



MINISTERO DELLO SVILUPPO ECONOMICO  
DIREZIONE GENERALE PER LA LOTTA ALLA CONTRAFFAZIONE  
UFFICIO ITALIANO BREVETTI E MARCHI

<b>DOMANDA DI INVENZIONE NUMERO</b>	<b>102019000007227</b>
<b>Data Deposito</b>	<b>24/05/2019</b>
<b>Data Pubblicazione</b>	<b>24/11/2020</b>

Classifiche IPC

<b>Sezione</b>	<b>Classe</b>	<b>Sottoclasse</b>	<b>Gruppo</b>	<b>Sottogruppo</b>
G	01	N	33	94

<b>Sezione</b>	<b>Classe</b>	<b>Sottoclasse</b>	<b>Gruppo</b>	<b>Sottogruppo</b>
G	01	N	33	96

Titolo

<b>KIT E METODO PER IL RILEVAMENTO DI CONTAMINANTI CHIMICI SU SUPERFICI</b>
---

## **KIT E METODO PER IL RILEVAMENTO DI CONTAMINANTI CHIMICI SU SUPERFICI**

### **Descrizione**

#### Campo di applicazione

5 La presente invenzione si colloca nel settore tecnico dei sistemi e metodi per il rilevamento ed il monitoraggio di sostanze inquinanti o contaminanti ed ha per oggetto un kit per il rilevamento di contaminanti chimici, quali farmaci antiblastici, su superfici.

L'invenzione ha altresì per oggetto un metodo per il rilevamento di contaminanti  
10 chimici implementabile mediante il suddetto kit.

#### Stato della tecnica

Come è noto, la contaminazione superficiale con contaminanti chimici pericolosi, in particolare farmaci antiblastici, è un fenomeno alquanto comune all'interno di ambienti quali ospedali, farmacie ospedaliere, laboratori ed in genere in tutti quei locali  
15 in cui si ha costante manipolazione di farmaci.

Numerosi studi hanno dimostrato la contaminazione da farmaci della maggior parte delle superfici di lavoro (cappe, banchi) e delle fiale dei farmaci, oltre che degli ambienti di stoccaggio e immagazzinamento di tali sostanze.

Il corretto monitoraggio della presenza di tali contaminanti assume un aspetto di rilievo  
20 a causa della riconosciuta pericolosità di queste sostanze ed in particolare degli agenti chemioterapici, che sono notoriamente dannosi sia per le cellule ed i tessuti sani che per quelli tumorali, e che possono essere facilmente assorbiti attraverso l'epidermide da superfici contaminate.

La forma più comune di trasferimento è per via dermica, mediante assorbimento  
25 indesiderato dei contaminanti, sebbene un significativo contributo sia riconosciuto anche ad altre vie, quali inalazione, somministrazione orale, punture accidentali.

Tale contaminazione può interessare operatori sanitari, personale di laboratorio, dipendenti dei siti di produzione, formulazione o ricerca, personale addetto allo stoccaggio e al trasporto delle preparazioni farmacologiche; ad esempio, nelle urine di  
30 persone appartenenti a queste categorie sono spesso ritrovate quantità significative di

farmaci chemioterapici o loro metaboliti.

Allo stato attuale, l'unico metodo che appare essere affidabile per la misurazione della contaminazione superficiale è costituito dal cosiddetto *wipe test*, che prevede il campionamento tramite opportuni supporti in materiale a base cellulosa imbevuti con una apposita soluzione.

5

In particolare, nel *wipe test* uno specifico volume di un'appropriata miscela di solventi viene depositata sull'area da analizzare; successivamente la superficie viene pulita con un tampone di materiale celluloso (*wipe*), in modo da intrappolare nello stesso gli agenti contaminanti presenti sulla superficie.

10 Successivamente, i contaminanti intrappolati nel wipe sono estratti con un'opportuna miscela di solventi ed analizzati utilizzando la spettrometria di massa accoppiata a cromatografia gassosa o liquida (GC-MS/MS o LC-MS/MS).

