

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 公表特許公報(A)

(11) 特許出願公表番号

特表2004-525359
(P2004-525359A)

(43) 公表日 平成16年8月19日(2004.8.19)

(51) Int.C1.⁷

F 1

テーマコード(参考)

G 01 N 33/53

G 01 N 33/53

G

G 01 N 33/543

G 01 N 33/543

5 4 1 B

G 01 N 33/553

G 01 N 33/543

5 4 1 Z

G 01 N 33/577

G 01 N 33/543

5 4 5 A

G 01 N 33/543

5 7 5

審査請求 未請求 予備審査請求 有 (全 45 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号	特願2002-557773 (P2002-557773)	(71) 出願人	500020704 ライフポイント インコーポレイテッド アメリカ合衆国 カリフォルニア州 91 730 ランチョウ キュカモンガ トレ イドマーク ストリート 10400
(86) (22) 出願日	平成13年11月29日 (2001.11.29)	(74) 代理人	100081422 弁理士 田中 光雄
(85) 翻訳文提出日	平成15年6月4日 (2003.6.4)	(74) 代理人	100096079 弁理士 大角 美佐子
(86) 國際出願番号	PCT/US2001/045024	(74) 代理人	100126778 弁理士 品川 永敏
(87) 國際公開番号	W02002/057739	(72) 発明者	ワン・グオホン アメリカ合衆国 カリフォルニア州 91 730 ランチョウ キュカモンガ トレ イドマーク ストリート 10400 最終頁に続く
(87) 國際公開日	平成14年7月25日 (2002.7.25)		
(31) 優先権主張番号	09/730,095		
(32) 優先日	平成12年12月4日 (2000.12.4)		
(33) 優先権主張国	米国(US)		

(54) 【発明の名称】試料中のアンフェタミンおよびメタンフェタミンの新規トレーサーの組成物および合成方法

(57) 【要約】

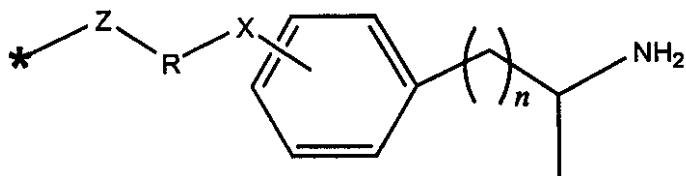
【化1】

【特許請求の範囲】

【請求項 1】

Fig. 5 に記載の一般式：

【化 1】



10

Fig. 5

[式中、

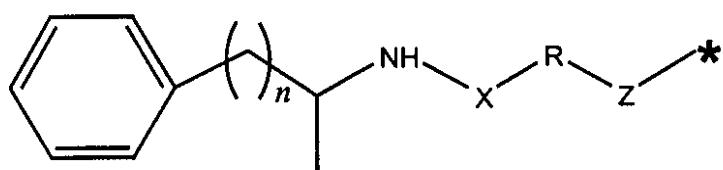
- (a) n は、2、3 および 4 からなる群から選ばれる数であり；
- (b) R は、- (C H₂)_n - および C (O) - (C H₂)_n C O からなる群から選ばれる基であり；
- (c) X は、O、NH、CO、H N C S N H、CH₂、S および SO₂ からなる群から選ばれる基であり；
- (d) Z は、アミンおよびカルボキシルからなる群から選ばれる基であり；
- (e) * は、標識である]

で示される、試料中のアンフェタミンおよびその誘導体の存在または含有量の検出のため 20
の免疫測定法に使用するための合成トレーサー。

【請求項 2】

Fig. 6 に記載の一般式：

【化 2】



30

Fig. 6

[式中、

- (a) n は、2、3 および 4 からなる群から選ばれる数であり；
- (b) R は、- (C H₂)_n - および C (O) - (C H₂)_n C O からなる群から選ばれる基であり；
- (c) X は、O、NH、CO、H N C S N H、CH₂、S および SO₂ からなる群から選ばれる基であり；
- (d) Z は、アミンおよびカルボキシルからなる群から選ばれる基であり；
- (e) * は、標識である]

で示される、試料中のアンフェタミンおよびその誘導体の存在または含有量の検出のため 40
の免疫測定法に使用するための合成トレーサー。

【請求項 3】

Fig. 7 に記載の一般式：

【化3】

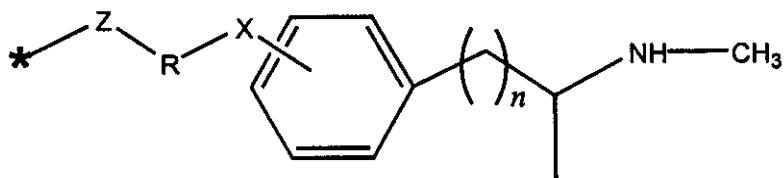


Fig. 7

10

[式中、

- (a) n は、2、3 および 4 からなる群から選ばれる数であり；
- (b) R は、- (C H₂)_n - および C (O) - (C H₂)_n C O からなる群から選ばれる基であり；
- (c) X は、O、N H、C O、H N C S N H、C H₂、S および S O₂ からなる群から選ばれる基であり；
- (d) Z は、アミンおよびカルボキシルからなる群から選ばれる基であり；
- (e) * は、標識である】

で示される、試料中のアンフェタミンおよびその誘導体の存在または含有量の検出のための免疫測定法に使用するための合成トレーサー。

【請求項 4】

Fig. 8 に記載の一般式：

【化4】

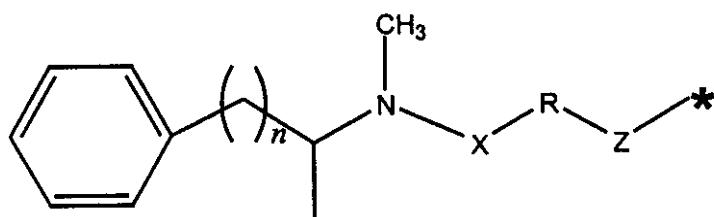


Fig. 8

30

[式中、

- (a) n は、2、3 および 4 からなる群から選ばれる数であり；
- (b) R は、- (C H₂)_n - および C (O) - (C H₂)_n C O からなる群から選ばれる基であり；
- (c) X は、O、N H、C O、H N C S N H、C H₂、S および S O₂ からなる群から選ばれる基であり；
- (d) Z は、アミンおよびカルボキシルからなる群から選ばれる基であり；
- (e) * は、標識である】

で示される、試料中のアンフェタミンおよびその誘導体の存在または含有量の検出のための免疫測定法に使用するための合成トレーサー。

【請求項 5】

標識が、フルオロフォア、発色団、放射性標識、金属性コロイド、酵素または化学発光もしくは生物発光分子からなる群から選ばれる、請求項 1 ~ 4 のいずれか 1 項記載の合成トレーサー。

【請求項 6】

標識が、Fig. 3 および 4 に記載の蛍光染料であり、式中：

- (a) m が、0、1、2、3 および 4 からなる群から選ばれ数であり；および
- (b) X が、O S u および E D A からなる群から選ばれる基である、

請求項 1 ~ 4 のいずれか 1 項記載の合成トレーサー。

【請求項 7】

40

50

試料中のアンフェタミンおよびその誘導体の存在および含有量の測定方法であって、工程：
：

- (a)アンフェタミンの固相 - 固定抗体を準備し、
- (b)抗体の抗原結合部位を、請求項 1 ~ 4 のいずれか 1 項に記載の合成トレーサーに暴露させ、固相 - 固定・標識合成トレーサー - 抗体複合体(ここで、抗体の抗原結合部位が標識合成トレーサーで飽和されている)を形成させ、
- (c)アンフェタミンを含む疑いのある試料を、固相 - 固定・標識抗原 - 抗体複合体を通して非平衡条件下連続して流し、および
- (d)置換された請求項 1 ~ 4 のいずれか 1 項に記載の標識合成トレーサーを検出し、上記置換された標識合成トレーサーの量が、試料中の上記アンフェタミンの濃度に直接比例している

10
を含むことを特徴とする方法。

【請求項 8】

試料が、唾液、全血、血清、血漿または尿などの生物学的試料である、請求項 7 記載の方法。

【請求項 9】

試料が、水性試料である、請求項 7 記載の方法。

【請求項 10】

特異的抗体が、アンフェタミンおよびそれらの誘導体に特異的なモノクローナル抗体またはポリクローナル抗体である、請求項 7 記載の方法。

【請求項 11】

Fig. 9 に記載の化合物を含むことを特徴とする、試料中のアンフェタミンおよびその誘導体の存在または含有量の検出のための免疫測定法に使用するための合成トレーサー。

【請求項 12】

Fig. 10 に記載の化合物を含むことを特徴とする、試料中のアンフェタミンおよびその誘導体の存在または含有量の検出のための免疫測定法に使用するための合成トレーサー。

【請求項 13】

トレーサーが Fig. 2 に記載のフェニルアルキルアミン(ここで、 $n > 1$)を含むことを特徴とする、試料中にアンフェタミンおよびその誘導体の存在または含有量の検出のための免疫測定法に使用するための合成トレーサー。

