuerpo anti-fármaco antineoplásico se selecciona del grupo que consiste en: un anticuerpo anti-5-fluorouracilo, un anticuerpo anti-paclitaxel y un anticuerpo anti-doxorubicina.

El procedimiento de cualquiera de los puntos 4-6, donde el reactivo de detección es el fármaco neoplásico.

El procedimiento de cualquiera de los puntos 4-7, donde el reactivo de control se une específicamente al anticuerpo anti-fármaco antineoplásico.

- 5 El procedimiento de cualquiera de los puntos 4-8, donde el reactivo de control es un anticuerpo que se une específicamente al anticuerpo anti-fármaco antineoplásico.

El procedimiento de cualquiera de los puntos 4-9, donde el dispositivo de ensayo de flujo lateral comprende además un alojamiento que encierra, al menos parcialmente, la almohadilla conjugada, el soporte poroso sólido o semisólido,  
10 y/o la almohadilla absorbente.

El procedimiento de cualquiera de los puntos 1-10, donde la detección del resultado del ensayo comprende observación visual.

- 15 El procedimiento de cualquiera de los puntos 1-10, donde la detección del resultado del ensayo comprende la operación del lector electrónico.

El procedimiento de cualquiera de los puntos 1-12, donde la solución humectante comprende un tampón biológicamente compatible, el 0,01 - 10 % v/v de un tensioactivo y/o el 0,01 - 10 % v/v de un disolvente orgánico.

- 20 El procedimiento del punto 13, donde el disolvente orgánico es un disolvente prótico polar orgánico.

El procedimiento del punto 13 o 14, donde el tensioactivo es un tensioactivo no iónico.

- 25 Un dispositivo de ensayo de flujo lateral para detectar un fármaco antineoplásico, que comprende: una almohadilla conjugada, un soporte poroso sólido o semisólido adyacente a la almohadilla conjugada, una zona de prueba presente en el soporte y una zona de control presente en el soporte, donde la almohadilla conjugada comprende un agente de unión a fármaco antineoplásico marcado de forma detectable unido difusiblemente, donde la zona de detección de prueba comprende un reactivo de detección unido no difusiblemente y la zona de control comprende un reactivo de control unido no difusiblemente, el soporte poroso sólido o semisólido adyacente a una almohadilla absorbente que promueve el flujo capilar de la muestra de fluido a lo largo de una trayectoria de flujo que incluye la almohadilla conjugada y el soporte poroso sólido o semisólido.

El dispositivo del punto 16, donde el agente de unión a fármaco antineoplásico es un anticuerpo anti-fármaco  
35 antineoplásico.

El dispositivo del punto 17, donde el anticuerpo anti-fármaco antineoplásico se selecciona del grupo que consiste en: un anticuerpo anti-5-fluorouracilo, un anticuerpo anti-paclitaxel y un anticuerpo anti-doxorrubicina.

- 40 El dispositivo de cualquiera de los puntos 16-18, donde el reactivo de detección es el fármaco neoplásico.

El dispositivo de cualquiera de los puntos 16-19, donde el reactivo de control se une específicamente al anticuerpo anti-fármaco antineoplásico.

- 45 El dispositivo de cualquiera de los puntos 16-20, donde el reactivo de control es un anticuerpo que se une específicamente al anticuerpo anti-fármaco antineoplásico.

El dispositivo de cualquiera de los puntos 16-21, que comprende además una muestra de fluido que se sospecha que contiene un fármaco antineoplásico.

- 50 El dispositivo de cualquiera de los puntos 16-22, que comprende además un alojamiento que encierra, al menos parcialmente, la almohadilla conjugada, el soporte poroso sólido o semisólido y/o la almohadilla absorbente.

Un kit para detectar la contaminación por fármacos antineoplásicos de una superficie, que comprende: una solución humectante compatible con el fármaco antineoplásico y formulada para promover la liberación del fármaco de la superficie a ensayar; una matriz sólida para la absorción reversible del fármaco antineoplásico; y un dispositivo de flujo lateral que comprende: un agente de unión específico para el fármaco antineoplásico; y un reactivo de control.

- 60 El kit del punto 24, donde el dispositivo de ensayo de flujo lateral comprende: una almohadilla conjugada, un soporte poroso sólido o semisólido adyacente a la almohadilla conjugada, una zona de prueba presente en el soporte y una zona de control presente en el soporte, donde el agente de unión es un agente de unión a fármaco antineoplásico marcado de forma detectable unido difusiblemente a una almohadilla conjugada, donde la zona de detección de prueba

comprende un reactivo de detección unido no difusiblemente y el reactivo de control está unido no difusiblemente a una zona de control, el soporte poroso sólido o semisólido adyacente a una almohadilla absorbente que promueve el flujo capilar de la muestra de prueba de fluido a lo largo de una trayectoria de flujo que incluye la almohadilla conjugada y el soporte poroso sólido o semisólido.

5 El kit del punto 25, donde el agente de unión a fármaco antineoplásico marcado de forma detectable es un anticuerpo anti-fármaco antineoplásico.

10 El kit del punto 26, donde el anticuerpo anti-fármaco antineoplásico se selecciona del grupo que consiste en: un anticuerpo anti-5-fluorouracilo, un anticuerpo anti-paclitaxel y un anticuerpo anti-doxorrubicina.

El kit de cualquiera de los puntos 25-27, donde el reactivo de detección es el fármaco neoplásico.

15 El kit de cualquiera de los puntos 25-28, donde el reactivo de control se une específicamente al anticuerpo anti-fármaco antineoplásico.

El kit de cualquiera de los puntos 25-29, donde el reactivo de control es un anticuerpo que se une específicamente al anticuerpo anti-fármaco antineoplásico.

20 El kit de cualquiera de los puntos 24-30, que comprende además un alojamiento que encierra, al menos parcialmente, la almohadilla conjugada, el soporte poroso sólido o semisólido y/o la almohadilla absorbente.

El kit de cualquiera de los puntos 24-31, donde la solución humectante comprende un tampón biológicamente compatible, el 0,01 - 10 % v/v de un tensioactivo y/o el 0,01 - 10 % v/v de un disolvente orgánico.

25 El kit del punto 32, donde el disolvente orgánico es un disolvente prótico polar orgánico.

El kit del punto 32 o 33, donde el tensioactivo es un tensioactivo no iónico.

30 Los aspectos de los dispositivos, kits y procedimientos descritos se ilustran en los ejemplos en el presente documento.

## Ejemplos

### Reactivos y monitor

35 Los anticuerpos y los conjugados fármaco-BSA usados en este ejemplo fueron desarrollados por Saladax Biomedical (Bethlehem, PA) y fueron adquiridos en Saladax Biomedical y Lampire Biological Laboratories (Pipersville, PA). Los hisopos de algodón eran el modelo Puritan 806-WC (Puritan, Guilford, ME). El 5-fluorouracilo (5-FU  $\geq 99$  %, número de producto F6627-1G) y el monolaurato de polioxietilensorbitán (Tween 20, número de producto P-1379) se adquirieron en Sigma-Aldrich (St. Louis, MO). El hidróxido de amonio concentrado (producto A669-500) era de Fisher Scientific (Fair Lawn, NJ).

### Preparación de la solución de 5-FU

45 La solución madre de 5-FU se preparó disolviendo una cantidad pesada de 5-FU entre 10 y 25 mg en 1 ml de hidróxido de amonio concentrado. Las soluciones de enriquecimiento se prepararon diluyendo la solución madre en acetato de amonio 10 mM según se requería para producir las concentraciones deseadas de 5-FU. Esto permitió que se aplicara un rango de niveles de enriquecimiento de 5-FU utilizando volúmenes de enriquecimiento idénticos, por lo que todas las baldosas se secarían por igual antes de limpiarse. Se prepararon soluciones madre similares de paclitaxel o doxorubicina para su uso como controles de tampón de muestreo enriquecido o para pruebas de muestreo de superficie.

### Muestreo de superficie

55 El procedimiento de muestreo de superficie fue desarrollado para ser conveniente y rápido. Se enriquecieron baldosas de baño de cerámica, baldosas para suelo de vinilo, as baldosas compuestas para encimeras, baldosas de acero inoxidable y las baldosas de vidrio de 100 cm<sup>2</sup> de área con 50  $\mu$ l de solución de enriquecimiento para dar 0, 5, 10, 25, 50 o 100 ng de carga de superficie de 5-FU (tres baldosas en cada nivel) y se dejaron secar durante 2 horas. Cada 100 cm<sup>2</sup> de superficie se limpió completamente con un hisopo de algodón humedecido en un vial que contenía 1 ml de tampón de muestreo (acetato de amonio 10 mM acuoso-Tween 20 al 1 % (v/v)) primero en una dirección ascendente y descendente, a continuación lateralmente, y finalmente repitiendo la dirección de limpieza ascendente y descendente. A continuación, el hisopo se devolvió al vial que contenía el tampón de muestreo, se agitó

vigorosamente durante 2 minutos y se aplicó una alícuota de 75 µl del extracto resultante al monitor farmacológico de flujo lateral (dos para cada uno de los extractos).

Se siguió el mismo procedimiento para las pruebas de muestreo de superficie usando paclitaxel o doxorubicina.

5

### Pruebas de monitor

Los monitores se analizaron con muestras producidas limpiando la superficie de las baldosas enriquecidas con hisopos de algodón y extrayendo los hisopos como se ha descrito en la última sección. Además, los monitores se analizaron con muestras de control preparadas (1) enriqueciendo directamente el tampón de muestreo con una solución de enriquecimiento, y (2) enriqueciendo directamente los hisopos que se extrajeron a continuación. Los controles de tampón enriquecido demuestran el rendimiento de los monitores sin pérdidas de recuperación o artefactos de interferencia de los hisopos o superficies limpiadas. Los controles de hisopo enriquecido permiten aislar y evaluar la contribución de los medios de limpieza al rendimiento del procedimiento (por ejemplo, extracción incompleta de 5-FU de los hisopos). Para los controles de tampón enriquecido, se añadieron 50 µl de la solución de enriquecimiento apropiada a 950 µl de tampón de muestreo para producir 0, 5, 10, 25, 50 o 100 ng/ml de 5-FU. Se aplicó una alícuota de 75 µl del extracto resultante al monitor farmacológico de flujo lateral. Para los controles de hisopo enriquecido, los hisopos de algodón se enriquecieron directamente con 50 µl de soluciones de enriquecimiento de 5-FU (una por nivel de enriquecimiento) y se extrajeron con 950 µl de tampón de muestreo utilizando el mismo procedimiento utilizado para los hisopos de los estudios de limpieza de baldosas. Se aplicó una alícuota de 75 µl del extracto resultante al monitor farmacológico de flujo lateral. Se analizó un material de baldosa cada día, y se constituyó un nuevo conjunto de soluciones de enriquecimiento de 5-FU para preparar cada nuevo conjunto de baldosas enriquecidas, controles de tampón enriquecido para ese día y controles de hisopo enriquecido.

Se usaron tres monitores con soluciones tampón de muestreo enriquecido y soluciones de hisopo enriquecido. La respuesta de los monitores se evaluó utilizando un lector electrónico de flujo lateral (modelo Hamamatsu 10066) que leyó la intensidad de las líneas de prueba y de control. También se utilizó un procedimiento de lectura visual donde la intensidad de la línea de prueba se comparó con la línea de control. Si la línea de control era más intensa que la línea de prueba, entonces se determinó que la masa estaba por encima del umbral. Por lo tanto, los monitores se evaluaron para determinar los resultados semicuantitativos usando el lector y determinar los resultados cualitativos usando la comparación de líneas visual. La respuesta para la lectura electrónica y visual se determinó 5, 10 y 15 minutos después de añadir una solución a los monitores.

Se siguió el mismo procedimiento para las pruebas con paclitaxel o doxorubicina.

35

### LC-MS/MS

El monitor de flujo lateral se desarrolló usando una solución salina tamponada con fosfato (PBS) 10 mM-Tween 20 al 1 % como tampón de muestreo. Sin embargo, se encontró que PBS-Tween al 1 % era incompatible con el uso de un procedimiento LC-MS/MS y, por lo tanto, se usó acetato de amonio 10 mM-Tween 20 al 1 % como tampón de muestreo. El acetato de amonio 10 mM-Tween 20 al 1 % dio resultados casi equivalentes al PBS-Tween al 1 % con los monitores de flujo lateral y permitió que las mismas soluciones que se usaron en el ensayo de flujo lateral se analizaran directamente por LC-MS/MS. Esto fue una ventaja, ya que será difícil garantizar que las soluciones separadas para el análisis de flujo lateral y el análisis por LC-MS/MS sean equivalentes.