Uno dei principali limiti connessi alla rilevazione di inquinanti sulle superfici è la bassa riproducibilità delle operazioni di campionamento.

15 Infatti, la differenza di forza applicata dal singolo operatore nello strofinamento della superficie e la durata dell'operazione di campionamento introducono nella metodica fattori di variabilità che inevitabilmente inficiano in maniera significativa la corretta determinazione quantitativa dei contaminanti da monitorare e la oggettiva valutazione del grado di contaminazione ambientale dell'ambiente in esame.

20 US20140017812 descrive un metodo per la rilevazione di antineoplastici su superfici mediante campionamento con una soluzione di bagnatura compatibile con il farmaco antineoplastico e formulata per promuovere il rilascio del farmaco dalla superficie da saggiare.

In particolare, il metodo prevede l'uso di una matrice solida per l'assorbimento reversibile del farmaco antineoplastico, generalmente un tampone biologicamente compatibile, posta in contatto con una soluzione di bagnatura, ad esempio 0,01-10% v/v di tensioattivo (Tween 20) e/o 0,01-10% v/v di un solvente organico, per generare una matrice di saggio.

25 Quest'ultima è posta in contatto con la superficie in esame per ottenere il campione da analizzare, il quale è poi portato a contatto con un ulteriore volume di soluzione di

30

bagnatura, così da ottenere un campione in forma liquida.

Gli analiti sono così immobilizzati su un supporto poroso solido o semisolido adiacente ad un tampone traspirante che muove il campione attraverso un flusso laterale.

Il limite del presente metodo è costituito dal fatto che sul supporto sono immobilizzati anticorpi specifici che permettono il riconoscimento e il dosaggio del singolo analita, ma che non rendono il metodo applicabile in maniera universale a tutti i possibili contaminanti e che, inoltre, non è comunque esente dai problemi sopra elencati per i tradizionali *wipe test*.

#### Presentazione dell'invenzione

10 Scopo della presente invenzione è quello di superare gli inconvenienti sopra indicati, mettendo a disposizione un kit per il rilevamento di sostanze contaminanti su superfici che permetta di ottenere campionamenti affidabili e riproducibili, eliminando gli inconvenienti dello stato dell'arte legati alle diverse modalità di esecuzione dei test da parte degli operatori.

15 Inoltre, ulteriore scopo è quello di mettere a disposizione un kit per il rilevamento di sostanze contaminanti su superfici che permetta di monitorare l'intero processo di raccolta, estrazione ed analisi dei contaminanti.

Ancora, altro scopo è quello di mettere a disposizione un kit per il rilevamento di sostanze contaminanti su superfici che elimini la possibilità di falsi negativi derivanti da una non corretta operazione di prelevamento.

20 Ancora, altro scopo è quello di mettere a disposizione un kit per il rilevamento di sostanze contaminanti su superfici che permetta di normalizzare i risultati ottenuti su un unico denominatore, armonizzando i dati fra i diversi laboratori.

Ancora altro scopo è quello di mettere a disposizione un kit per il rilevamento di sostanze contaminanti su superfici che assicuri che i risultati ottenuti dall'analisi ambientale siano corretti anche nel caso in cui il campionamento venga effettuato da un operatore inesperto.

25 Tali scopi, nonché altri che appariranno più chiari in seguito, sono raggiunti da un kit per il rilevamento di sostanze contaminanti su superfici che, in accordo alla rivendicazione 1, comprende una soluzione di bagnatura compatibile con le sostanze

30

contaminanti da saggiare e formulata per promuovere la risospensione ed il rilascio delle sostanze dalla superficie in esame, una matrice solida atta ad adsorbire detta soluzione di bagnatura per l'assorbimento reversibile della sostanza contaminante dalla superficie in esame, una soluzione di estrazione compatibile con le sostanze  
5 contaminanti ed atta al desorbimento delle sostanze contaminanti assorbite da detta matrice solida.

Secondo una caratteristica peculiare dell'invenzione, detta soluzione di bagnatura comprende una molecola di controllo biologicamente compatibile definente uno standard interno.