30
【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は生物学的または水性試料中のアンフェタミン(APM)、メタンフェタミン(MAM)およびそれらの誘導体などの規制薬物の検出のための免疫測定における新規トレーサーおよびそれらの合成および使用に関する。具体的には、非規制薬物がトレーサー合成の出発物質および抗体に関して得られた新規トレーサー上の結合部位の両方であり、それによって、出発物質として規制薬物の使用の必要性を排除することができる新規トレーサーの合成方法を提供する。さらに、本発明の新規トレーサーは連続流動置換免疫測定法(continuous flow displacement immunoassay)などの免疫測定法における分析物類似体として用いることができる。連続流動置換免疫測定法は、最初に固定抗体が標識分析物類似体で飽和され、標識分析物類似体が試験試料中の分析物によって置換され、ついで置換された標識分析物類似体を測定するという原理によって行われる。意外にも、本発明の新規トレーサーが、従来設計されたトレーサーと比較して、連続流動置換免疫測定法の性能を実質的に改善することができた。

40
【背景技術】

【0002】

アンフェタミンおよびメタンフェタミンはフェニルエチルアミンとして知られている化合物の誘導体である。アンフェタミンおよびメタンフェタミンは両方とも中枢神経および末梢神経系の交感神経部位の刺激剤である。他の刺激剤と同様に、アンフェタミンまたはメ

10

20

30

40

50

タンフェタミン摂取の短期効果は心拍数の増加、血圧上昇、食欲減退、瞳孔散大、幸福および能力感、疲労感の減少を含む。それらの刺激作用がこれらの化合物が濫用され違法に販売される理由である。

【0003】

よくあるアンフェタミンおよびメタンフェタミンの濫用のために、生物学的標本中のこれらの薬物の存在を検出する非-侵襲的で迅速な試験法の必要性が増大している。過去において、生物学的試料中のアンフェタミンは、薄層クロマトグラフィー(TLC)、高速液体クロマトグラフィー(HPLC)およびガスクロマトグラフィー/質量分析(GC/MS)などの多数の技法のよって検出されてきた。これらの試験方法は一般に、時間がかかり、検出感度が低い(Vapatalo, H. K. S. および Senius, K. E., Comparison of Saliva and Urine Samples in Thin-Layer Chromatographic Detection of Central Nervous System Stimulants, Int'l. J. Clin. Pharmacol. Res., 4: 5-8 (1984), Cook, C. E. ら, Pharmacokinetics of Metanphetamine Self-administered to Human Subjects by Smoking s-(+)-Metanphetamine hydrochloride, Drug Metab. Dispos., 21: 717-723 (1993), Suzuki, S. ら, Analysis of Metanphetamine in Hair, Nail, Sweat, and Saliva by Mass Fragmentography, J. Anal. Toxicol., 13: 176-178 (1989)参照、これらをここに引用してこの明細書の記載とする)。さらに、TLC、HPLC および GC/MS には高度の熟練者を必要とするので行うのが困難である。免疫測定法は、アンフェタミンおよびメタンフェタミンの検出および定量のために、TLC、HPLC および GC/MS の使用に代わる好ましい方法を提供してきた。具体的には、免疫測定法は感度、効率を改善し、より労働集約的でない。尿中のアンフェタミンおよびメタンフェタミンの検出のための多数の検出免疫測定法技術が開発されてきた(Brynes ら、EPO # 279,213 B1, Hu ら、EPO # 371,422 A2 および Heiman ら、EPO # 371,253 A2 参照、これらのすべての記述をここに引用してこの明細書の記載とする)。さらに、連続流動置換免疫測定法(continuous flow displacement immunoassay)は唾液および尿における濫用薬物の有用かつ迅速な検出方法であることが示されている(Hao Yu ら, Use of the USDT Flow Immunosensor for Quantitation of Benzolecgonine in Urine, Biosensors and Bioelectronics, 725-734 (1996); Nam, D. ら, Programme and Abstracts of TIAFT 2000 at Helsinki, 2000; Liang, G. ら、Proc. of ICADTS 2000, Jun. 22-26, 2000 参照、これらのすべての記述をここに引用してこの明細書の記載とする)。

【0004】

本発明に用いられるトレーサーは免疫測定法に用いられる標識抗体またはヘプタンであり、抗体の抗原結合部位について当該特定の物質(分析物)と競合する。トレーサーは標識された被検出分析物と同じ抗原またはヘプタンであってもよいし、または、構造的に分析物と関連し、選択された抗体に対して望ましい交差反応をするように修飾されていてもよい。連続流動置換免疫測定法において、例えば、結合親和性を減少させる標識抗原またはヘプタンに対する修飾は事実置換反応を促進し、その結果、系の感度を上げる。禁制薬物の検出のために、多くの免疫測定法は一般に禁制薬物自体を、すなわち、標識アンフェタミンおよびメタンフェタミンを、試料中のこれらの物質の存在および含有量の検出のためのトレーサーとして用いる。これら薬物は規制されているから、研究室でのそれらの使用には、一連の操作手順および事務処理が伴う。最近、アンフェタミンおよびメタンフェタミントレーサー合成における出発物質として非-規制薬物の使用が報告されている(Heiman, D. ら, EP 0 371 233 A2)が、合成された最終トレーサーは、やはりアンフェタミン抗体の結合部位としてアンフェタミン分子自体を含んでいる。

【0005】

Fig. 1 に示すように、トレーサーの合成には種々の方法がある。トレーサー合成の通常の方法の1つは、出発物質として、アンフェタミンおよびメタンフェタミンなどの禁制薬物の使用を含む(Salamamone, S. ら, EP 0 386 644 A2)。これらの出発物質は複数の合成工程を経て、薬物ベースのトレーサーを得る(Fig. 1、方法 A 参照)。トレーサー合成の別法は非-規制薬物を出発物質として使用し、薬物ベースのトレーサーを得るものである

(Heiman, D. F. ら, EP 0 371 233 A2)(Fig. 1、方法 B 参照)。これら 2 つの方法において、合成経路は出発物質、中間体または最終製造トレーサーとして禁制薬物を含む。

【0006】

本発明は、非 - 規制薬物から製造され、トレーサーとして標識非 - 規制薬物を生成する新規な 1 組のトレーサーの合成方法を提供する(Fig. 1、方法 C 参照)。これらの非 - 規制薬物ベースのトレーサーの合成は、合成過程のいずれの段階でも禁制薬物の製造を含まない。本発明者らはこれらの新規トレーサーが生物学的または水性試料中のアンフェタミンおよびメタンフェタミンの存在および / または含有量を検出する免疫測定法での使用に理想的であるとの知見を得た。本発明者らは、免疫測定法系において抗体が生物学的試料中の分析物より低い親和性のトレーサーに結合する限り、特定の標識分析物自体(すなわち、アンフェタミン)をトレーサーにする必要がないことを知った。本発明の新規トレーサーは特に連続流動置換免疫測定法に有効である。

10

【発明の開示】

【0007】

発明の要約

本発明は、生物学的または水性試料中のアンフェタミン(APM)、メタンフェタミン(MAPM)およびそれらの誘導体の検出のための免疫測定法における使用に適した新規組成物に関する。本発明で開発されたトレーサー合成方法は、トレーサー合成の出発物質または生成物として禁制薬物、すなわち、アンフェタミンおよびメタンフェタミンを排除する。これらの非 - 薬物ベースのトレーサーは特に連続流動置換免疫測定法に有用である。本発明は新規トレーサーの合成方法および生物学的試料におけるフェニルエチルアミン誘導体の検出および定量のための蛍光免疫測定法におけるこれらのトレーサーの使用に関する。

20

【0008】

Fig. 2 はアンフェタミンおよびメタンフェタミンの基本構造を示す。アンフェタミンおよびメタンフェタミンは本発明の免疫測定法において検出され得る分析物の例である。アンフェタミンは n 値が 1 である。本発明のトレーサーは n 値が 1 より大である。好ましいトレーサーは n 値が 2 またはそれより大である。Fig. 3 および 4 は本発明のトレーサー合成に用いられ得る通常の蛍光標識を示す。

30

【0009】

本発明の具体例において、合成新規トレーサーは、標識された 1 - メチル - 3 - フェニルアルキルアミンであり、Fig. 5 に示される化合物である。

【0010】

本発明の別の具体例において、合成新規トレーサーは N - 標識 - 1 - メチル - 3 - フェニルアルキルアミンであり、Fig. 6 に示される化合物である。

【0011】

本発明の別の具体例において、合成新規トレーサーは標識 N - メチル - 1 - メチル - 3 - フェニルアルキルアミンであり、Fig. 7 に示される化合物である。

【0012】

本発明の別の具体例において、合成新規トレーサーは N - 標識 N - メチル - 1 - メチル - 3 - フェニルアルキルアミンであり、Fig. 8 に示される化合物である。

40

【0013】

本発明の好ましい具体例において、合成新規トレーサーは、パラ - ヘミスクシニト - 1 - メチル - 3 - フェニルアルキルアミン - N - トリフルオロアセトアミドのスクシニジル活性エステルと Cy5 E D A との反応生成物であり、Fig. 9 および 10 に示される化合物である。この好ましいトレーサーは実施例 II に記載の方法によって合成される。