45

El procedimiento LC-MS/MS se desarrolló para medir el 5-FU directamente en el tampón de muestreo de acetato de amonio 10 mM-Tween 20 al 1 % utilizado para los monitores de flujo lateral.

Las condiciones cromatográficas utilizadas permitieron una separación adecuada del analito 5-FU del Tween y otros componentes.

50

La columna HPLC utilizada fue Waters YMC-ODS-AQ, 2,0 x 250 mm, 5 µm, (Waters Pieza N.º AQ12S052502WT, Waters Corp, Milford, MA) procesada a 30 °C. El caudal de la fase móvil fue de 0,280 ml/min con los componentes de la fase móvil A y B (acetato de amonio A-2 mM, acuoso, B-metanol). Se usó un gradiente de estos componentes de la siguiente manera:

55

Isocrático al 95 % de A, 5 % de B	0 - 4,5 min
Gradiente al 5 % de A, 95 % de B	4,5 - 5,5 min, aumento lineal
Isocrático al 5% de A, 95% de B	5,5 - 11 min
Gradiente al 95% de A, 5% de B	11 - 12 min, aumento lineal

Isocrático al 95 % de A, al 5 % de B (re-equilibrio)	12 - 17 min
--	-------------

Se inyectaron 15 µl de muestra en la columna y el tiempo de elución del analito de 5-fluorouracilo fue de aproximadamente 4,5 min con un tiempo de procesamiento total de 17 minutos, incluido el reequilibrio. El espectrómetro de masas (Micromass Quattro LC (Waters Corp)) se hizo funcionar en el modo de ionización de ión negativo por electronebulización y se empleó un cuádrupolo triple para realizar una monitorización de reacción múltiple para las siguientes transiciones:

- 5-fluorouracilo (analito): masa-carga (m/z) 129 a 42  
 10 5-fluorouracil-<sup>15</sup>N<sub>2</sub> (Patrón interno a 20 ng/ml de nivel): m/z 131 a 43)

Las transiciones se midieron con un tiempo de permanencia de 200 ms para cada transición. El voltaje capilar de la electronebulización fue de 500 V, el voltaje del cono fue de 30 V y la energía de colisión de fragmentación fue de 14 eV para ambas transiciones. El rango de calibración lineal validado fue de 0-250 ng/ml de 5-FU en tampón de muestreo, lo que permitió analizar todas las muestras de prueba sin dilución previa. Los límites de detección y cuantificación evaluados utilizando un gráfico de regresión generado a partir de estándares de 5FU de bajo nivel preparados en el tampón de muestreo fueron de 0,30 y 0,84 ng/ml, equivalentes a 0,30 y 0,84 ng en muestras de prueba de 1 ml.

- 20 Las condiciones cromatográficas utilizadas permitieron una separación adecuada del analito 5-FU del Tween 20 y otros componentes. El límite de detección (LOD) fue de 0,3 ng/ml y el límite de cuantificación (LOQ) fue de 0,84 ng/ml con una precisión del 3 % o mejor para las soluciones enriquecidas en el rango dinámico lineal de calibración demostrado de 0-250 ng/ml. El análisis por LC-MS/MS se calibró con soluciones estándar preparadas en tampón de muestreo por el analista del análisis por LC-MS/MS del laboratorio contratado Bureau Veritas North America (BVNA).  
 25 El análisis por LC-MS/MS se hizo en soluciones de tampón de muestreo enriquecido, hisopos enriquecidos y baldosas enriquecidas a 0, 10, 25 y 100 ng.

#### Interpretación de los datos

- 30 Como se ha mencionado anteriormente, la respuesta de los monitores se evaluó tanto con el lector electrónico como con la interpretación visual.

#### Lector electrónico

- 35 Las intensidades de las líneas del lector electrónico se trataron de dos maneras. El % de B/Bo (donde B es la intensidad de la línea de prueba a una masa dada y Bo es la intensidad de la línea de prueba a una masa 0) se calculó y se representó frente a la masa enriquecida de 5-FU para los controles de tampón enriquecido, los controles de hisopo enriquecido, y las muestras de baldosa enriquecida, o para paclitaxel y doxorubicina para controles de tampón enriquecido y muestras de baldosa enriquecida. El % de B/Bo para todos los tipos de muestra se ajustó frente al logaritmo de la masa enriquecida para producir una curva de calibración. La relación entre la intensidad de la línea de control y la intensidad de la línea de prueba (relación C/T) también se calculó y se representó directamente frente a la masa enriquecida para producir también una segunda curva de calibración. La evaluación de la "bondad de ajuste" de las curvas de % de B/Bo frente a masa logarítmica y C/T frente a masa se investigó evaluando el ajuste de los datos estándar al modelo de % de B/Bo o C/T mediante "recuperación de estándares" (Nix y Wild, 2001), calculado mediante la evaluación de los resultados interpolados de cada masa ajustada (observada) y comparándola con la masa de cada fármaco antineoplásico enriquecido (masa esperada). La masa recuperada se calculó para los hisopos enriquecidos y las baldosas enriquecidas calculando la masa recuperada en cada punto de calibración utilizando las curvas ajustadas de % de B/Bo y C/T para los controles de tampón de muestreo enriquecido y la respuesta de % de B/Bo y C/T para las soluciones de los controles de hisopo enriquecido y muestras de baldosa enriquecida.

50

#### Interpretación visual

- La interpretación visual implicó la evaluación de si la línea de control (C) o la línea de prueba (T) determinaban visualmente qué línea era más intensa. Si se consideró que las líneas eran iguales, entonces se usó (=). Si se consideró que las líneas eran casi iguales pero la línea de prueba era ligeramente más brillante, se usó (T=), y si la línea de control era ligeramente más brillante, entonces se usó (C=).

#### Validación por LC-MS/MS

- 60 Para la validación por LC-MS/MS, las masas medidas a través del procedimiento LC-MS/MS se correlacionaron con



las masas enriquecidas conocidas para soluciones de control de tampón enriquecido, controles de hisopo enriquecido y muestras de baldosas. La masa recuperada medida con los monitores de flujo lateral también se correlacionó con la masa medida a través de LC-MS/MS.

**5 Inmunoensayos de flujo lateral**

Cabe apreciar que todos los datos presentados son durante 15 min después de añadir la solución a los monitores; los datos obtenidos a los 5 min y 10 min después de añadir la solución a los monitores dan resultados similares para el % de B/Bo.

10

**Muestras de control de tampón de muestreo enriquecido**

La figura 2A es un gráfico que muestra la respuesta del monitor de flujo lateral para un tampón de muestreo enriquecido como % de B/Bo. El tampón de muestreo se enriqueció con masas crecientes de 5-FU y la respuesta de los monitores se midió y se presentó como el % de B/Bo, donde B es la respuesta a una masa dada y Bo es la respuesta a una masa 0. La figura 2B es un gráfico que muestra la respuesta del monitor de flujo lateral para el tampón de muestreo enriquecido como una relación C/T. El tampón de muestreo se enriqueció con masas crecientes de 5-FU y la respuesta de los monitores se midió y se presentó como la relación C/T, donde C es la intensidad de la línea de control y T es la intensidad de la línea de prueba.

20

Los datos mostrados en las figuras 2A y 2B son el promedio de los cinco conjuntos de muestras de control de tampón enriquecido, cada uno de los cuales se preparó y se analizó para acompañar uno de los estudios de limpieza de baldosas realizados en cinco superficies diferentes. El % de B/Bo muestra un % de B/Bo promedio del 67 % a 5 ng de 5-FU enriquecido con un VC de aproximadamente el 10 %, lo que indica que esta cantidad es detectable cuando se enriquece directamente el tampón de muestreo. La relación C/T se ajustó con una línea recta en función de la masa enriquecida que muestra una buena correlación. El % de B/Bo se ajustó frente al logaritmo de concentración, y este ajuste se usó para volver a calcular la masa observada en cada uno de los puntos. Asimismo, la curva C/T ajustada se usó para calcular de nuevo la masa observada.

25

La figura 2C es un gráfico que muestra la (masa observada) en función de la masa esperada utilizando curvas de % de B/Bo y C/T que indican un buen ajuste para los datos. La recuperación de los estándares se calculó representando los resultados interpolados de las curvas ajustadas de % de B/Bo frente a la masa logarítmica o C/T frente a la masa (la masa observada) frente a la masa de 5-FU enriquecido en el tampón (la masa esperada). La curva de respuesta se puede modelar con el % de B/Bo frente a la masa enriquecida logarítmica o C/T frente a la masa enriquecida y ambos dan una buena correlación de la masa observada frente a la esperada.

35

La buena correlación (pendiente = 1,01, intersección = -0,23,  $R^2 = 0,9999$ ) = de la medición LC-MS/MS con la masa enriquecida de 5-FU para los controles de tampón enriquecido indica que la técnica de enriquecimiento utilizada para preparar muestras de prueba internas para esta investigación fue precisa, véase la Tabla IIIA. También indica que, aunque los estándares de calibración preparados para el análisis por LC-MS usaban un suministro de 5FU diferente al de las muestras internas, la precisión cuantitativa de las muestras preparadas era fiable.

40

La C/T es fácil de calcular y ofrece cierta compensación por la variación en los monitores de flujo lateral ya que las intensidades de la línea de prueba y de la línea de control tienden a subir y bajar juntas. La interpretación visual indica que se detectan 5 ng de masa enriquecida ya que todos los monitores dan C= a C a esta masa y todos son C para 10 ng de nivel de enriquecimiento. La Tabla I muestra la interpretación visual de los controles de tampón enriquecido y la línea de control (C) se consideró más intensa que la línea de prueba (T) a 5-10 ng de nivel enriquecido.

45

Tabla I: Interpretación visual de la respuesta de los monitores de flujo lateral: Línea más intensa (prueba-T, control-C) a diferentes niveles de enriquecimiento							
			Toallitas	Toallitas	Toallitas	Toallitas	Toallitas
Masa enriquecida (ng)	Solución	Hisopo	Cerámica	Vinilo	Compuesto	Inoxidable	Vidrio
0	T a =	T a =	T	T	T a C=	T a =	T= a C=
5	C= a C	= a C	T= a =	T= a =	= a C=	T a C=	T a =
10	C	C= a C	T= a C	T= a C	C= a C	= a C=	C= a C
25	C	C	C	C	C	C	C

Tabla I: Interpretación visual de la respuesta de los monitores de flujo lateral: Línea más intensa (prueba-T, control-C) a diferentes niveles de enriquecimiento							
			Toallitas	Toallitas	Toallitas	Toallitas	Toallitas
Masa enriquecida (ng)	Solución	Hisopo	Cerámica	Vinilo	Compuesto	Inoxidable	Vidrio
50	C	C	C	C	C	C	C
100	C	C	C	C	C	C	C

La Tabla I muestra el rendimiento de los monitores usando interpretación visual. Los monitores se desarrollaron con soluciones de tampón de muestreo enriquecido, hisopos enriquecidos y baldosas enriquecidas. Los resultados se evaluaron evaluando visualmente cuál era la línea más intensa. Si la línea de prueba era la más intensa, entonces se usó T, y si la línea de control era la más intensa, entonces se usó C. Si las líneas se consideraron iguales, entonces se usó =. Si las líneas eran casi iguales pero la línea de prueba era ligeramente más brillante, entonces se usó T=. Si las líneas eran casi iguales pero el control se consideró un poco más brillante, entonces se usó C=.

## 10 Muestras de control de hisopo enriquecido

Las figuras 3A y 3B muestran el % de B/Bo y la relación C/T en función de ng de enriquecimiento para hisopos enriquecidos. La figura 3A es un gráfico que muestra la respuesta del monitor para soluciones de hisopos enriquecidos como el % de B/Bo. Los hisopos se enriquecieron con masas crecientes de 5-FU y la respuesta de los monitores para las soluciones extraídas de estos hisopos se midió y se presentó como el % de B/Bo, donde B es la respuesta a una masa dada y Bo es la respuesta a una masa 0. La figura 3B es un gráfico que muestra la respuesta del monitor para soluciones de hisopos enriquecidos como una relación C/T. Los hisopos se enriquecieron con masas crecientes de 5-FU y la respuesta de los monitores para las soluciones extraídas de los hisopos se midió y se presentó como la relación C/T, donde C es la intensidad de la línea de control y T es la intensidad de la línea de prueba.