10 In questo modo, la valutazione della percentuale di recupero dello standard interno permette di normalizzare la resa delle operazioni e di minimizzare gli effetti di eventuali errori di raccolta del campione.

Infatti, la presenza dello standard assicura la buona efficacia del kit a prescindere dal modo in cui sono condotte le operazioni di campionamento, trasferimento nel tubo  
15 predisposto, trasporto ed analisi strumentale.

L'utilizzo del kit garantisce quindi che il dato finale sia attendibile portando alla corretta valutazione della contaminazione delle superfici prese in esame.

Secondo un ulteriore aspetto dell'invenzione è previsto un metodo per il rilevamento di contaminanti su superfici in accordo alla rivendicazione 9.

20 Forme vantaggiose di esecuzione dell'invenzione sono ottenute in accordo alle rivendicazioni dipendenti.

#### Descrizione dettagliata di alcuni esempi di realizzazione preferiti

Il kit secondo l'invenzione è stato sviluppato per il rilevamento di contaminanti chimici nocivi per la salute; un esempio in tal senso sono gli agenti chemioterapici  
25 quali ciclofosfamide, ifosfamide, docetaxel, paclitaxel, 5-fluorouracile, doxorubicina, metotrexato, irinotecano oppure i farmaci antineoplastici descritti, per esempio, in *Goodman et al, Goodman e Gilman's "The Pharmacological Basis of Therapeutics, 8th Ed., Macmillan Publishing Co., 1990"*.

Tuttavia, va sottolineato che il kit sarà utilizzabile per la valutazione della  
30 contaminazione dovuta ad altre sostanze pericolose, quali, ad esempio, farmaci

antibiotici ed antifungini, che posso causare danno se posti a contatto con mucose ed epidermide.

Le superfici da testare possono essere quelle presenti in qualsiasi sito di produzione, imballaggio, preparazione, somministrazione, test, uso e/o smaltimento di farmaci  
5 antineoplastici.

Esempi non limitativi dei siti di lavoro da cui un campione può essere raccolto, includono banchi da lavoro, cappe, scrivanie, superfici di laboratorio, autoclavi, vetreria, articoli di plastica, abbigliamento, pavimenti, pareti, soffitti, maniglie, attrezzature varie.

10 Il kit comprende essenzialmente una soluzione di bagnatura compatibile con le sostanze contaminanti da saggiare e formulata per promuovere la risospensione ed il rilascio delle sostanze dalla superficie in esame, una matrice solida atta ad adsorbire la soluzione di bagnatura per l'assorbimento reversibile della sostanza contaminante  
15 contaminanti ed atta al desorbimento delle sostanze contaminanti assorbite dalla matrice solida.

Quest'ultima sarà preferibilmente in un materiale poroso a base cellulosa e nella sua forma preferita potrà essere costituita o comunque comprendere una salviettina a matrice cellulosa, ideale per caratteristiche di bagnabilità, recupero degli analiti e  
20 resistenza alla frizione sulle superfici.

In particolare, la matrice solida dovrà consentire l'assorbimento reversibile del contaminante senza comportare alcuna modifica della sua struttura chimica.

In alternativa, la matrice solida potrà essere costituita o comunque comprendere altri strumenti tipicamente utilizzati nei *wipe test*, quali garze sterili in uno o più strati, carta  
25 filtro da laboratorio, spugnette assorbenti, panni antistatici in poliestere, bastoncini cotonati o di ovatta, batuffoli di ovatta.

Inoltre, il kit potrà comprendere anche più di un supporto per il prelievo di più campioni di contaminante.

Opportunamente, il kit sarà provvisto anche di un flacone contenente la soluzione di  
30 bagnatura da spargere sulla superficie da campionare ed un tubo di plastica contenente

la soluzione di estrazione ed in cui sarà riposta la matrice dopo la bagnatura di campionamento.

Per la bagnatura della matrice potrà essere predisposto un apposito strumento di versamento, ad esempio una pipetta Pasteur.