【0014】

好ましい具体例の詳細な記載

本発明は生物学的試料中のアンフェタミン、メタンフェタミンおよびそれらの誘導体の存在および / または含有量を検出するための蛍光免疫測定法における使用のための組成物お

50

および化合物の合成方法を提供する。生物学的試料中のアンフェタミンおよびメタンフェタミンの検出のための組成物またはトレーサーは特に連続流動置換免疫測定法に適している。

【 0 0 1 5 】

連続流動置換免疫測定法において、分析物および抗体の動態学的性質は重要な役割を果たす。分析物は免疫測定法で試験される物質である。例えば、本発明においては、分析物はアンフェタミンまたはメタンフェタミンであってもよい。抗体は分析物を認識し、分析物に特異的に結合し得る。トレーサーは抗体に対する結合について分析物と競合し得る標識された化合物である。本発明は、3つの部分を有するトレーサーを用いる。すなわち、抗体に結合する部位、結合基および標識である。抗体に結合する分析物上の部位は通常抗体に結合するトレーサー上の部位と類似している。言いかえれば、もし、分析物がアンフェタミンのとき、アンフェタミンに対する抗体は分析物上で認識するのと同じトレーサー上の結合部位を認識する。

【 0 0 1 6 】

典型的な連続流動置換免疫測定法は、アンフェタミンまたはメタンフェタミンに対する固-相固定抗体を含む。抗体の抗原結合部位は合成標識トレーサーに暴露され、標識合成トレーサー-抗体複合体を形成する。抗体は抗体の抗原結合部位が標識合成トレーサーで飽和されるようにトレーサーに暴露される。ついで、分析物であるアンフェタミンまたはメタンフェタミンを含有する疑いのある生物学的試料が連続して固-相固定抗体-標識合成トレーサー複合体を通過していく。もし、試料中に分析物が存在すると、分析物は抗体に結合し、標識合成トレーサーと置換される。従って、結合点より下流での標識トレーサーの検出は、生物学的試料中の分析物の存在および含有量を示す(Liglerら、U.S. Pat. N o. 5,183,740、記載のすべてをここに引用してこの明細書の記載とする)。

【 0 0 1 7 】

連続流動置換免疫測定法ベースの生成物の開発の成功は、抗体からの結合トレーサーのすばやい解離速度を達成し、それによって分析物の迅速な結合を可能にする抗体およびトレーサーの選択による。一般に、理想的な連続流動置換免疫測定法は、抗体が分析物に対して高い親和性を有し、トレーサーに対してはより低い親和性を有する系を用いる。抗体が分析物に対して高い親和性を有し、トレーサーに対してはより低い親和性を有するというこの組合せはより迅速な置換を促進する。本発明において、トレーサーは下記の性質を有する：抗体に対するトレーサーの親和性は、20-100%の範囲のいずれでもよい。好ましいトレーサーは、抗体に対して約40-80%交差-反応性を有する。本発明の目的のために、トレーサーが構造的に分析物であるアンフェタミンまたはメタンフェタミンに関連することは重要ではない。トレーサーのリガンド-結合部位が抗体と20-100%の交差-反応性を有する限り、免疫測定法、具体的には、連続流動置換免疫測定法における使用に適している。アンフェタミンおよびメタンフェタミンに対する抗体の多くはフェニルエチルアミン誘導体を認識する。本発明のトレーサーは、抗体がフェニルエチルアミン類似体を認識し得るかぎり有用である。分析物に対する構造的類似性は問題ではない。この特徴、トレーサーと分析物との間の構造的非類似性は、本発明のトレーサーと先行技術のトレーサーを差別化するものである。

【 0 0 1 8 】

トレーサーの標識は、当分野に公知の従来の方法によって行うことができる。標識そのものは、適切には、フルオロフォア、発色団、放射性標識、金属性コロイド、酵素または化学発光もしくは生物発光分子であってもよい。適切なフルオロフォアsおよび発色団は、R. P. Haugland, Molecular Probes, Handbook of Fluorescent Probes and Research Chemicals, 5th Ed., Molecular Probes, Inc., Eugene, Oreg., 1992に記載されており、ここに引用して明細書の記載とする。好ましいフルオロフォアの例には、フルオレセイン、ローダミンおよびスルフォインドシアニン染料、Cy5 (Mujumdar, R. B.ら、Bioconjugate Chemistry, vol. 4, p. 105 (1992))が含まれる。

【 0 0 1 9 】

10

20

30

40

50

本発明の使用に用い得る広範囲の抗体は市販されている(例えば、Omega Biologicals, Inc., 910 Technology Blvd., Bozeman, Mont. から)かまたは、文献から入手できる製造方法の記載から製造することができる。モノクローナルまたはポリクローナル抗体などの抗体は、市販されているか、文献に記載されており、広範囲の標的物質の同定のために本発明の方法に採用または適合し得る。

【0020】

この方法は、これらに限定されないが、水、血液、血漿、血清または尿を含む生物学的または水性試料の特定の成分を検出するために用いることができる。唾液は、濫用薬物の検出および測定のための有効な試験材料であることが示されている("Saliva as a Diagnostic Fluid", Ed by D. Malamud and L. Tabak, Annals of the New York Academy of Sciences, 1993, V. 694.). 例えは、唾液試料中のメタンフェタミンは、最終投与2日後まで G C / M A S S によって検出することができる(S. Suzuki, T. Inoue and S. Inayama, Analysis of methamphetamine in hair, nail, sweat, and saliva by mass fragmentography, J. Anal. Toxicol. 1989, 13, 176-178.).

【0021】

下記の実施例は本発明の実施に用い得る具体的な技術を含む本発明の具体的な適用を詳述するために記載されている。これらの具体的な実施例は適用に記載されたものに本発明の範囲を限定するものではない。

【実施例】

【0022】

実施例 1

標識トレーサーの一般的製造方法

p'、o'およびm' - 置換トレーサー合成のフローチャートが Fig. 12 に記載されている。製造工程の詳細な記述は以下の通りである。

【0023】

A. パラ、メタおよびオルト - ニトロアンフェタミン - N - トリフルオロアセトアミドの製造および分離

トリフルオロ無水酢酸 0.7 mLをアセトニトリル 1 mL中パラ - 、メタ - およびオルト - ニトロアンフェタミンの混合物 0.4 gの溶液に 0 にてゆっくりと添加した。得られた混合物を 0 にて 1 時間攪拌し、冷蔵庫中で 4 にて一夜維持した。揮発物質を除去し、粗生成物をシリカゲルカラムにかけ、1 : 2 酢酸エチル / ヘキサンで溶出させて精製した。この方法で、純粋なパラ - ニトロアンフェタミン - N - トリフルオロアセトアミド 0.15 g、純粋なメタ - ニトロアンフェタミン - N - トリフルオロアセトアミド 0.03 g および純粋なオルト - ニトロアンフェタミン - N - トリフルオロアセトアミド 0.04 gを得た。

【0024】

B. パラ - アミノアンフェタミン - N - トリフルオロアセトアミドの製造

製造したパラ - ニトロアンフェタミン - N - トリフルオロアセトアミド 0.15 gをエタノール 8 mLに溶解した。10% Pd / C 0.4 mgをこの溶液に添加した。混合物を H₂ 下室温にて一夜水素添加した。触媒および溶媒を除去すると、暗緑色の残渣が得られた。得られた混合物を分取シリカ薄層クロマトグラフィーで、展開剤として 1 / 1 の酢酸エチル / ヘキサン混合物を用いて精製した。かくして、対応アミン生成物 0.75 mgを得た。

【0025】

C. パラ - イソチオシアナトアンフェタミン - N - トリフルオロアセトアミドの製造

ジクロロメタン 0.5 mL中パラ - アミノアンフェタミン - N - トリフルオロアセトアミド 2.5 mg の混合物を攪拌し、NaHCO₃ 1.5 μLおよびチオホスゲンを混合物に添加した。得られた混合物を室温にて 30 分攪拌した。ついで反応混合物をシリカプレートで精製し、パラ - イソチオシアナトアンフェタミン - N - トリフルオロアセトアミド 2.1 mgを得た。

【0026】

10

20

30

40

50

D. パラ - イソチオシアナトアンフェタミン - N - フルオロアセトアミドと Cy5 E D A のカップリング

ホウ酸緩衝液(pH 8) 0.5 mL 中パラ - イソチオシアナトアンフェタミン - N - トリフルオロアセトアミド 2 mg および Cy5 E D A の混合物を室温にて 4 時間攪拌した。得られた溶液を直接 C 18 プレートにスポットし、70 / 30 (v/v) メタノール / 水で展開した。生成物のバンドを切り取り、メタノールで抽出した。

【 0027 】

実施例 11

好ましいアンフェタミン免疫測定トレーサーの製造

好ましいトレーサー合成のフローチャートが Fig. 13 に記載されている。トレーサーの 10 製造工程の詳細な記述は以下の通りである。

【 0028 】

工程 1 : 1 - メチル - 3 - フェニルプロピルアミン - N - トリフルオロアセトアミドの製造

アセトニトリル 5 mL 中 1 - メチル - 3 - フェニルプロピルアミン 3 g の溶液を室温にて攪拌した。トリフルオロ無水酢酸 4 mL およびピリジン 1.3 mL をこの溶液に室温にて添加した。得られた反応混合物を室温にて一夜攪拌し、ついで、混合物を氷水に入れた。粗生成物を酢酸エチルで抽出し、一緒にした有機層を Na₂SO₄ で乾燥した。有機溶媒を除去し、1 - メチル - 3 - フェニルプロピルアミン - N - トリフルオロアセトアミドを得た。