Estos datos mostrados son de nuevo el promedio de 5 conjuntos de datos de hisopos enriquecidos, cada uno recogido para acompañar los estudios de limpieza de baldosas realizados sobre diferentes superficies. El % de B/Bo muestra un promedio del 74 % con un VC del 20 % a 10 ng de enriquecimiento, lo que indica que esta masa sería detectable a partir de hisopos enriquecidos. La C/T y el % de B/Bo se ajustaron de la misma manera que con las soluciones y se usaron para calcular la masa observada. Para los controles de hisopo enriquecido, el % de B/Bo promedio fue del 74 % a 10 ng, lo que indica que se puede detectar esta masa de 5-FU. La respuesta podría modelarse con el % de B/Bo frente a la masa logarítmica o C/T frente a la masa, y la masa observada frente a la esperada dio una buena correlación con cualquiera de los ajustes, figura 3C.

La figura 3C es un gráfico que muestra la masa observada frente a la masa esperada como se hizo para los controles de tampón enriquecido y muestra un buen ajuste. La recuperación de los estándares se calculó representando los resultados interpolados de las curvas ajustadas de % de B/Bo frente a la masa logarítmica o C/T frente a la masa (la masa observada) frente a la masa de 5-FU enriquecido en el hisopo (la masa esperada).

Como se mencionó anteriormente, las curvas ajustadas de la C/T y el % de B/Bo para los controles de tampón enriquecido se usaron para calcular la masa recuperada para las muestras de control de hisopo enriquecido. La masa recuperada de los hisopos enriquecidos se calculó tomando la respuesta de los monitores para las soluciones de los hisopos enriquecidos y utilizando las curvas ajustadas de % de B/Bo frente a la masa logarítmica o la C/T frente a la masa para soluciones tampón de muestreo enriquecido para calcular la concentración. La figura 3D es un gráfico que muestra una buena correlación pero una recuperación incompleta de 5-FU de los hisopos, las pendientes de los gráficos son <1,00. La recuperación calculada obtenida usando la curva de muestra de control de tampón enriquecido proporcionó aproximadamente un 50 % de recuperación tanto para las curvas de % de B/Bo como de C/T, véanse los valores de pendiente respectivos, figura 3D.

Los resultados de LC-MS/MS también indicaron una recuperación incompleta de los hisopos enriquecidos con un promedio del 86 % que concuerda bien con la pendiente cuando la recuperación se representa frente a la masa, Tabla IIIA, aunque los valores son más altos que los del monitor de flujo lateral según lo indicado por el valor de pendiente <1,00 para muestras de hisopos en la Tabla IIIB que correlaciona los dos procedimientos. La interpretación visual indicó que 10 ng de 5-FU son detectables ya que todos los monitores mostraron que C= a C por esa masa.

La Tabla I muestra la interpretación visual de los datos de los hisopos enriquecidos que indica que la línea de control

era más intensa que la línea de prueba a 10-25 ng de nivel de enriquecimiento.

**Muestras de limpieza de baldosas enriquecidas**

- 5 Los datos para las baldosas enriquecidas se trataron de la misma manera que los controles de tampón enriquecido y los controles de hisopo enriquecido, excepto que los datos para cada superficie se trataron por separado. Cada valor representa un promedio de 6 monitores de flujo lateral, ya que había 3 baldosas en cada nivel, y 2 monitores de flujo lateral para cada baldosa. Las figuras 4A y 4B son gráficos que muestran el % de B/Bo y la relación C/T en función de ng de 5-FU para muestras de baldosas enriquecidas. La figura 4A es un gráfico que muestra la respuesta del monitor para soluciones de bolsas enriquecidas como el % de B/Bo. Baldosas de 100 cm<sup>2</sup> de área y diversas superficies se enriquecieron con masas crecientes de 5-FU y la respuesta de los monitores para las soluciones extraídas de los hisopos utilizados para limpiar estas baldosas se midió y se presentó como el % de B/Bo, donde B es la respuesta a una masa dada y Bo es la respuesta a una masa 0.
- 10
- 15 La figura 4B es un gráfico que muestra la respuesta del monitor para soluciones de baldosas enriquecidas como una relación C/T. Baldosas de 100 cm<sup>2</sup> de área y diversas superficies se enriquecieron con masas crecientes de 5-FU y la respuesta de los monitores para las soluciones extraídas de los hisopos utilizados para limpiar estas baldosas se midió y se presentó como la relación C/T, donde C es la intensidad de la línea de control y T es la intensidad de la línea de prueba. Se muestran líneas de regresión para todos los tipos de superficie; sin embargo, solo las ecuaciones de regresión del vinilo y el compuesto se muestran en el gráfico. La regresión para el vinilo produjo la pendiente más alta y la del compuesto produjo la pendiente más baja. Las pendientes para todas las demás superficies están entre el vinilo y el compuesto.
- 20

Las curvas del % de B/Bo varían entre superficies con un 80 % para vinilo y cerámica a 10 ng y un 80 % entre 10 y 25 ng para otras superficies. Las baldosas se enriquecieron con masas crecientes de 5-FU, se limpiaron y la solución se aplicó a los monitores de flujo lateral. La respuesta de los monitores se ajustó como el % de B/Bo en función de la masa logarítmica, y esta relación se usó para calcular la masa observada que se representó en relación con la masa esperada, y los resultados se muestran en la Tabla IIA.

25

Tabla IIA. Masa observada frente masa esperada para la curva de calibración ajustada de % de B/Bo frente a la masa logarítmica			
	Pendiente	Intersección	R <sup>2</sup>
Cerámica	1,0001	0,5636	0,9983
Compuesto	1,3292	-5,4721	0,9357
Vidrio	1,0989	-0,1767	0,9835
Inoxidable	1,0252	1,1418	0,9874
Vinilo	1,0922	-1,4521	0,9866

30 La respuesta de los monitores se ajustó como C/T (la relación de la intensidad de la línea de control con respecto a la intensidad de la línea de prueba) en función de la masa, y esta relación se usó para calcular la masa observada que se representó frente a la masa esperada, y los resultados se muestran en la Tabla IIB.

Tabla IIB. Masa observada frente masa esperada para la curva de calibración ajustada de C/T frente a la masa			
	Pendiente	Intersección	R <sup>2</sup>
Cerámica	0,7467	0,0002	0,9957
Compuesto	0,9986	-0,0002	0,9878
Vidrio	1,0012	-0,0002	0,9939
Inoxidable	0,9986	-0,0002	0,9867
Vinilo	0,9993	0,0012	0,992

35 Las baldosas se enriquecieron con masas crecientes de 5-FU, se limpiaron y la solución se aplicó a los monitores de flujo lateral. La relación ajustada del % de B/Bo frente a la masa logarítmica para el tampón de muestreo enriquecido

se usó con la respuesta de los monitores de las baldosas enriquecidas para calcular la masa recuperada que se representó en relación con la masa enriquecida, mostrándose los resultados para el % de B/Bo en la Tabla IIC.

Tabla IIC. Masa recuperada usando la curva de calibración de solución ajustada de % de B/Bo frente a la masa logarítmica			
	Pendiente	Intersección	R <sup>2</sup>
Cerámica	0,34	0,6781	0,9977
Compuesto	0,1321	0,082	0,957
Vidrio	0,4216	-2,2471	0,9731
Inoxidable	0,2721	-0,1914	0,9874
Vinilo	0,37	0,1702	0,9913

- 5 Las baldosas se enriquecieron con masas crecientes de 5-FU, se limpiaron y la solución se aplicó a los monitores de flujo lateral. La relación ajustada de C/T frente a la masa para el tampón de muestreo enriquecido se usó con la respuesta de los monitores de las baldosas enriquecidas para calcular la masa recuperada que se representó en relación con la masa enriquecida, mostrándose los resultados para C/T en la Tabla IID.

Tabla IID. Masa recuperada usando la curva de calibración de solución ajustada de C/T frente a la masa			
	Pendiente	Intersección	R <sup>2</sup>
Cerámica	0,254	0,0621	0,9957
Compuesto	0,2324	2,8708	0,9878
Vidrio	0,7426	-6,571	0,9939
Inoxidable	0,3343	-1,8595	0,9867
Vinilo	0,4008	-1,2632	0,992

10

Existe una buena correlación en los ejemplos de baldosas enriquecidas, pero incluso una recuperación menor que con las muestras de control de hisopo enriquecido, en comparación con las pendientes de los gráficos frente a las de la figura 3D, como se esperará, ya que no se espera que la limpieza con hisopos sea eficiente al 100 % y algunas superficies pueden retener cantidades significativas del enriquecimiento con 5-FU (a continuación). La Tabla I muestra la interpretación visual para diferentes superficies lo que muestra que todas las superficies tienen la línea de control más intensa que la línea de prueba a 25 ng de niveles de enriquecimiento.

- 15

Para las baldosas enriquecidas, las curvas del % de B/Bo variaron entre superficies, como se ilustra en la figura 4A, e indicaron que se podían detectar 10 ng de 5-FU en baldosas de cerámica y vinilo y 10-25 ng sobre otras superficies.

- 20 Existe una buena correlación de la masa observada con la masa esperada utilizando las curvas ajustadas tanto para el % de B/Bo como para C/T para todas las superficies, véanse las Tablas IIA, IIB. El cálculo de la masa recuperada utilizando la curva de control de tampón enriquecido indica una correlación generalmente buena pero una recuperación incompleta, véanse los valores de R<sup>2</sup> y de pendiente respectivamente en las Tablas IIC e IID, como se esperará de las limitaciones en la técnica de limpieza.

25

Las mediciones de LC-MS/MS se realizaron en controles de tampón de muestreo enriquecido y extractos de controles de hisopo enriquecido y baldosas enriquecidas, utilizando las soluciones restantes después de que se completaran los análisis de monitor de flujo lateral. La masa medida por LC-MS/MS se correlacionó con la masa enriquecida para las soluciones tampón de muestreo enriquecido, las soluciones de hisopo enriquecido y las soluciones de baldosa enriquecida, en general y por tipo de baldosa. La Tabla IIIA muestra la correlación de la masa recuperada medida a partir de un análisis por LC-MS/MS con la masa enriquecida para cada tipo de muestra. Como se ha mencionado anteriormente, estas recuperaciones se determinan usando una curva de calibración independiente preparada por el analista de LC-MS/MS usando nuevos estándares preparados en el tampón de muestreo, a diferencia de los monitores de flujo lateral que usaron los datos de muestras de control de tampón de muestreo enriquecido para la calibración.

- 30
- 35 Para las muestras de limpieza de superficies, este ejemplo muestra una correlación general y una para cada tipo de superficie, ya que las superficies dieron diferentes recuperaciones. El análisis por LC-MS/MS indica recuperaciones incompletas de muestras de limpieza de baldosas como se indica por los valores de pendiente, mostrados en la Tabla

## IIIA.

Tabla IIIA. Correlación de la masa medida por LC-MS/MS y la masa enriquecida			
	Pendiente	Intersección	R <sup>2</sup>
Solución	1,0185	-0,2358	0,9999
Hisopo	0,8276	0,5247	0,9998
Toallitas en general	0,5039	-0,5905	0,8968
Toallitas cerámica	0,4116	-0,4191	0,9984
Toallitas compuesto	0,4759	-0,574	0,9994
Toallitas vidrio	0,3882	0,0418	0,9998
Toallitas inoxidable	0,3887	0,6229	0,9944
Toallitas vinilo	0,7368	-1,3006	0,998

La masa recuperada calculada medida con los monitores de flujo lateral se representó en relación con la masa recuperada medida con LC-MS/MS para soluciones de tampón de muestreo enriquecido, soluciones de hisopo enriquecido y soluciones de baldosa enriquecida, en general y por tipo de baldosa, con intervalos de masa de 0-100 y 0-25 ng. La masa recuperada para los monitores de flujo lateral utilizó los valores de C/T de cada tipo de muestra de superficie determinado con la curva ajustada de control de tampón enriquecido generada el mismo día. Para las muestras de limpieza, la correlación se realizó para (1) todos los datos, incluidos 100 ng de enriquecimiento, y (2) para muestras enriquecidas de menos de 25 ng, ya que concordaron mejor con los resultados de LC-MS/MS. 100 ng es el único nivel de enriquecimiento superior a 25 ng para el que se determinó un valor a través de LC-MS/MS.