- 5 Secondo una formulazione preferita la soluzione di bagnatura sarà composta da una soluzione acquosa di solvente organico e di acido organico debole, ad esempio acido formico, in cui sarà inoltre presente anche una molecola di controllo biologicamente compatibile atta a definire uno standard interno, preferibilmente in forma liquida.

In maniera ancor più preferita il solvente organico sarà un solvente polare protico con  
10 concentrazione del 50% v/v nella soluzione acquosa, mentre la concentrazione dell'acido organico debole sarà pari a 0,1% v/v.

Altre formulazioni della soluzione di bagnatura, ad esempio, potrebbero essere ottenute con concentrazioni diverse dello stesso solvente organico (metanolo), oppure con un diverso tipo di solvente della stessa natura. Tale scopo potrebbe essere  
15 raggiunto con l'utilizzo, ad esempio di etanolo o isopropanolo.

Altri acidi deboli che potrebbero essere utilizzati in sostituzione dell'acido formico potrebbero essere l'acido ortofosforico o l'acido acetico.

Cambi nella formulazione della soluzione di bagnabilità potrebbero raggiungere lo stesso risultato voluto dal kit, ma inficiarne negativamente le prestazioni, ad esempio  
20 in termini di recupero delle molecole dalle superfici o prestazioni nell'analisi strumentale

La molecola di controllo dovrà essere atossica verso i sistemi biologici e non assorbibile per via transdermica.

Preferibilmente, la molecola di controllo avrà peso molecolare compreso tra 100 e 400  
25 u.m.a (unità di massa atomica) e coefficiente di ripartizione acqua/ottanolo (LogP) compreso tra -1 e 2.5.

Opportunamente, la molecola di controllo comprende gruppi funzionali protonabili o deprotonabili per la sua analizzabilità mediante tecniche di spettrometria di massa a sorgente electrospray.

30 In maniera esemplificativa, la molecola di controllo potrà essere scelta nel gruppo

comprendente le xantine, quali caffeina, teina e similari, i polifenoli, quali flavoni, flavonoidi e similari, gli aminoacidi e loro derivati, quali poli-tirosina, leucina e similari.

In particolare, tra le suddette molecole, la caffeina si è dimostrata essere  
5 particolarmente efficace essendo poco costosa, facilmente reperibile e di scarsa pericolosità, grazie al mancato assorbimento transdermico.

Preferibilmente, la soluzione di estrazione potrà comprendere una soluzione acquosa al 50% v/v di solvente organico e 0,1% di acido organico debole. Anche in questo caso il solvente organico sarà preferibilmente un solvente polare protico.

10 Operativamente, per il rilevamento delle sostanze contaminanti si procederà innanzitutto predisponendo la soluzione di bagnatura comprendente la molecola di controllo biologicamente compatibile definente lo standard interno e versandola su un'area della superficie da campionare.

Successivamente si provvederà a predisporre la matrice solida atta ad adsorbire la  
15 soluzione di bagnatura per l'assorbimento reversibile della sostanza contaminante dalla superficie in esame ed alla bagnatura della matrice solida con la soluzione di bagnatura per definire una matrice di saggio.

In particolare, la bagnatura si otterrà portando a contatto la matrice solida con l'area della superficie da campionare su cui è stata versata la soluzione di bagnatura, così da  
20 prelevare un campione di sostanza contaminante dalla superficie mediante la matrice di saggio.

La matrice di saggio verrà così inserita all'interno del tubo o altro contenitore in cui è presente la soluzione di estrazione compatibile con le sostanze contaminanti per ottenere il desorbimento delle sostanze contaminanti ed estrarne un campione da  
25 testare in laboratorio.

La fase finale di analisi del campione estratto potrà essere eseguita attraverso tecniche di cromatografia liquida o tecniche di spettrometria di massa accoppiate a cromatografia liquida (LC-MS/MS).

Queste ultime tecniche di analisi sono basate sull'identificazione delle molecole in  
30 esame attraverso la misura del rapporto massa/carica degli ioni corrispondenti ed il

loro dosaggio attraverso il confronto con rette di calibrazione ottenute da campioni a concentrazione nota.