【 0029 】

工程 2 : パラ - ヘミスクシニト - 1 - メチル - 3 - フェニルプロピルアミン - N - トリフルオロアセトアミドの製造

AlCl₃ を、ジクロロメタン 5 mL 中無水コハク酸 0.24 g および 1 - メチル - 3 - フェニルプロピルアミン - N - トリフルオロアセトアミド 0.4 g の混合物に室温にて添加した。得られた混合物を 0 ℃ にて 1 時間攪拌し、ついで室温にて一夜放置した。3 M HCl 水溶液 5 mL を混合物に添加し、有機層を酢酸エチルで抽出した。一緒にした有機層を Na₂SO₄ で乾燥し、粗生成物 0.5 g を得た。粗生成物をさらにシリカゲルカラムで、1 : 2 エチル / ヘキサンで溶出させて精製を完了した。純粋なパラ - ヘミスクシニト - 1 - メチル - 3 - フェニルプロピルアミン - N - トリフルオロアセトアミド 0.3 g を得た。

【 0030 】

工程 3 : パラ - ヘミスクシニト - 1 - メチル - 3 - フェニルプロピルアミン - N - トリフルオロアセトアミドの還元

製造したパラ - ヘミスクシニト - 1 - メチル - 3 - フェニルプロピルアミン - N - トリフルオロアセトアミド 0.2 g を酢酸 3 mL に溶解した。10% Pd / C 0.3 mg をこの溶液に添加した。混合物を H₂ 下室温にて一夜水素添加し、触媒および溶媒を除去すると、油状の残渣が残った。得られた混合物を分取シリカ TLC で、展開剤として、1 : 1 比の酢酸エチル / ヘキサンを用いて精製した。純粋な還元パラ - ヘミスクシニト - 1 - メチル - 3 - フェニルプロピルアミン - N - トリフルオロアセトアミド 83 mg を得た。

【 0031 】

工程 4 : パラ - ヘミスクシニト - 1 - メチル - 3 - フェニルプロピルアミン - N - トリフルオロアセトアミドのスクシニミジル活性エステルの製造

N, N' - ジスクシンミジルカーボネート 40 mg およびピリジン 60 μL を、アセトニトリル 1 mL 中パラ - ヘミスクシニト - 1 - メチル - 3 - フェニルプロピルアミン - N - トリフルオロアセトアミド 40 mg の攪拌混合物に添加した。得られた混合物を室温にて 4 時間攪拌した。反応混合物をシリカプレートで精製し、パラ - ヘミスクシニト - 1 - メチル - 3 - フェニルプロピルアミン - N - トリフルオロアセトアミドのスクシニミジル活性エステル 25 mg を得た。

【 0032 】

工程 5 : パラ - ヘミスクシニト - 1 - メチル - 3 - フェニルプロピルアミン - N - トリフ 50

ルオロアセトアミドのスクシニミジル活性エステルと Cy5 E D A のカップリング
ホウ酸緩衝液(pH 9) 0.5 mL 中パラ - ヘミスクシニト - 1 - メチル - 3 - フェニルプロ
ピルアミン - N - トリフルオロアセトアミドのスクシニミジル活性エステル 2 mg および
Cy5 E D A 2.5 mg の混合物を室温にて 4 時間攪拌した。得られた溶液を C 18 プレー
トにかけ、70 / 30 (v/v) の割合のメタノール/水で展開した。生成物のバンドを切り取
り、メタノールで抽出した。カップリング生成物は好ましいアンフェタミン免疫測定トレ
ーサーである。

【 0 0 3 3 】

実施例 III

流動免疫測定法の操作

10

ライフポイント・インコーポレイテッドは、連続流動置換免疫測定法を行うための必要な
ポンプ、バルブ、配管、交換可能カラムおよび蛍光検出器を含む流動免疫測定法装置を開
発した。アンフェタミン標準曲線を、陰性の唾液に種々の濃度のアンフェタミン (Sigma C
hemicals, St. Louis, Mo.) を添加して作成した。化学薬品および緩衝液はシグマおよび
アルドリッヂ・カンパニーから入手した。

【 0 0 3 4 】

(a) 試薬の製造

唾液中のアンフェタミンの存在の測定のために、特異的抗 - アンフェタミンモノクローナ
ル抗体 (例えば、Omega Biologicals, Inc., Bozeman, Mont. から入手可能) を、製造業社
の標準プロトコルに従ってエンフェース (Emphase) 多孔性ビーズに結合または固定した。
抗体 - 結合ビーズをついで製造した Cy5 - 標識アンフェタミントレーサーで飽和させた
。得られたトレーサー - 抗体 - 樹脂複合体混合物を一夜 4 にて回転混合させながら放置
した。複合樹脂を 0.1 M P B S (10% MeOH) で安定的な基準線が得られるまで洗滌した。
洗滌した樹脂を等容量の 50 mM P B S (pH 7.4) 中 150 mM トレハロース緩衝液に添加
した。樹脂を凍結 - 乾燥した。

20

【 0 0 3 5 】

(b) 流動測定法

内直徑 2 mm および長さ 10 mm のミクロ - ポリスチレンカラムに製造した樹脂 4 mg を充
填した。充填したカラムをライフポイント免疫測定法装置の 5 つの流動導管の 1 つに取り
付けた。カラムはラブビューソフト (Labview software, National Instruments, Inc.) で
支持された自動システムで制御された適当な緩衝液で予 - 洗した。唾液試料 50 μl を、
流速 100 ~ 300 μl / 分で導管を通過させた。蛍光シグナルの平均強度を試料中のアン
フェタミン濃度の測定のために用いた。

30

【 0 0 3 6 】

実施例 IV：好ましいメタンフェタミン免疫測定トレーサーの製造

工程 1 : N - メチル - 1 - メチル - 3 - フェニルプロピルアミン - N - トリフルオロアセ
トアミドの製造

アセトニトリル 1 mL 中 N - メチル - 1 - メチル - 3 - フェニルプロピルアミン 0.4 g の
溶液を攪拌した。トリフルオロ無水酢酸 1 mL およびピリジン 0.6 mL をこの溶液に室温
にて添加し、得られた混合物を一夜室温にて攪拌した。次に、混合物を氷水に入れた。粗
生成物を酢酸エチルで抽出し、有機層を一緒にし、Na₂SO₄ で乾燥した。有機溶媒を除去して所望の生成物を得た。TLC 分析でこの生成物が次の合成工程に十分純粋であるこ
とを確認した。

40

【 0 0 3 7 】

工程 2 : p' - ヘミスクシニト - N - メチル - 1 - メチル - 3 - フェニルプロピルアミン -
N - トリフルオロアセトアミドの製造

AlCl₃ 0.2 g を、ジクロロメタン 5 mL 中無水コハク酸 0.1 g および N - メチル -
1 - メチル - 3 - フェニルプロピルアミン - N - トリフルオロアセトアミド 0.2 g の混
合物に室温にて添加した。得られた混合物を 2 ~ 8 にて 1 時間攪拌し、ついで室温にて一夜放置した。3 M HCl 水溶液 2 mL を混合物に添加し、生成物を酢酸エチルで抽出し

50

た。有機層を一緒にし、 Na_2SO_4 で乾燥し、粗生成物 0.2 gを得た。粗生成物をさらにシリカゲルカラムで、エチル/ヘキサン(1:2)で溶出させて精製を完了し、純粋な生成物 0.12 gを得た。

【0038】

工程3:パラ-ヘミスクシニト- N -メチル-1-メチル-3-フェニルプロピルアミン- N -トリフルオロアセトアミドの還元

製造したパラ-ヘミスクシニト-1-メチル-3-フェニルプロピルアミン- N -トリフルオロアセトアミド 0.2 gを酢酸 3 mLに溶解した。10% Pd/C 0.3 mgをこの溶液に添加した。混合物を H_2 下室温にて一夜水素添加した。触媒および溶媒を除去し、油状の残渣を得た。得られた混合物をシリカ TLC で、展開剤として、(1:1)酢酸エチル/ヘキサンを用いて精製した。工程終了後に純粋な生成物 6.2 mgを得た。

【0039】

工程4:パラ-ヘミスクシニト-1-メチル-3-フェニルプロピルアミン- N -トリフルオロアセトアミドのスクシニミジル活性エステルの製造

アセトニトリル 1 mL中にパラ-ヘミスクシニト-1-メチル-3-フェニルプロピルアミン- N -トリフルオロアセトアミド 4.0 mgを攪拌しながら入れた。 N,N' -ジスクシニミジルカーボネート 4.0 mgおよびピリジン 6.0 μ Lをこの溶液に添加した。得られた混合物を室温にて4時間攪拌した。反応混合物をシリカプレートで精製し、パラ-ヘミスクシニト-1-メチル-3-フェニルプロピルアミン- N -トリフルオロアセトアミドのスクシニミジル活性エステル 2.5 mgを得た。