Existe una buena correlación de los valores de recuperación de LC-MS/MS con los calculados a partir del ensayo de flujo lateral, véanse los valores de R2 en la Tabla IIIB, los valores absolutos de las recuperaciones calculadas del inmunoensayo son menores, véanse los valores de pendiente en la Tabla IIIB que son <1,00. Los valores absolutos concuerdan mejor para valores de masa de 25 ng o menos. La excepción son las muestras de limpieza de acero inoxidable para las que hay poca diferencia en consonancia. No se disponía de datos suficientes de LC-MS/MS para permitir la comparación de rangos para muestras de limpieza de vidrio.

Tabla IIIB. Correlación de la masa recuperada del monitor de flujo lateral con la masa recuperada por LC-MS/MS			
	Pendiente	Intersección	R <sup>2</sup>
Solución	0,9923	0,5107	0,9984
Hisopo	0,7341	0,6572	0,9985
Toallitas en general	0,5894	0,3374	0,9267
Toallitas en general <25	0,8192	-1,0296	0,8426
Toallitas cerámica	0,6095	0,4502	0,9899
Toallitas cerámica <25	0,9017	-0,7058	0,983
Toallitas compuesto	0,4365	3,1433	0,9953
Toallitas compuesto <25	0,5233	2,7555	0,9505
Toallitas vidrio <25	1,0748	-3,6148	0,9123
Toallitas inoxidable	0,9218	-2,418	0,9999
Toallitas inoxidable <25	0,9218	-2,418	0,9995
Toallitas vinilo	0,5469	0,0382	0,9913
Toallitas vinilo <25	0,8059	-1,6581	0,9888

20

Estos resultados muestran que, cuando los monitores se usan con una técnica de muestreo usando los hisopos de

algodón como se describe en este ejemplo, se pueden detectar visualmente 25 ng de 5-FU y se pueden detectar menos de 25 ng usando el lector electrónico. La técnica de detección de 5-FU que emplea limpieza de superficies y monitores de flujo lateral descritos en este ejemplo proporcionan una sensibilidad de 25 ng/100 cm<sup>2</sup> (0,25 ng/cm<sup>2</sup>) o mejor en un tiempo de 15 minutos o menos.

- 5 Las superficies individuales de baldosas cerámicas, 10 X 10 cm, se enriquecieron con cantidades conocidas de paclitaxel, 0 - 500 ng. La baldosa cerámica se limpió con un hisopo humedecido y el paclitaxel se extrajo del hisopo como se describe para 5-FU. La solución de prueba resultante se aplicó al dispositivo de ensayo de flujo lateral y el resultado se evaluó utilizando técnicas tanto visuales como de lector electrónico. Usando el lector electrónico, el % de
- 10 B/Bo fue del 70 % a 25 ng/ml para soluciones enriquecidas y de 50 ng/100 cm<sup>2</sup> para muestras de limpieza de baldosas. Usando la interpretación visual, la línea de control fue más intensa que la línea de prueba a más de 50 ng/ml para las soluciones enriquecidas y a más de 50 ng/100 cm<sup>2</sup> para las muestras de limpieza de baldosas. Se usó PBS-Tween al 1 % como tampón de muestreo para los monitores de paclitaxel en este ejemplo.
- 15 La figura 5A es un gráfico que muestra la respuesta del monitor de ensayo de flujo lateral para un tampón de muestreo enriquecido con paclitaxel como el % de B/Bo. El tampón de muestreo se enriqueció con masas crecientes de paclitaxel y la respuesta de los monitores se midió y se presentó como el % de B/Bo, donde B es la respuesta a una masa dada y Bo es la respuesta a una masa 0.
- 20 La figura 5B es un gráfico que muestra la respuesta del monitor de ensayo de flujo lateral para baldosas cerámicas enriquecidas con paclitaxel como % de B/Bo. Las baldosas de cerámica enriquecidas con masas crecientes de paclitaxel y la respuesta de los monitores se midió y se presentó como el % de B/Bo, donde B es la respuesta a una masa dada y Bo es la respuesta a una masa 0.
- 25 La figura 5C es un gráfico que muestra la detección de diversas cantidades de paclitaxel en tampón enriquecido o extraído de hisopos usados para limpiar baldosas cerámicas enriquecidas mediante evaluación visual de los resultados del ensayo de flujo lateral.
- El ensayo de paclitaxel detectó 0,25 ng/cm<sup>2</sup> con el lector electrónico y 0,5 ng/cm<sup>2</sup> visualmente en este ejemplo.
- 30 Las superficies individuales de baldosas cerámicas, 10 X 10 cm, se enriquecieron con cantidades conocidas de doxorrubicina, 0 - 500 ng. La baldosa cerámica se limpió con un hisopo humedecido y el paclitaxel se extrajo del hisopo como se describe para 5-FU. La solución de prueba resultante se aplicó al dispositivo de ensayo de flujo lateral y el resultado se evaluó utilizando técnicas tanto visuales como de lector electrónico. Usando el lector electrónico, el % de
- 35 B/Bo fue del 40 % a 1 ng/ml para soluciones enriquecidas y del 80 % a 5 ng/100 cm<sup>2</sup> para muestras de limpieza de baldosas. Usando la interpretación visual, la línea de control fue más intensa que la línea de prueba a más de 1 ng/ml para las soluciones enriquecidas y a 5 ng/100 cm<sup>2</sup> para las muestras de limpieza de baldosas. Se usó PBS en solitario, sin Tween, como tampón de muestreo para los monitores de doxorrubicina en este ejemplo. Se usaron hisopos de espuma.
- 40 La figura 6A es un gráfico que muestra la respuesta del monitor de ensayo de flujo lateral para un tampón de muestreo enriquecido con doxorrubicina como el % de B/Bo. El tampón de muestreo se enriqueció con masas crecientes de doxorrubicina y la respuesta de los monitores se midió y se presentó como el % de B/Bo, donde B es la respuesta a una masa dada y Bo es la respuesta a una masa 0.
- 45 La figura 6B es un gráfico que muestra la respuesta del monitor de ensayo de flujo lateral para baldosas cerámicas enriquecidas con doxorrubicina como % de B/Bo. Las baldosas de cerámica enriquecidas con masas crecientes de doxorrubicina y la respuesta de los monitores se midió y se presentó como el % de B/Bo, donde B es la respuesta a una masa dada y Bo es la respuesta a una masa 0.
- 50 La figura 6C es un gráfico que muestra la detección de diversas cantidades de doxorrubicina en tampón enriquecido o extraído de hisopos usados para limpiar baldosas cerámicas enriquecidas mediante evaluación visual de los resultados del ensayo de flujo lateral.
- 55 El ensayo de doxorrubicina detectó 0,05 - 0,1 ng/cm<sup>2</sup> visualmente.

Los dispositivos, kits y procedimientos descritos en el presente documento son actualmente representativos de las realizaciones preferidas de la presente descripción, a modo de ejemplo, y no pretenden ser limitaciones del alcance de la descripción. Los cambios en los mismos y otros usos tendrán lugar para los expertos en la materia. Dichos

60 cambios y otros usos se pueden hacer sin apartarse del alcance de la descripción como se expone en las reivindicaciones.

## REIVINDICACIONES

1. Un procedimiento para detectar la contaminación por fármacos antineoplásicos de una superficie, que comprende:
- 5 proporcionar una solución humectante compatible con el fármaco antineoplásico y formulada para promover la liberación del fármaco de la superficie a ensayar, donde la solución humectante comprende un tampón biológicamente compatible, el 0,01 - 10 % v/v de un tensioactivo no iónico y/o el 0,01 - 10 % v/v de un disolvente prótico polar orgánico;
- 10 proporcionar una matriz sólida para la absorción reversible del fármaco antineoplásico; poner en contacto la matriz sólida con la solución humectante, generando una matriz de ensayo; poner en contacto la matriz de ensayo y la superficie, generando una muestra de superficie; poner en contacto la muestra de superficie con un volumen de solución humectante, generando una muestra de prueba de fluido;
- 15 ensayar el fármaco antineoplásico en la muestra de prueba de fluido mediante un ensayo de flujo lateral para producir un resultado de ensayo; y detectar el resultado del ensayo, detectando así la contaminación por fármacos antineoplásicos de la superficie.
2. El procedimiento de la reivindicación 1, que comprende además comparar el resultado del ensayo con un estándar.
3. El procedimiento de la reivindicación 1 o 2, donde el fármaco antineoplásico se selecciona del grupo que consiste en: doxorubicina, paclitaxel y 5-fluorouracilo.
- 25 4. El procedimiento de cualquiera de las reivindicaciones 1-3, donde el ensayo de flujo lateral comprende:
- proporcionar un dispositivo de ensayo de flujo lateral, comprendiendo el dispositivo una almohadilla conjugada, un soporte poroso sólido o semisólido adyacente a la almohadilla conjugada, una zona de prueba presente en el soporte y una zona de control presente en el soporte, donde la almohadilla conjugada comprende un agente de unión a fármaco antineoplásico marcado de forma detectable unido difusiblemente, donde la zona de detección de prueba comprende un reactivo de detección unido no difusiblemente y la zona de control comprende un reactivo de control unido no difusiblemente, el soporte poroso sólido o semisólido adyacente a una almohadilla absorbente que promueve el flujo capilar de la muestra de prueba de fluido a lo largo de una trayectoria de flujo que incluye la almohadilla conjugada y el soporte poroso sólido o semisólido.
- 30 35 5. El procedimiento de la reivindicación 4, donde el agente de unión a fármaco antineoplásico es un anticuerpo anti-fármaco antineoplásico.
6. El procedimiento de la reivindicación 5, donde el anticuerpo anti-fármaco antineoplásico se selecciona del grupo que consiste en: un anticuerpo anti-5-fluorouracilo, un anticuerpo anti-paclitaxel y un anticuerpo anti-doxorubicina.
- 40 7. El procedimiento de cualquiera de las reivindicaciones 4-6, donde el reactivo de detección es el fármaco neoplásico.
- 45 8. El procedimiento de cualquiera de las reivindicaciones 4-7, donde el reactivo de control se une específicamente al anticuerpo anti-fármaco antineoplásico.
9. El procedimiento de cualquiera de las reivindicaciones 4-8, donde el reactivo de control es un anticuerpo que se une específicamente al anticuerpo anti-fármaco antineoplásico.
- 50 10. El procedimiento de cualquiera de las reivindicaciones 4-9, donde el dispositivo de ensayo de flujo lateral comprende además un alojamiento que encierra, al menos parcialmente, la almohadilla conjugada, el soporte poroso sólido o semisólido, y/o la almohadilla absorbente.
- 55 11. El procedimiento de cualquiera de las reivindicaciones 1-10, donde la detección del resultado del ensayo comprende observación visual.
12. El procedimiento de cualquiera de las reivindicaciones 1-10, donde la detección del resultado del ensayo comprende la operación del lector electrónico.
- 60