Il kit ed il metodo secondo l'invenzione sono suscettibili di numerose modifiche e varianti, tutte rientranti nel concetto inventivo espresso nelle rivendicazioni allegate.

- 5 Tutti i particolari potranno essere sostituiti da altri elementi tecnicamente equivalenti, ed i materiali potranno essere diversi a seconda delle esigenze, senza uscire dall'ambito di tutela della presente invenzione.

### Rivendicazioni

1. Un kit per il rilevamento di contaminanti chimici su superfici, comprendente:
  - una soluzione di bagnatura compatibile con i contaminanti chimici da saggiare e formulata per promuovere la risospensione ed il rilascio dei contaminanti dalla  
5 superficie in esame;
  - una matrice solida atta ad adsorbire detta soluzione di bagnatura per l'assorbimento reversibile dei contaminanti dalla superficie in esame;
  - una soluzione di estrazione compatibile con i contaminanti ed atta al desorbimento dei contaminanti assorbiti da detta matrice solida;
- 10 **caratterizzato dal fatto che** detta soluzione di bagnatura comprende una molecola di controllo biologicamente compatibile definente uno standard interno.
2. Kit secondo la rivendicazione 1, caratterizzato dal fatto che detta molecola di controllo è atossica verso i sistemi biologici.
3. Kit secondo la rivendicazione 1 o 2, caratterizzato dal fatto che detta molecola di  
15 controllo ha peso molecolare compreso tra 100 e 400 u.m.a e coefficiente di ripartizione acqua/ottanolo (LogP) compreso tra -1 e 2.5.
4. Kit secondo una o più delle rivendicazioni precedenti, caratterizzato dal fatto che detta molecola di controllo comprende gruppi funzionali protonabili o deprotonabili per la sua analizzabilità mediante tecniche di spettrometria di massa a sorgente  
20 electrospray.
5. Kit secondo una o più delle rivendicazioni precedenti, caratterizzato dal fatto che detta molecola di controllo è scelta nel gruppo comprendente le xantine, quali caffeina, teina e similari, i polifenoli, quali flavoni, flavonoidi e similari, gli aminoacidi e loro derivati, quali poli-tirosina, leucina e similari.
- 25 6. Kit secondo una o più delle rivendicazioni precedenti, caratterizzato dal fatto che detta soluzione di bagnatura comprende una soluzione acquosa al 50% v/v di solvente organico e 0,1% di acido organico debole, detto solvente organico essendo preferibilmente un solvente polare protico.
7. Kit secondo una o più delle rivendicazioni precedenti, caratterizzato dal fatto che  
30 detta matrice solida è costituita da un materiale poroso a base cellulosica.

8. Un metodo per il rilevamento di contaminanti chimici su superfici, comprendente le seguenti fasi:
- a) predisposizione di una soluzione di bagnatura compatibile con i contaminanti da saggiare e formulata per promuovere la risospensione ed il rilascio dei contaminanti  
5 dalla superficie in esame;
  - b) predisposizione di una matrice solida atta ad adsorbire detta soluzione di bagnatura per l'assorbimento reversibile dei contaminanti dalla superficie in esame;
  - c) bagnatura di detta matrice solida con detta soluzione di bagnatura per definire una matrice di saggio;
  - 10 d) prelievo di un campione di contaminante dalla superficie mediante detta matrice di saggio;
  - e) predisposizione di una soluzione di estrazione compatibile con i contaminanti;
  - f) desorbimento dei contaminanti assorbiti da detta matrice solida mediante bagnatura con detta soluzione di estrazione per l'estrazione di un campione da testare  
15 in laboratorio;
  - g) analisi di detto campione estratto:
- caratterizzato dal fatto che** detta soluzione di bagnatura comprende una molecola di controllo biologicamente compatibile definente uno standard interno.
9. Metodo secondo la rivendicazione 8, caratterizzato dal fatto che detta analisi di  
20 detto campione estratto è eseguita attraverso tecniche di cromatografia liquida o tecniche di spettrometria di massa accoppiate a cromatografia liquida (LC-MS/MS).