【0040】

工程5:パラ-ヘミスクシニト-1-メチル-3-フェニルプロピルアミン- N -フルオロアセトアミドのスクシニミジル活性エステルと Cy5 EDA のカップリング

パラ-ヘミスクシニト-1-メチル-3-フェニルプロピルアミン- N -トリフルオロアセトアミドのスクシニミジル活性エステル 2 mgを、ホウ酸緩衝液(pH 9) 0.5 mL中および Cy5 EDA 2.5 mgと混合した。この溶液を室温にて4時間攪拌し、得られた溶液を直接 C18 プレートにスポットし、70/30-メタノール/水で展開した。生成物のバンドを切り取り、パラ-ヘミスクシニト-1-メチル-3-フェニルプロピルアミン- N -フルオロアセトアミドのスクシニミジル活性エステルと Cy5 EDA のカップリング生成物をメタノールで抽出した。

【0041】

実施例 V

唾液中のアンフェタミンの流動免疫測定法

(a)試薬の製造

選択された抗-アンフェタミンモノクローナル抗体(例えば、Omega Biologicals, Inc., Bozeman, Mont. から入手可能)を、製造業社の標準プロトコルに従ってエンフェース多孔性ビーズに結合または固定し、GW3-38、本発明の新規トレーサー(Fig. 9)などの製造されたトレーサーおよび GW5-12、従来のトレーサー(Fig. 11)で飽和させた。得られた複合体混合物を一夜 4 ℃にて回転混合させながら放置した。複合体樹脂を 0.1 M PBS(10% MeOH)で安定的な基準線が得られるまで洗滌した。洗滌した樹脂を等容量の 5.0 mM PBS(pH 7.4)中 15.0 mM トレハロース緩衝液に添加した。樹脂を凍結-乾燥した。

【0042】

a)流動測定法の操作

内直径 2 mm および長さ 10 mm のミクロ-ポリスチレンカラムに製造した樹脂 4 mgを充填した。充填したカラムをライフポイント免疫測定法装置の 5 つの流動導管の 1 つに取り付けた。カラムはラブビューソフト(Labview software, National Instruments, Inc.)で支持された自動システムで制御された適当な緩衝液で予-洗した。その後、試験試料 5.0 μ Lを、流速 100 μ L/分、ついで 0.2% BSA/PBS 緩衝液 350 μ Lを導管を通過させた。

10

20

30

40

50

【0043】

b)結果

蛍光シグナルの平均強度を試料中の薬物濃度の測定のために用いた。トレーサー G W 3 - 3 8 および G W 5 - 1 2 を用いるアンフェタミンの流動免疫測定法の比較を Fig. 1 4 および Fig. 1 5 に示した。本発明の好ましいトレーサーは従来のトレーサーのほぼ 10 倍 (10 X) のシグナル強度を示している。

【図面の簡単な説明】

【0044】

【図 1】 Fig. 1 はトレーサーの製造方法を示す。方法 A は、出発物質として禁制薬物の使用を含み、薬物ベースのトレーサーを生成する。方法 B は、非 - 規制物質の使用を含み、薬物ベースのトレーサーを生成する。方法 C は、出発物質として非 - 規制物質を用い、非 - 規制物質ベースのトレーサーを生成する本発明のトレーサー合成方法を開示する。

【図 2】 Fig. 2 はアンフェタミンおよびメタンフェタミンの基本構造を示す。

【図 3】 Fig. 3 は本発明のトレーサー製造に用い得る通常の蛍光標識を示す。

【図 4】 Fig. 4 は本発明のトレーサー製造に用い得る通常の蛍光標識を示す。

【図 5】 Fig. 5 は合成新規トレーサー化合物、N - 標識 1 - メチル - 3 - フェニルアルキルアミンを示す。

【図 6】 Fig. 6 は合成新規トレーサー化合物、標識 1 - メチル - 3 - フェニルアルキルアミンを示す。

【図 7】 Fig. 7 は合成新規トレーサー化合物、標識 N - メチル - 1 - メチル - 3 - フェニルアルキルアミンを示す。

【図 8】 Fig. 8 は合成新規トレーサー化合物、N - 標識 N - メチル - 1 - メチル - 3 - フェニルアルキルアミンを示す。

【図 9】 Fig. 9 は好ましい合成新規トレーサー化合物である、標識されたパラ - ヘミスクシニト - 1 - メチル - 3 - フェニルプロピルアミン - N - トリフルオロアセトアミドのスクシニミジル活性エステルと Cy5 E D A との反応生成物を示す。

【図 10】 Fig. 1 0 は好ましい合成新規トレーサー化合物である、標識されたパラ - ヘミスクシニト - N - メチル - 1 - メチル - 3 - フェニルプロピルアミン - N - トリフルオロアセトアミドのスクシニミジル活性エステルと Cy5 E D A との反応生成物を示す。

【図 11】 Fig. 1 1 は従来の(薬物ベース)トレーサー、G W 5 - 1 2 を示す。

【図 12】 Fig. 1 2 はp', m' および o' - 置換アンフェタミントレーサーの一般的な製造工程を記載したフローチャートを示す。

【図 13】 Fig. 1 3 は本発明の好ましいトレーサーの 1 種の合成工程を記載したフローチャートを示す。

【図 14】 Fig. 1 4 は、Fig. 9 に記載の好ましい非 - 薬物ベースのトレーサーによるアンフェタミンの流動免疫測定の結果を示す。Fig. 1 4 と 1 5 は流動免疫測定法による好ましいトレーサーの G W 3 - 3 8 と従来のトレーサーの G W 5 - 1 2 を用いるアンフェタミンの測定の比較を示す。

【図 15】 Fig. 1 5 は、Fig. 1 1 に記載の従来の薬物ベースのトレーサーを用いるアンフェタミンの流動免疫測定の結果を示す。Fig. 1 4 と 1 5 は流動免疫測定法による好ましいトレーサーの G W 3 - 3 8 と従来のトレーサーの G W 5 - 1 2 を用いるアンフェタミンの測定の比較を示す。