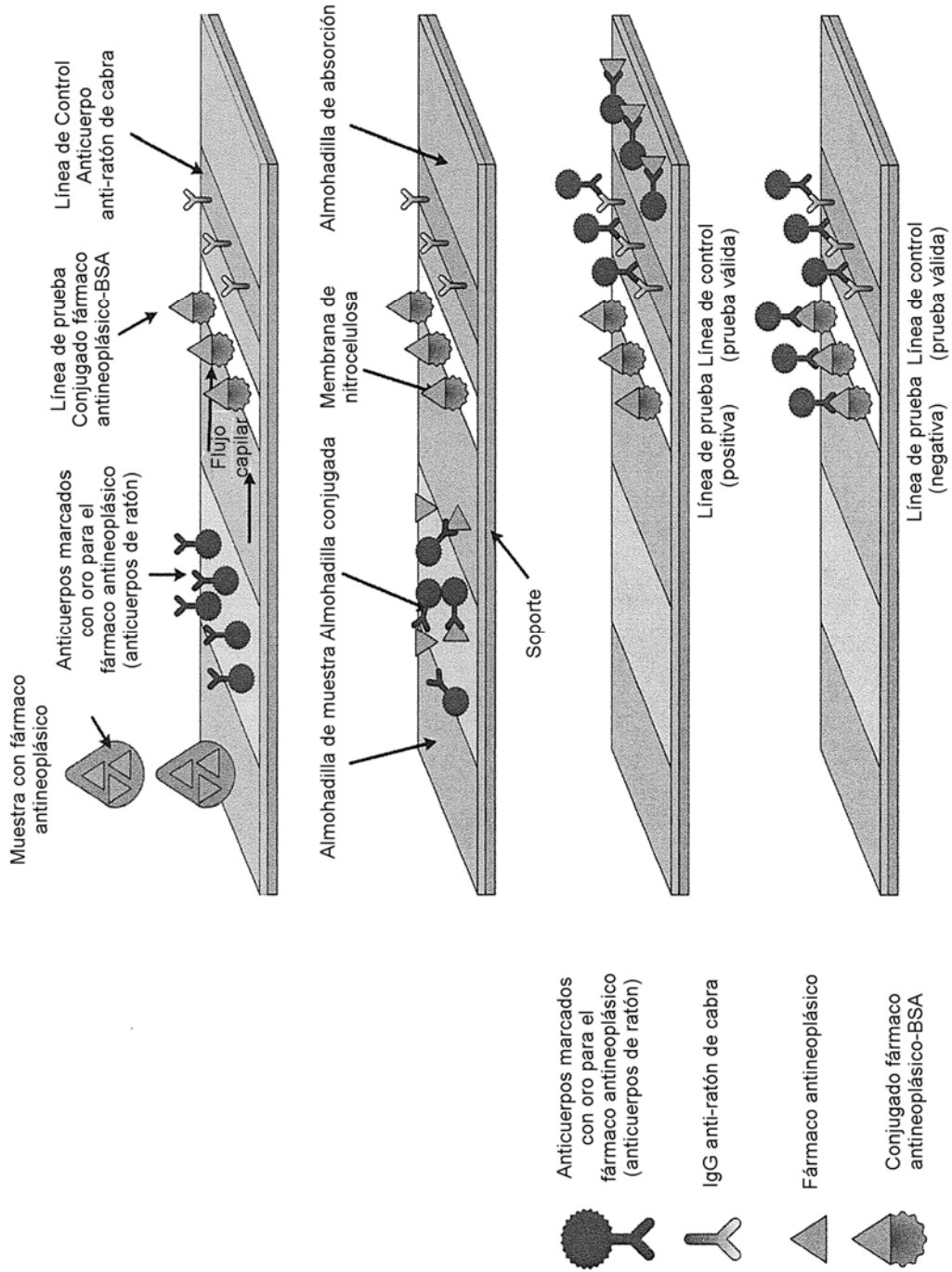


Figura 1



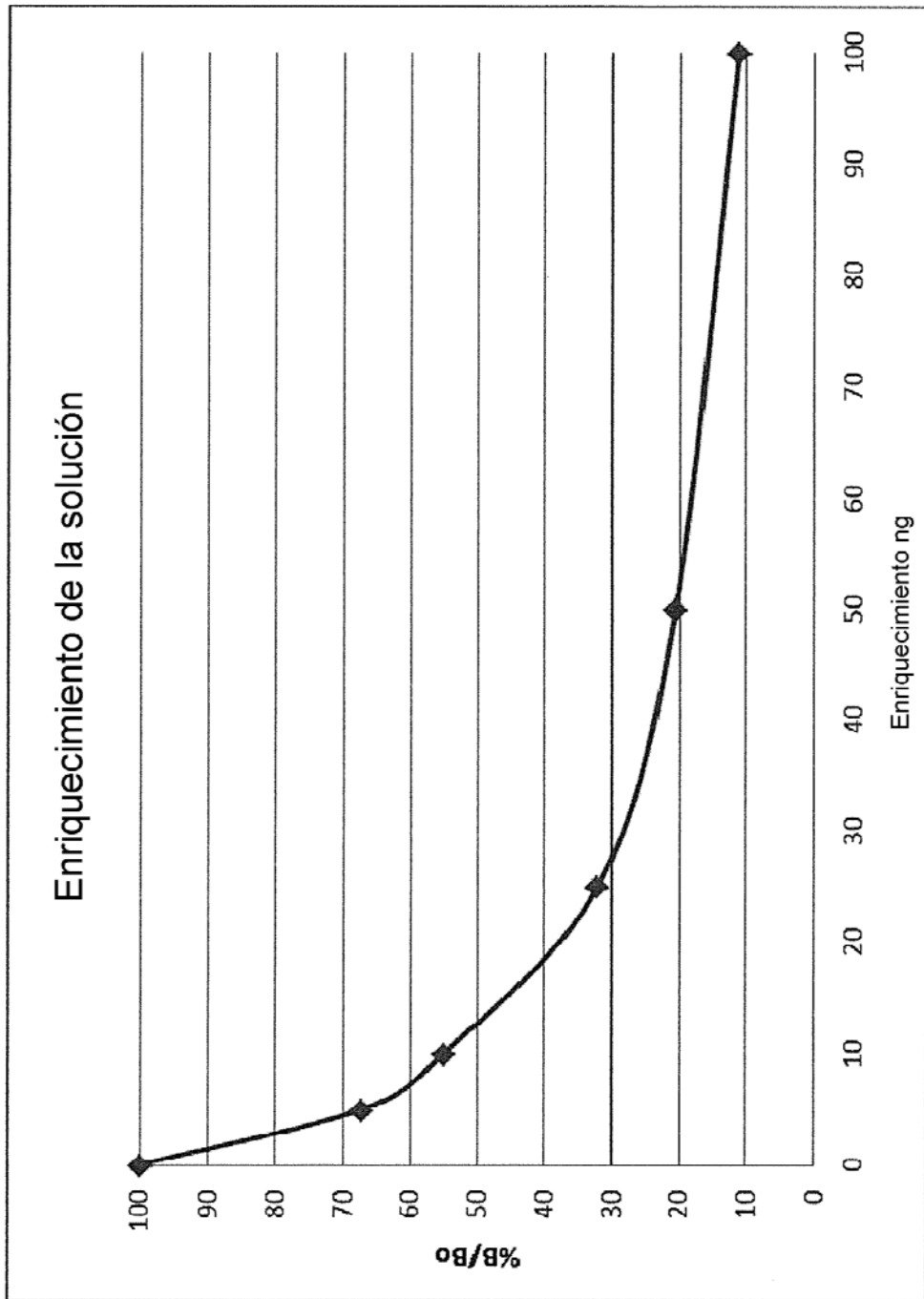


Figura 2A

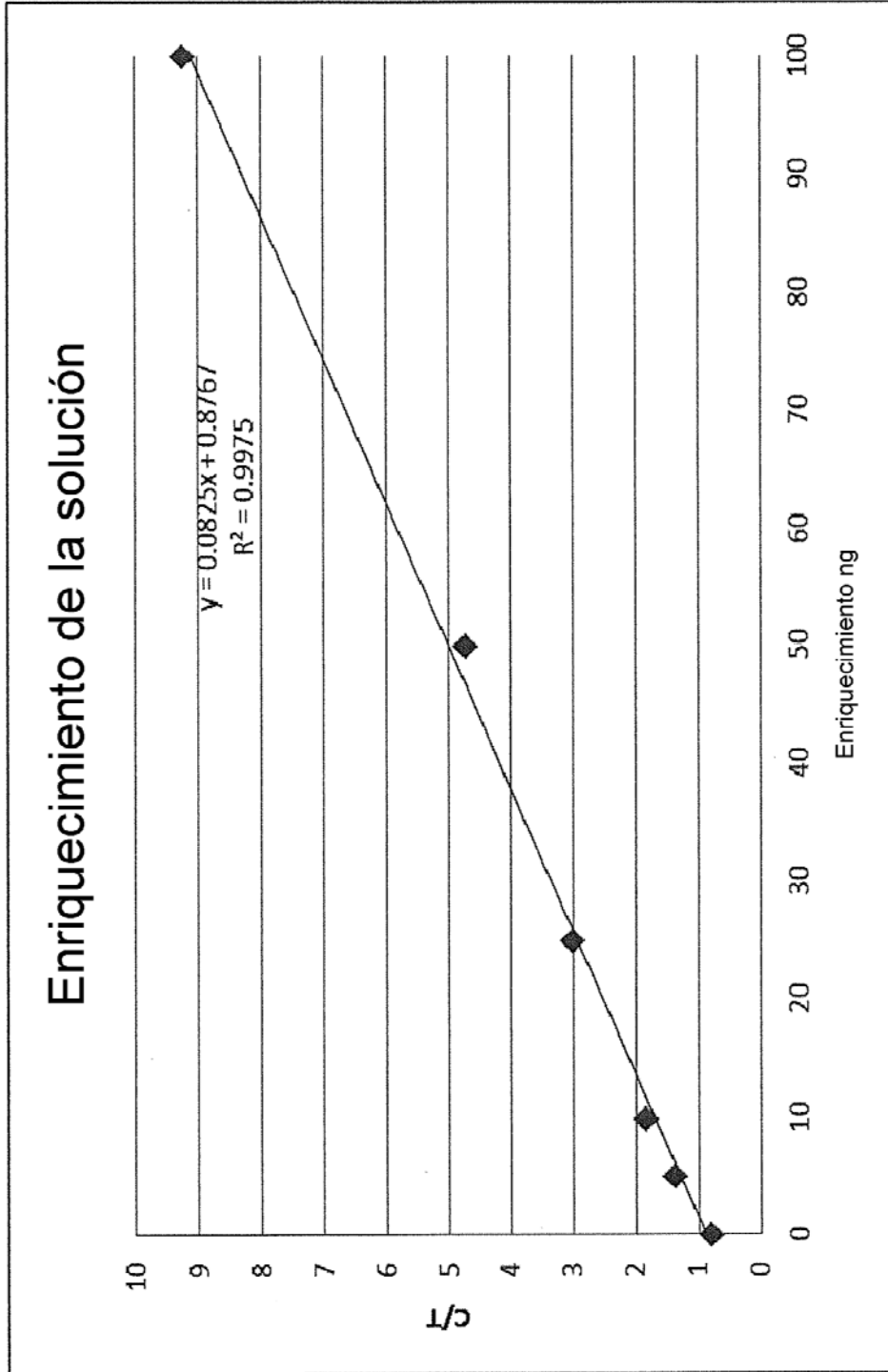


Figura 2B

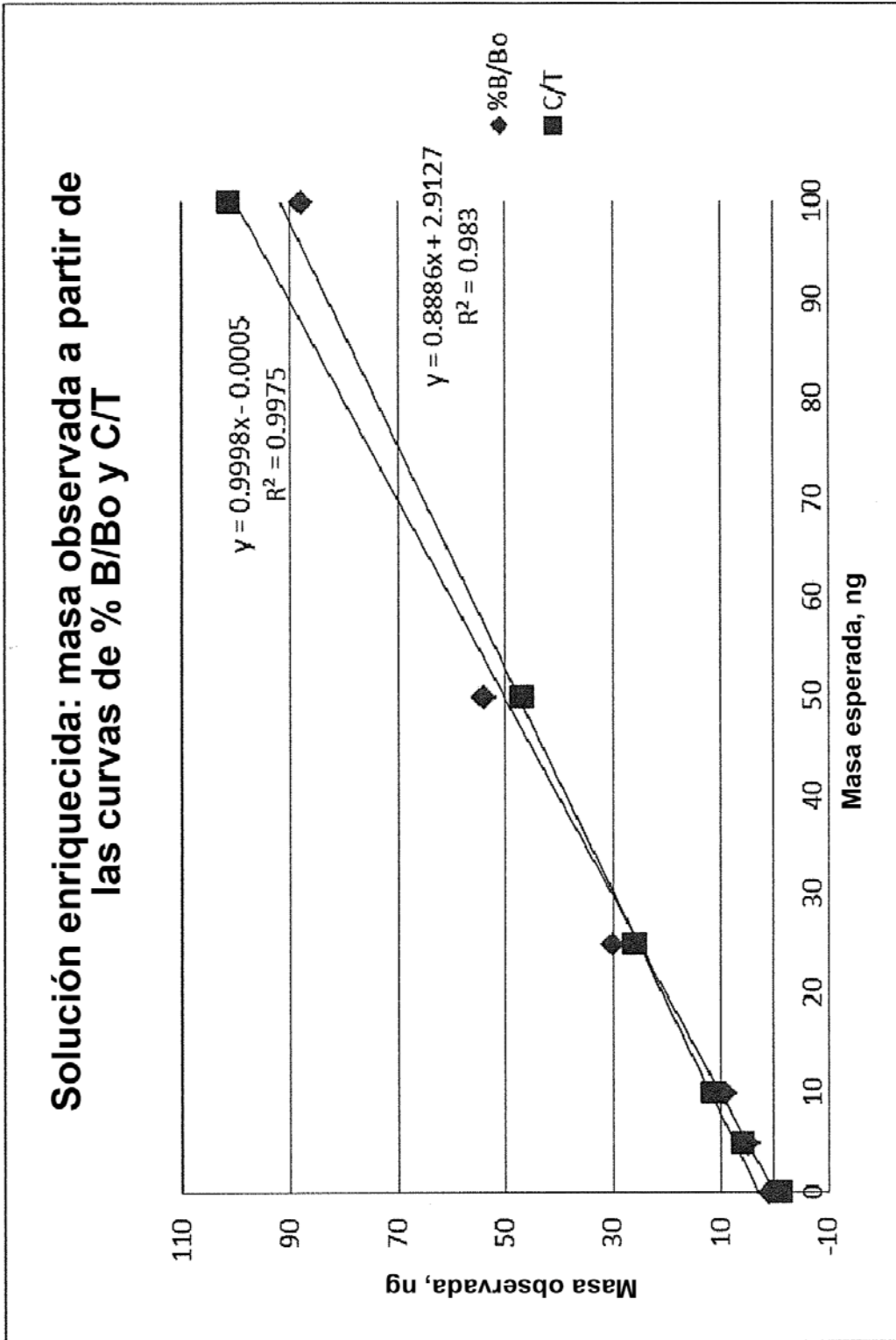


Figura 2C

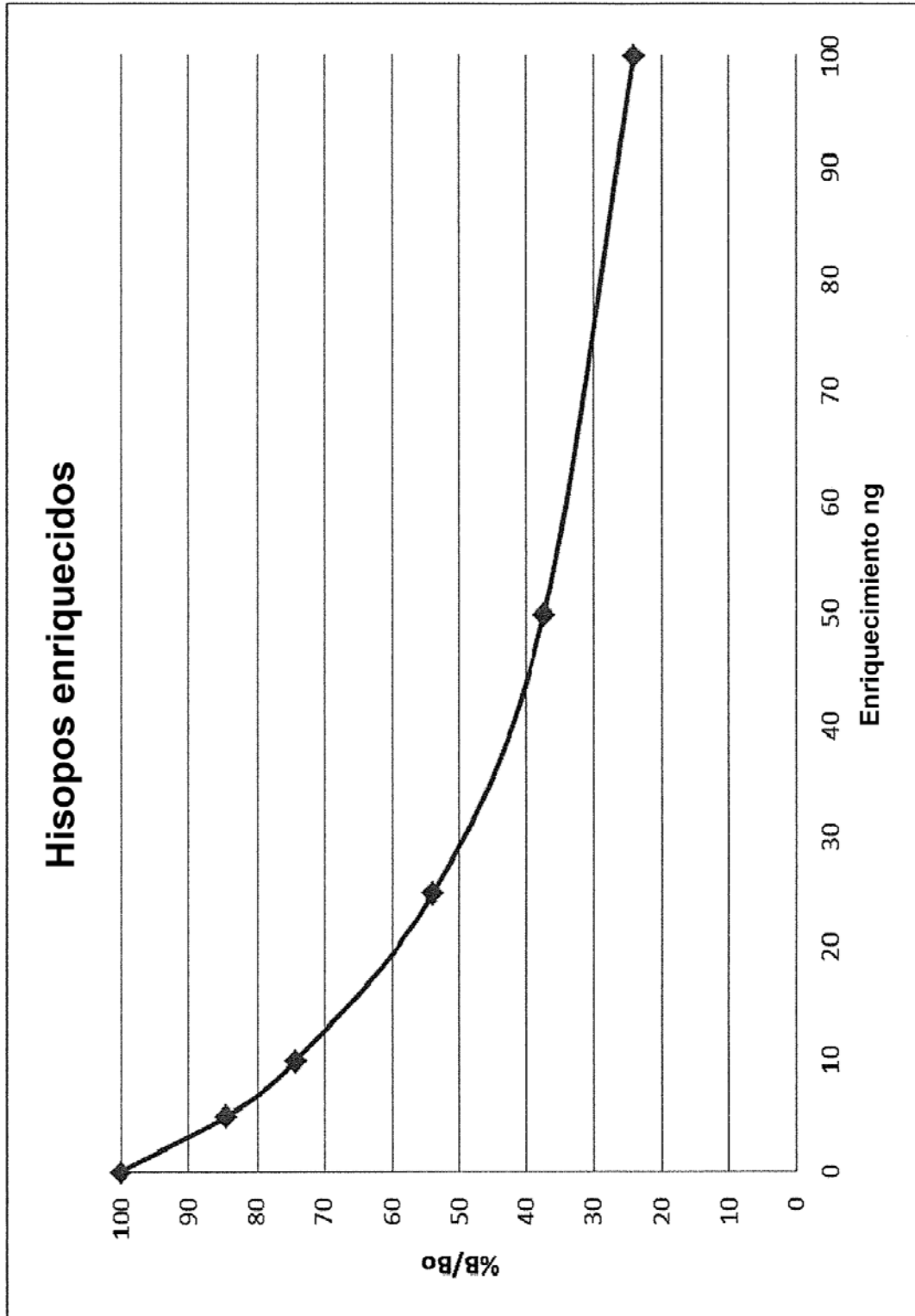