【図1】

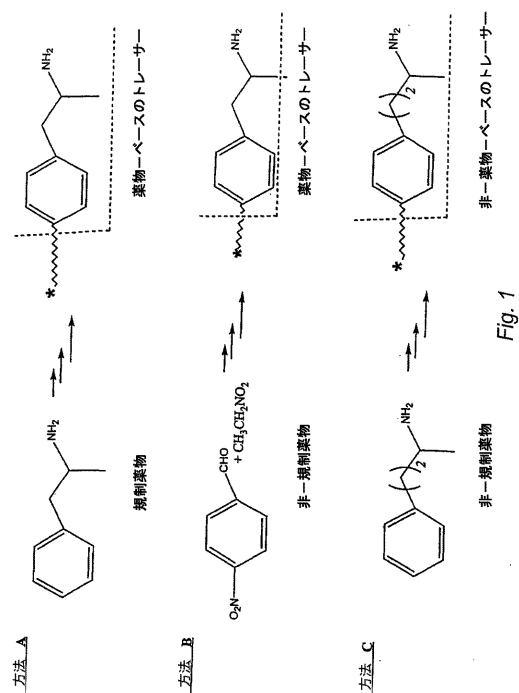


Fig. 1

【図2】

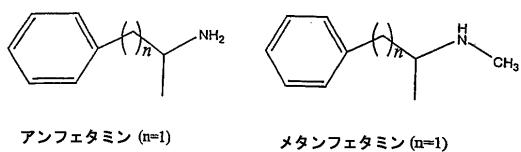


Fig. 2

【図12】

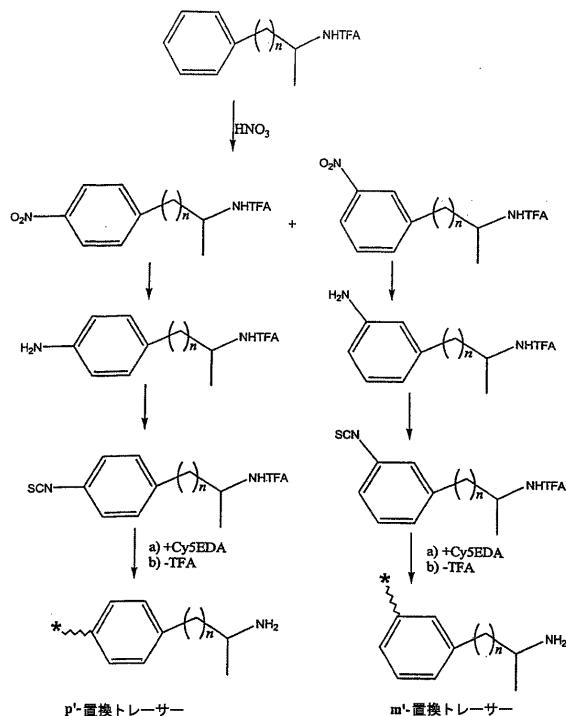


Fig. 12

【図13】

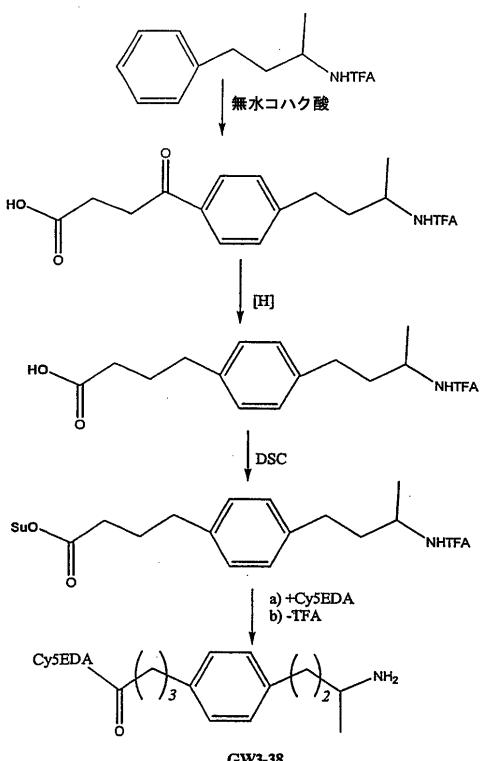
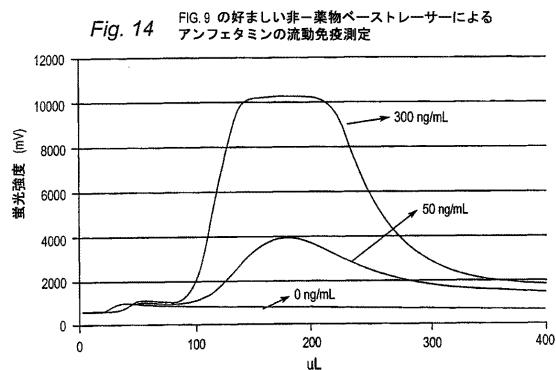
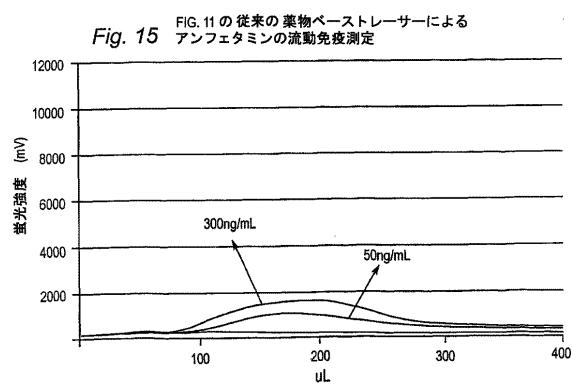


Fig. 13

【図14】



【図15】



【国際公開パンフレット】

(12) INTERNATIONAL APPLICATION PUBLISHED UNDER THE PATENT COOPERATION TREATY (PCT)

(19) World Intellectual Property Organization
International Bureau(43) International Publication Date
25 July 2002 (25.07.2002)

PCT

(10) International Publication Number
WO 02/057739 A2

(51) International Patent Classification*: G01N

(74) Agent: LYON & LYON LLP; Lois M. Kwasigroch, 633
West Fifth Street, Suite 4700, Los Angeles, CA 90071
(US).

(21) International Application Number: PCT/US01/45024

(81) Designated States (national): AE, AG, AL, AM, AT, AU,
AZ, BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU,
CZ, DL, DK, DM, DZ, EC, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH,
GM, IIR, IUV, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC,
LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW,
MX, MZ, NO, NZ, OM, PH, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG,
SI, SK, SL, TJ, TM, TR, TZ, UA, UG, US, UZ, VN,
YU, ZA, ZM, ZW.(22) International Filing Date:
29 November 2001 (29.11.2001)(84) Designated States (regional): ARIPO patent (GH, GM,
KI, LS, MW, MZ, SD, SI, SZ, TZ, UG, ZM, ZW),
Eurasian patent (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM),
European patent (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR,
GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE, TR), OAPI patent
(BH, BJ, CI, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR,
NL, SN, TD, TG).

(25) Filing Language: English

(26) Publication Language: English

(30) Priority Data:
09/730,095 4 December 2000 (04.12.2000) US(84) Designated States (regional): ARIPO patent (GH, GM,
KI, LS, MW, MZ, SD, SI, SZ, TZ, UG, ZM, ZW),
Eurasian patent (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM),
European patent (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR,
GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE, TR), OAPI patent
(BH, BJ, CI, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR,
NL, SN, TD, TG).(71) Applicant (for all designated States except US): LIFE-
POINT, INC. [US/US]; 10400 Trademark Street, Rancho
Cucamonga, CA 91730 (US).(84) Designated States (regional): ARIPO patent (GH, GM,
KI, LS, MW, MZ, SD, SI, SZ, TZ, UG, ZM, ZW),
Eurasian patent (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM),
European patent (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR,
GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE, TR), OAPI patent
(BH, BJ, CI, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR,
NL, SN, TD, TG).

(72) Inventors; and

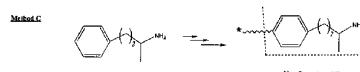
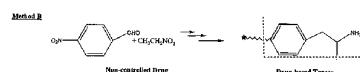
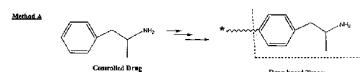
(75) Inventors/Applicants (for US only): WANG, Guohong

[CN/US]; 10400 Trademark Street, Rancho Cucamonga,
CA 91730 (US). FOLEY, Thomas [HU/US]; 10400 Trademar
k Street, Rancho Cucamonga, CA 91730 (US).(84) Designated States (regional): ARIPO patent (GH, GM,
KI, LS, MW, MZ, SD, SI, SZ, TZ, UG, ZM, ZW),
Eurasian patent (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM),
European patent (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR,
GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE, TR), OAPI patent
(BH, BJ, CI, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR,
NL, SN, TD, TG).(Published:
— without international search report and to be republished
upon receipt of that report

[Continued on next page]

(54) Title: COMPOSITION AND METHODS FOR SYNTHESIS OF NOVEL TRACERS FOR DETECTING AMPHETAMINE
AND METHAMPHETAMINE IN SAMPLS

WO 02/057739 A2



Synthetic Routes to Immunoassay Tracers (* a later)

(57) **Abstract:** This invention relates to novel tracers and their synthesis and use in an immunoassay for the detection of controlled drugs such as amphetamine (APM), methamphetamine (MAMP) and their derivatives, in a biological or aqueous sample. In particular, this invention provides methods for synthesizing novel tracers in which a non-controlled substance is both the starting material in tracer synthesis and the binding site on the resulting novel tracer for the antibody, thereby eliminating the necessity of using controlled substances as starting materials. In addition, the novel tracers of the present invention can be used as an analyte analog in an immunoassay, such as a continuous flow displacement immunoassay. It was unexpectedly discovered that the novel tracers of the present invention substantially improve the performance of the continuous flow displacement immunoassay as compared with conventionally designed tracers.

WO 02/057739 A2

For two-letter codes and other abbreviations, refer to the "Guidance Notes on Codes and Abbreviations" appearing at the beginning of each regular issue of the PCT Gazette.

DESCRIPTION

Composition And Methods For Synthesis Of Novel Tracers For Detecting Amphetamine And Methamphetamine In SamplesField Of Invention

5 This invention relates to novel tracers and their synthesis and use in an immunoassay for the detection of controlled drugs such as amphetamine (APM), methamphetamine (MAPM) and their derivatives, in a biological or aqueous sample. In particular, this invention provides methods for synthesizing novel tracers in which a non-controlled substance is both the starting material in tracer synthesis and the binding site on the resulting novel tracer for the antibody, thereby eliminating the necessity of using controlled substances as starting materials. In addition, the novel tracers of the present invention can be used as an analyte analog in an immunoassay, such as a continuous flow displacement immunoassay. A continuous flow displacement immunoassay works on a principle whereby immobilized antibody is first saturated with a labeled analyte analog, 10 the labeled analyte analog is displaced by the analyte in the testing sample, and the displaced labeled analyte analog is then measured. It was unexpectedly discovered that the novel tracers of the present invention substantially improve the performance of the continuous flow displacement immunoassay as compared with conventionally designed tracers.

20 Background Of The Invention

Amphetamine and methamphetamine are derivatives of a compound known as a phenylethylamine. Both amphetamine and methamphetamine are stimulants of the central nervous system and of the sympathetic division of the peripheral nervous system. Like other stimulants, the short-term effects of amphetamine or methamphetamine intake 25 include increased heart rate, increased blood pressure, reduced appetite, dilation of the pupils, feelings of happiness and power, and reduced fatigue. It is because of their stimulant effects that these compounds are abused and sold illicitly.

Due to common abuse of amphetamines and methphetamines, there is a growing need for non-invasive, rapid tests to detect the presence of these drugs in 30 biological specimens. In the past, amphetamines in biological samples were detected by a number of techniques such as thin layer chromatography (TLC), high pressure liquid chromatography (HPLC), and gas chromatography/mass spectrometry (GC/MS). These assays are generally time consuming and have poor assay sensitivity. See Vapatalo, H. K.

S, and Senius, K. E., Comparison of Saliva and Urine Samples in Thin-Layer Chromatographic Detection of Central Nervous System Stimulants, *Intl. J. Clin. Pharmacol. Res.*, 4: 5-8 (1984), Cook, C. E., et al., Pharmacokinetics of Methamphetamine Self-administered to Human Subjects by Smoking s-(+)-Methamphetamine hydrochloride, *Drug Metab. Dispos.*, 21: 717-723 (1993), Suzuki, S., et al., Analysis of Methamphetamine in Hair, Nail, Sweat, and Saliva by Mass Fragmentography, *J. Anal. Toxicol.*, 13: 176-178 (1989), which are incorporated herein by reference as if fully set forth. In addition, they are difficult in that highly trained personnel are required to perform TLC, HPLC and GC/MS assays. Immunoassays have provided preferable alternative methods to using TLC, HPLC and GC/MS assays for the detection and quantitation of amphetamines and methamphetamines. In particular, immunoassays have improved sensitivity, efficiency and are less labor intensive. A number of immunoassay techniques for detecting amphetamines and methamphetamines in urine have been developed. See Brynes, et. al. EPO # 279,213 B1, Hu et. al., EPO # 371,422A2, and Heifman et. al., EPO # 371,253 A2 which are incorporated herein by reference as if fully set forth. Further, the continuous flow displacement immunoassay has been demonstrated as a useful and rapid method for detecting drugs of abuse in saliva and urine. See Hao Yu et al., Use of the USDT Flow Immunosensor for Quantitation of Benzolecgonine in Urine, *Biosensors and Bioelectronics*, 725-734 (1996); Nam, D. et al. Programme and Abstracts of TIAFT 2000 at Helsinki, 2000; Liang, G., et al., Proc. of ICADTS 2000, June 22-26, 2000, which are incorporated herein by reference as if fully set forth.

A tracer as used herein is a labeled antigen or hapten used in an immunoassay to compete with the particular substance of interest (the analyte) for antigen binding sites of an antibody. The tracer can be a labeled antigen or hapten identical to the analyte to be detected, or it can be modified in such a way that it is structurally related to the analyte and has the desired cross-reactivity toward the selected antibody. In a continuous flow displacement immunoassay for example, a modification to the labeled antigen or hapten that decreases binding affinity may actually enhance the displacement reaction, and consequently the sensitivity of the system. For detection of illicit drugs, most immunoassays generally used the illicit drugs themselves, i.e. labeled amphetamines and methamphetamines, as tracers to detect the presence and or quantity of these substances in the sample. Because these drugs are illegal, a series of procedural guidelines and paperwork accompanies their utilization in the laboratory. Recent use of non-controlled substances as starting materials in amphetamine and methamphetamine tracer synthesis has been reported (Heiman, D., et al. EP 0 371 233 A2), but the final tracer synthesized

still contains the amphetamine molecule itself as the binding site for the anti-amphetamine antibodies.

As shown in **Figure 1**, there are different ways of synthesizing tracers. One of the common methods of tracer synthesis involves using the illicit drugs, such as amphetamines and methamphetamine, as the starting materials. (Salamamone, S. et al, EP 0 386 644 A2) These starting materials are carried through multiple synthesis steps to yield a drug-based tracer. (See **Figure 1**, Method A.) Another alternative method of synthesizing tracers involves the use of non-controlled substances as starting materials to yield a drug-based tracer. (Heiman, D.F. et al., EP 0 371 233 A2) (See **Figure 1**, Method B.) In both these methods, the synthesis routes involve the illicit drugs as starting materials, intermediates or final prepared tracer.

The present invention provides methods for the synthesis of a novel set of tracers produced from non-controlled substances yielding a labeled non-controlled substance as the tracer (See **Figure 1**, Method C). The synthesis of these non-drug based tracers does not involve the production of illicit drugs at any point in the synthesis process. We have found that these novel tracers are ideal for use in immunoassays detecting the presence and/or quantity of amphetamines and methamphetamine in biological or aqueous samples. We have found that it is not necessary to have the specific labeled analyte itself (i.e., amphetamine) as the tracer as long as the antibody in the immunoassay system binds to the tracer with a decreased affinity from that of the analyte in the biological samples. The novel tracers of the present invention are particularly useful in the continuous flow displacement immunoassay.

Summary Of The Invention

This invention relates to novel compositions suitable for use in immunoassays for detecting amphetamine (APM), methamphetamine (MAPM) and their derivatives in biological or aqueous samples. The tracer synthesis methods developed in this invention eliminate the use of the illicit drugs, i.e. amphetamine and methamphetamine, as the starting materials for or products of tracer synthesis. These non-drug based tracers are particularly useful for the continuous flow displacement immunoassay. The present invention describes the processes for synthesizing the novel tracers, and the application of these tracers in fluorescence immunoassays for the detection and quantitation of phenylethylamine derivatives in biological samples.

Figure 2 depicts the basic structures of amphetamine and methamphetamine. Amphetamine and methamphetamine are examples of the analytes that can be detected in the immunoassays of the present invention. Amphetamine has an n value of 1. The tracers of this invention have the n value of greater than 1. The preferred tracers have an n value that is 2 or more. Figures 3 and 4 show common fluorescent labels that can be used in the tracer synthesis of this invention.

In one embodiment of the present invention, the synthetic novel tracer is the compound, labeled 1-methyl-3-phenylalkylamine, which is depicted in Figure 5.

10 In another embodiment of the present invention, the synthetic novel tracer is the compound N-labeled 1-methyl-3-phenylalkylamine, which is depicted in Figure 6.

15 In another embodiment of the present invention, the synthetic novel tracer is a compound labeled N-methyl-1-methyl-3-phenylalkylamine, which is depicted in Figure 7.

In another embodiment of the present invention, the synthetic novel tracer is a compound N-labeled N-methyl-1-methyl-3-phenylalkylamine, which is depicted in Figure 15 8.

In a preferred embodiment of the present invention, the synthetic novel tracer is the reaction product of succinidyl active ester of para-hemisuccinato-1-methyl-3-phenylpropylamine-N-trifluoroacetamid with Cy5EDA shown in Figures 9 and 10. The preferred tracer is synthesized by the method described in Example II.

20 Brief Description Of The Drawings

Figure 1 shows methods of tracer preparation. Method A involves the use of illicit drugs as starting materials to yield a drug-based tracer. Method B involves the use of non-controlled substances to yield a drug-based tracer. Method C discloses the method of the 25 present invention of tracer synthesis using non-controlled substances as starting materials and yielding a non-drug-based tracer.

Figure 2 shows the basic structures of amphetamine and methamphetamine.

Figures 3 and 4 show common fluorescent labels that can be used in the tracer preparation of this invention.

Figure 5 depicts the synthetic novel tracer compound N-labeled 1-methyl-3-phenylalkylamine.

Figure 6 depicts the synthetic novel tracer compound labeled 1-methyl-3-phenylalkylamine.

Figure 7 depicts the synthetic novel tracer compound labeled N-methyl-1-methyl-3-phenylalkylamine.

5 **Figure 8** depicts the synthetic novel tracer compound N-labeled N-methyl-1-methyl-3-phenylalkylamine.

Figure 9 depicts the preferred synthetic novel tracer compounds which are the reaction product of succinimidyl active ester of para-henisuccinito-1-methyl-3-phenylpropylamine-N-trifluoroacetamid labeled with Cy5EDA.

10 **Figure 10** depicts the preferred synthetic novel tracer compounds which are the reaction product of succinimidyl active ester of para-henisuccinito-N-methyl-1-methyl-3-phenylpropylamine-N-trifluoroacetamid labeled with Cy5EDA.

Figure 11 depicts a conventional (drug based) tracer GW5-12.

15 **Figure 12** is a flow-chart setting forth the general procedures for preparation of p', m' and o'-substituted amphetamine tracers.

Figure 13 is a flow-chart setting forth the procedure for synthesis of one of the preferred tracers of the present invention.

Figures 14 and 15 show the comparison of the flow immunoassay of amphetamine with the preferred tracer GW3-38 and the conventional tracer GW5-12.

20 **Detailed Description Of The Preferred Embodiments**

This invention provides compositions and methods for synthesizing compounds for use in fluorescence immunoassays for detecting the presence and or quantity of amphetamine, methamphetamine and their derivatives in biological samples. The compositions or tracers for the detection of amphetamine and methamphetamines in biological samples are especially suitable for continuous flow displacement immunoassays.

25 In continuous flow displacement immunoassays, the kinetic properties of the analyte and the antibody play a very important role. An analyte is the substance being tested in an immunoassay. For instance, in the present invention, the analyte can be

amphetamine or methamphetamine. An antibody recognizes and is capable of specifically binding to the analyte. A tracer is a labeled compound that competes with the analyte for binding to the antibody. The present invention uses a tracer that has three parts, namely, a site that binds to an antibody, a linking group, and a label. The site on the analyte that binds to the antibody is usually similar to the site on the tracer that binds to the antibody. In other words, if the analyte is amphetamine, the antibody to amphetamine recognizes the same binding site on the tracer that it recognizes on the analyte.

A typical continuous flow displacement immunoassay involves a solid-phase immobilized antibody to amphetamine or methamphetamine. The antigen binding site of the antibody is exposed to a synthetic labeled tracer to form a labeled synthetic tracer-antibody complex. The antibody is exposed to tracers such that the antigen binding sites of the antibody are saturated with the labeled synthetic tracers. Next, a biological sample suspected of containing the analyte, amphetamine or methamphetamine, is continuously flowed past the solid-phase immobilized antibody-labeled synthetic tracer complex. If analyte is present in the sample, the analyte binds to the antibody and displaces the labeled synthetic tracer. Detection of the labeled tracer downstream from the binding point hence shows the presence and or quantity of the analyte present in the biological sample. See Ligler, et al., U. S. Patent No. 5,183,740, which is incorporated herein by reference as if fully set forth..