Figura 3A

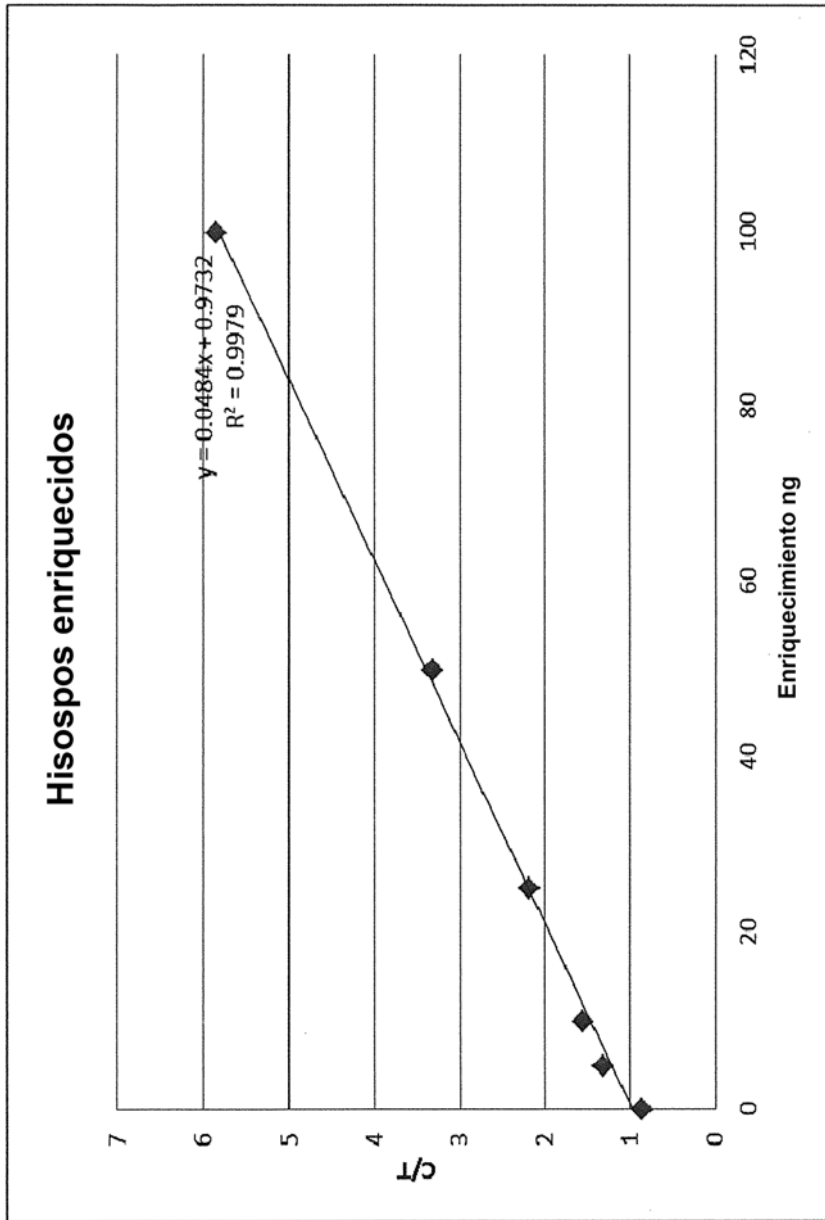


Figura 3B

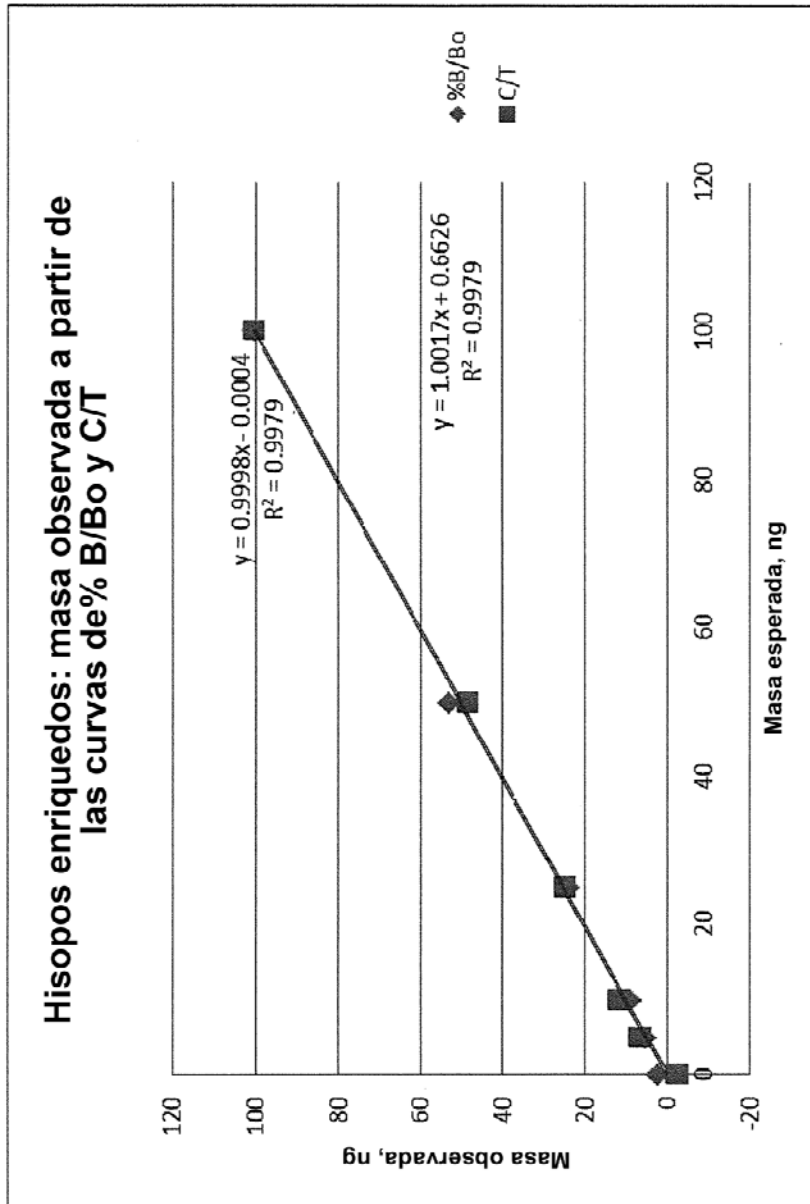


Figura 3C

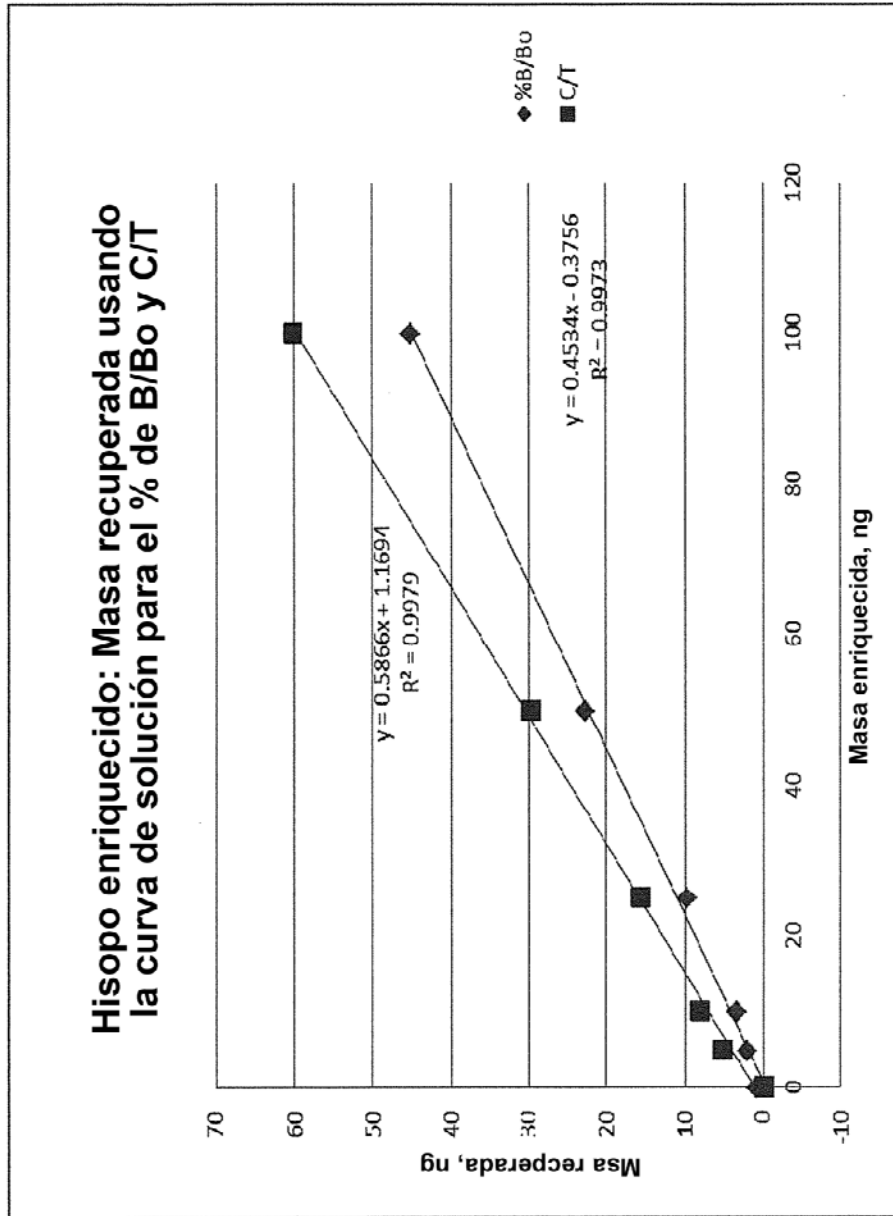


Figura 3D

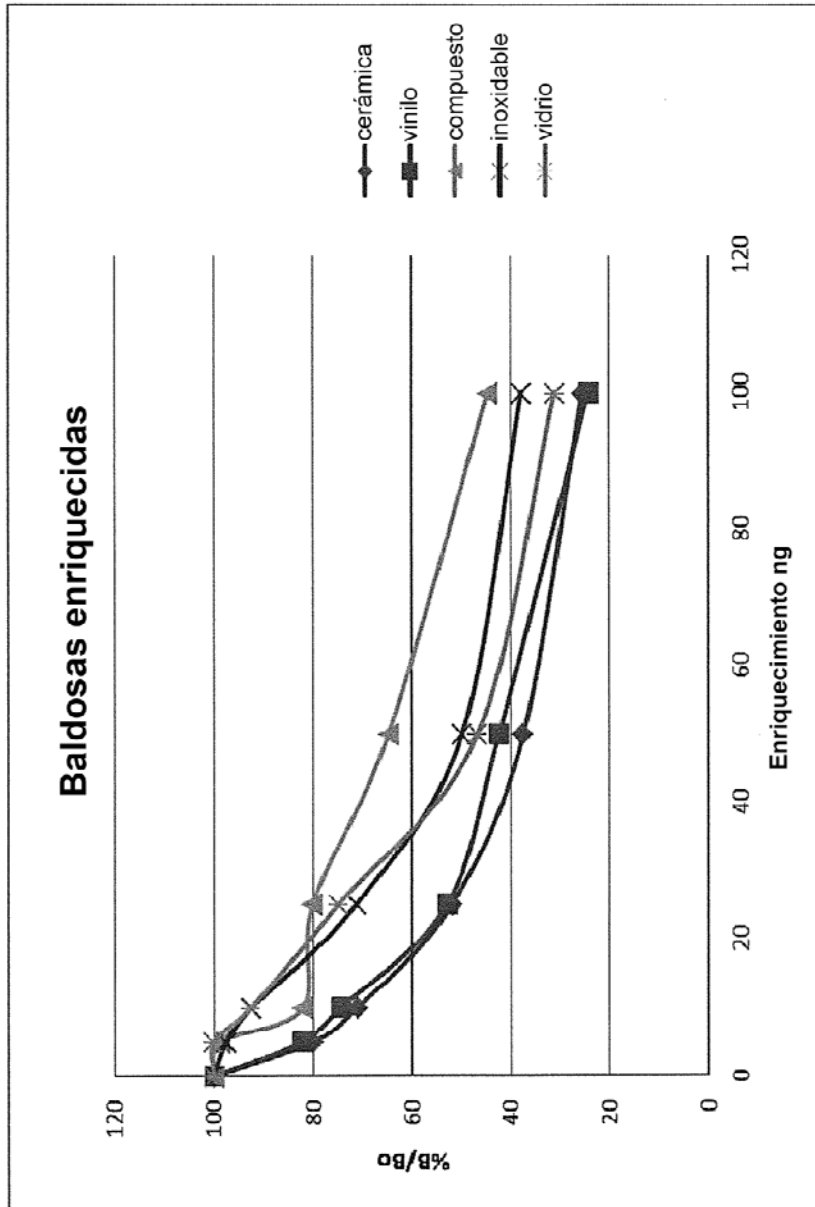


Figura 4A



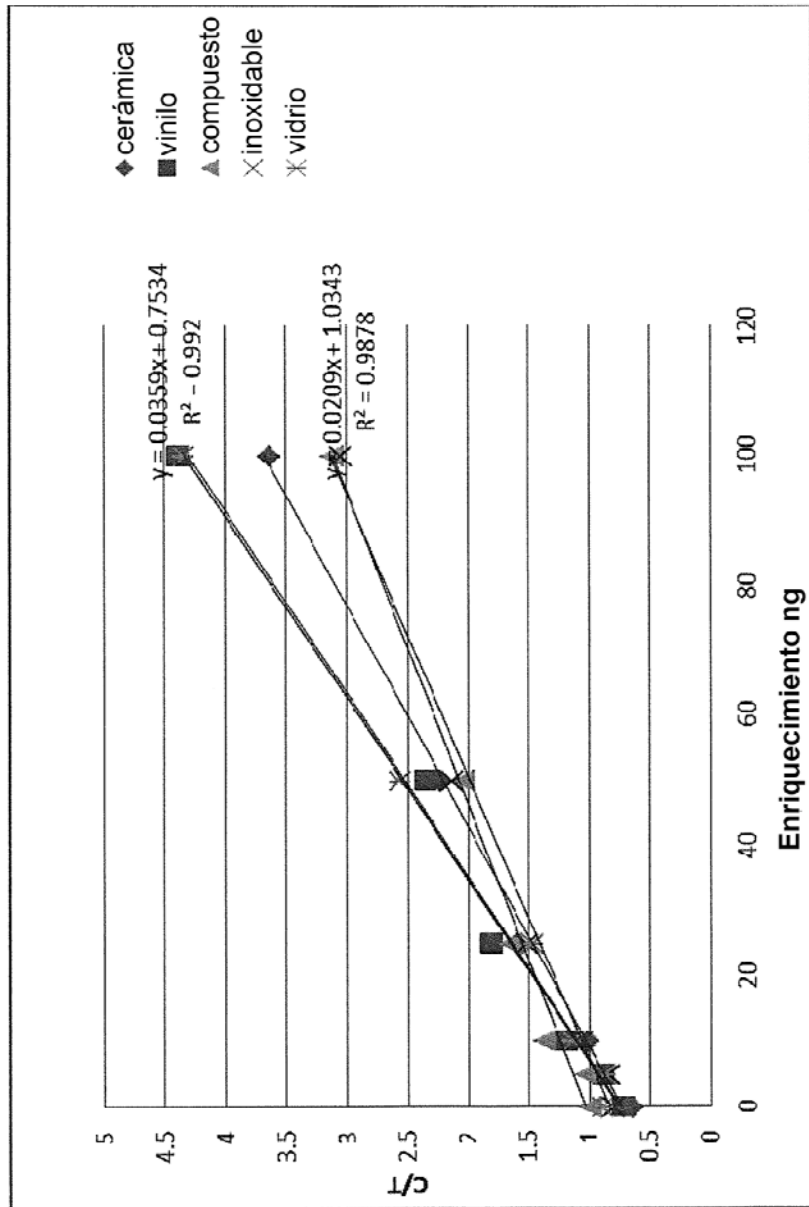


Figura 4B

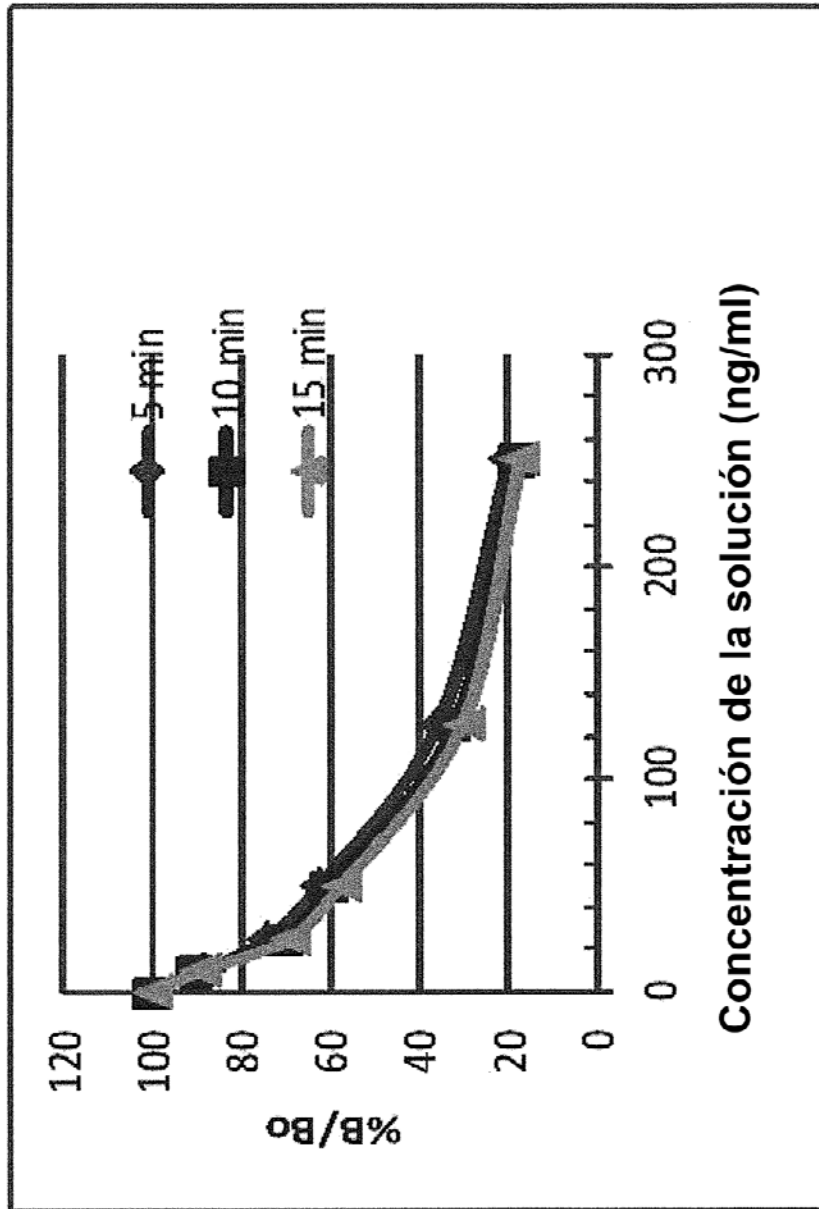


Figura 5A

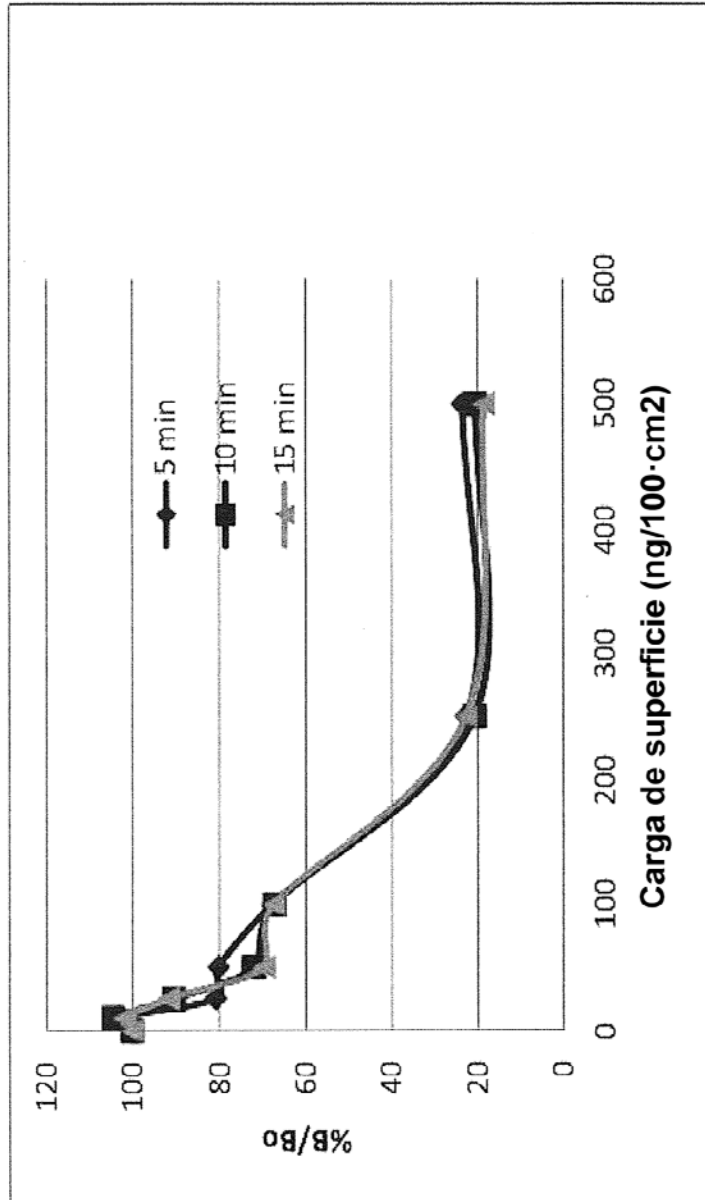


Figura 5B

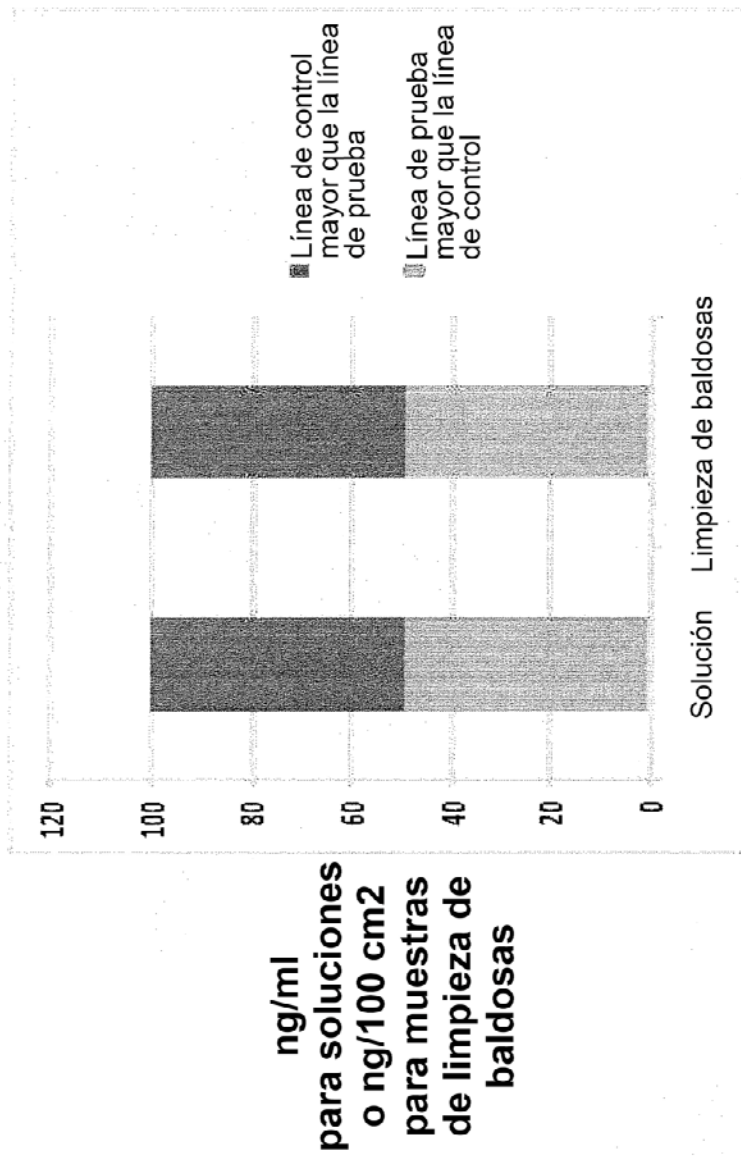


Figura 5C

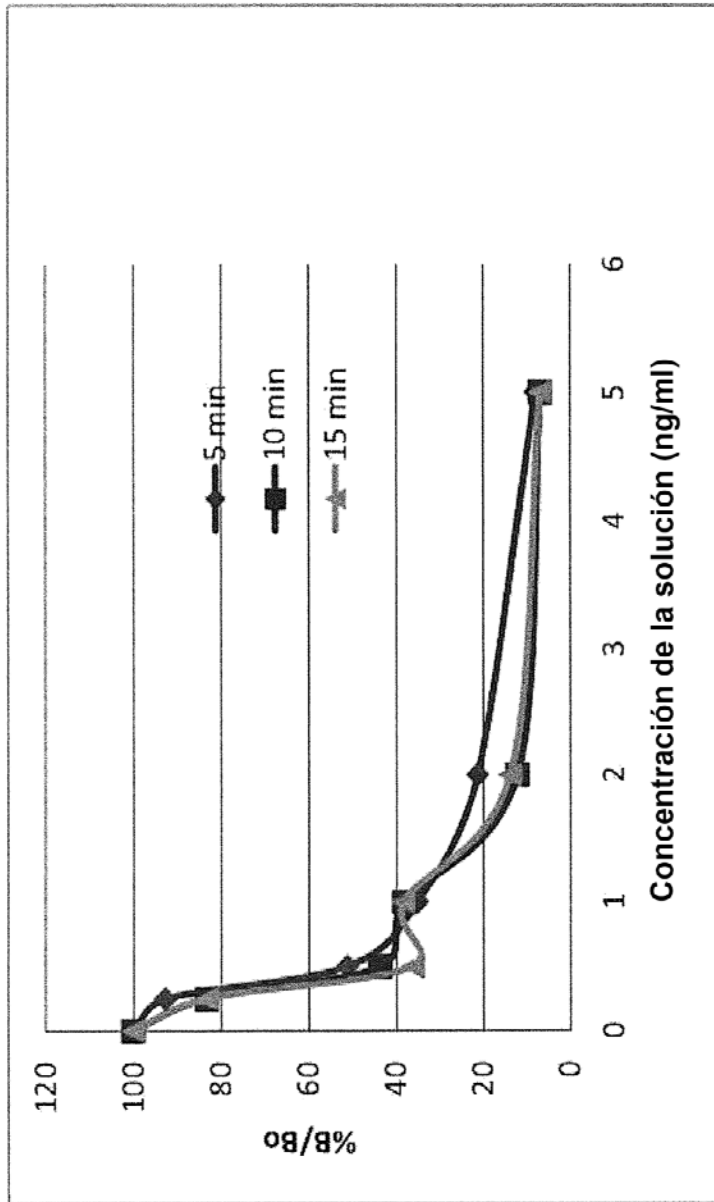


Figura 6A

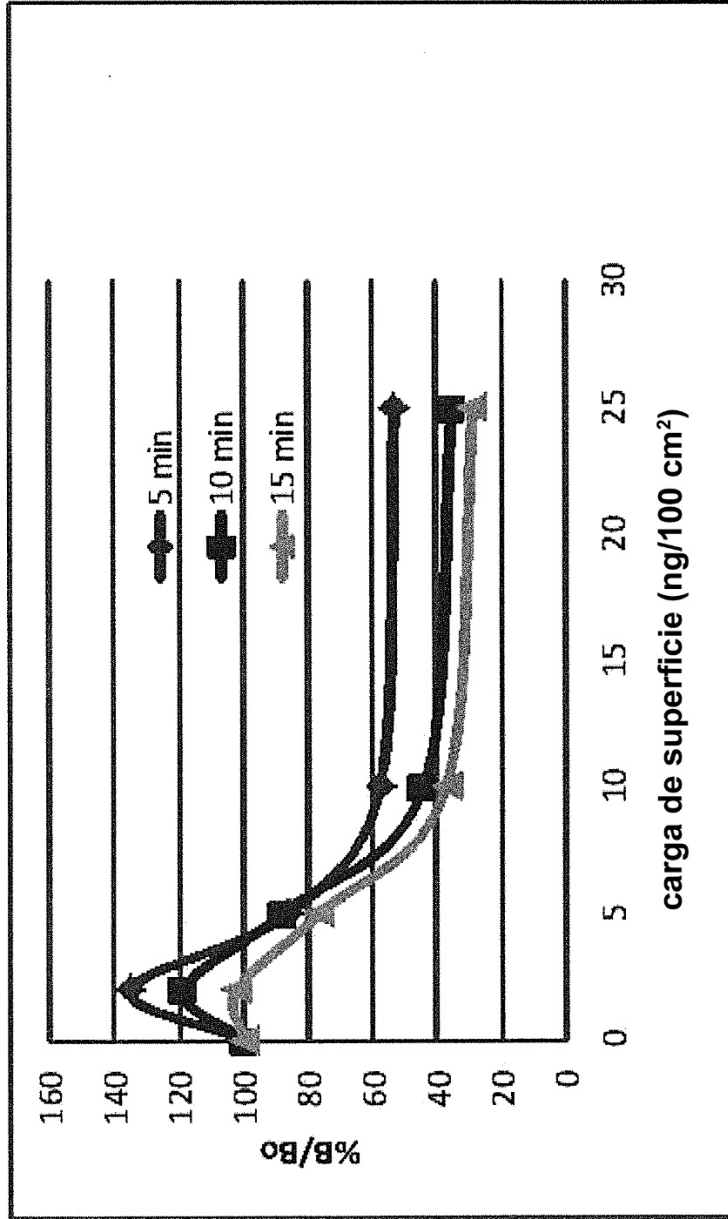


Figura 6B

**ng/ml  
para soluciones  
o ng/100 cm<sup>2</sup>  
para muestras  
de limpieza de  
baldosas**

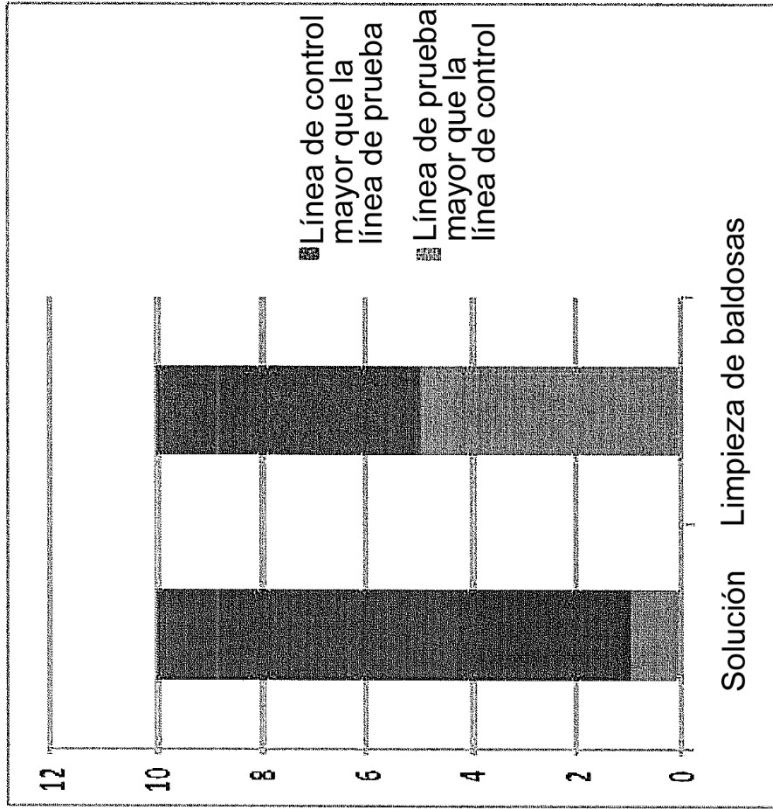


Figura 6C