The success of developing a continuous flow displacement immunoassay based product, is based on the selection of antibody and tracer to achieve a fast dissociation rate of the bound tracer from the antibody, thereby permitting a rapid binding of the analyte. In general, the ideal continuous flow displacement immunoassay utilizes a system where the antibody has a high affinity for the analyte, and a lower affinity for the tracer. This arrangement where the antibody has a high affinity for the analyte and a lower affinity for the tracer promotes faster displacement. In the present invention, the tracers embody the following characteristic: the affinity of the tracer for the antibody is anywhere between 20-100%. A preferred tracer has about 40-80% cross-reactivity for the antibody. For the purposes of this invention, it is immaterial that the tracer be structurally related to the analyte, amphetamine or methamphetamine. So long as the ligand-binding site of the tracer has 20-100% cross-reactivity with the antibody, it is suitable for use in an immunoassay, especially, the continuous flow displacement immunoassay. Most antibodies to amphetamine and methamphetamine recognize the phenylethylamine derivatives. The present tracers are useful, so long as the antibodies are capable of recognizing the phenylethylamine analogs. Structural similarity to the analyte is not at

issue. This characteristic, the structural dissimilarity between the tracer and the analyte, distinguishes the present tracers from those of prior art.

Labeling of the tracer may be carried out by means of conventional methods well known in the art. The label itself may suitably be a fluorophore, a chromophore, a radiolabel, a metal colloid, an enzyme, or a chemiluminescent or bioluminescent molecule. Suitable fluorophores and chromophores are disclosed in R.P. Haugland, Molecular Probes, *Handbook of Fluorescent Probes and Research Chemicals*, 5th Ed., Molecular Probes, Inc., Eugene, Oreg., 1992, which is incorporated herein by reference. Examples of preferred fluorophores include fluorescein, rodamine, and sulfoindocyanine dye Cy5 (Mujumdar, R.B., et al., *Bioconjugate Chemistry*, vol. 4, p. 105 (1992).

An extensive range of antibodies applicable for use in this invention are commercially available (for example, from Omega Biologicals, Inc., 910 Technology Blvd., Bozeman, MT) or can be made from descriptions of methods of preparation available in the literature. Any antibodies, such as monoclonal or polyclonal antibodies, which are commercially available or described in the literature can be employed or adapted to the method of this invention for identification of a wide range of targets.

The method can be used to detect specific components of biological or aqueous samples, including but not limited to water, blood, plasma, serum, blood or urine. Saliva has been demonstrated as a useful test matrix for the detection and measurement of drugs of abuse. ("Saliva as a Diagnostic Fluid", Ed by D. Malamud and L. Tabak, *Annals of the New York Academy of Sciences*, 1993, V. 694.) For example, methamphetamine in saliva samples can be detected by GC/MASS up to 2 days after the last dose. (S. Suzuki, T. Inoue and S. Inayama, *Analysis of methamphetamine in hair, nail, sweat, and saliva by mass fragmentography*, *J. Anal. Toxicol.* 1989, 13, 176-178.)

The following examples are giving to illustrate the specific applications of the present invention including specific techniques which can be used to perform the invention. These specific examples are not intended to limit the scope of the invention described in the application.

Example 1 - General Procedure for Preparation of Labeled Tracer

A flow-chart for the synthesis of a p', o' and m' - substituted tracers is set forth in **Figure 12**. A detailed description of the steps for preparation follows.

A. Preparation and Isolation of para, meta, and ortho-nitroamphetamine-N-trifluoroacetamide:

0.7mL of trifluoroacetic anhydride was added slowly to a solution of a mixture of 0.4 g of para-, meta-, and ortho-nitroamphetamine in 1mL of acetonitrile at 0°C. The 5 resulting mixture was stirred at 0°C for one hour, and was kept in the refrigerator at 4°C overnight. The volatile material was removed and the crude product was purified with a silica gel column and eluted with 1:2 Ethyl acetate/hexane. In this manner, 0.15g of a pure para-nitroamphetamine-N-trifluoroacetamide, 0.03g of a pure meta-nitroamphetamine-N-trifluoroacetamide, and 0.04g of a pure ortho-nitroamphetamine-N-trifluoroacetamide was 10 obtained.

B. Preparation of para-aminoamphetamine-N-trifluoroacetamide:

0.15g of prepared para-nitroamphetamine-N-trifluoroacetamide was dissolved in 8ml of Ethanol. 0.4mg of 10% Pd/C was added to the solution. The mixture was 15 hydrogenated under H₂ at room temperature overnight. The catalyst and solvent were removed, leaving a dark green residue. The resulting mixture was purified by preparative silica thin layer chromatography, using a 1/1 mix of Ethyl acetate/Hexane as a developing solvent. 0.75mg of the corresponding amine product was thus obtained.

C. Preparation of para-isothiocyanatoamphetamine-N-trifluoroacetamide:

A mixture of 25mg of para-aminoamphetamine-N-trifluoroacetamide in 0.5ml of 20 dichloromethane was stirred, and 15μl of NaHCO₃ and thiophosgene were added to the mixture. The resulting mix was stirred at room temperature for 30 minutes. The reaction mixture was next purified with a silica plate, giving 21 mg of para-isothiocyanatoamphetamine-N-trifluoroacetamide.

D. Coupling of para-isothiocyanatoamphetamine-N-fluoropacetamide with 25 Cy5EDA:

A mixture of 2mg of para-isothiocyanatoamphetamine-N-trifluoroacetamide and Cy5EDA in 0.5 ml of borate buffer (pH 8) was stirred at room temperature for four hours. The resulting solution was directly spotted onto a C18 plate, and developed with 70/30 (v/v) Methanol/Water. The product band was cut out and extracted with methanol.

Example II--Preparation of a preferred amphetamine immunoassay tracer:

A flow-chart for the synthesis of a preferred tracer is set forth in Figure 13. A detailed description of the steps for preparation of the tracer follows.

Step 1: Preparation of 1-methyl-3-phenylpropylamine-N-trifluoroacetamide:

- 5 A solution of 3g of 1-methyl-3-phenylpropylamine in 5 ml of acetonitrile was stirred at room temperature. 4mL of trifluoroacetic anhydride and 1.3mL of pyridine were added to the solution at room temperature. The resulting reaction mixture was stirred at room temperature overnight, and the mixture was then placed in ice water. The crude product was extracted with ethyl acetate, and the combined organic layers were dried over Na₂SO₄.
- 10 Removal of the organic solvent yielded 1-methyl-3-phenylpropylamine-N-trifluoroacetamide.

Step 2: Preparation of para-hemisuccinito-1-methyl-3-phenylpropylamine-N-trifluoroacetamide

- 15 AlCl₃ was added to a mixture of 0.24g succinic anhydride and 0.4g 1-methyl-3-phenylpropylamine-N-trifluoroacetamide in 5mL of dichloromethane at room temperature. The resulting mixture was stirred at 0°C for one hour and then left at room temperature overnight. 5ml of 3M aqueous HCl solution was added to the mixture and the organic layers were extracted with ethyl acetate. The combined organic layers were dried over Na₂SO₄, and yielded a crude product of 0.5g. Further purification of the crude product was completed with a silica gel column, eluting with 1:2 ethyl/hexanes. 0.3g of pure para-hemisuccinito-1-methyl-3-phenylpropylamine-N-trifluoroacetamide was obtained.

Step 3: Reduction of para-hemisuccinito-1-methyl-3-phenylpropylamine-N-trifluoroacetamide

- 25 0.2g of the prepared para-hemisuccinito-1-methyl-3-phenylpropylamine-N-trifluoroacetamide was dissolved in 3ml of acetic acid. 0.3mg of 10% Pd/C was added to the solution. The mixture was hydrogenated under H₂ at room temperature overnight, and the catalyst and solvent were removed, leaving an oily residue. The resulting mixture was purified by preparative silica TLC, using ethyl acetate/hexane as a developing solvent in a ratio of 1:1. 83mg of pure reduced para-hemisuccinito-1-methyl-3-phenylpropylamine-N-trifluoroacetamide was thus obtained.

Step 4: Preparation of succinimidyl active ester of para-hemisuccinito-1-methyl-3-phenylpropylamine-N-trifluoroacetamide

5 40mg of N,N'-disuccinimidyl carbonate and 60 μ l of pyridine was added to a stirred mixture of 40mg para-hemisuccinito-1-methyl-3-phenylpropylamine-N-trifluoroacetamide in 1mL of acetonitrile. The resulting mixture was stirred at room temperature for 4 hours. Purification of the reaction mixture with a silica plate gave 25 mg of succinimidyl active ester of para-hemisuccinito-1-methyl-3-phenylpropylamine-N-trifluoroacetamide.

10 **Step 5: Coupling of succinimidyl active ester of para-hemisuccinito-1-methyl-3-phenylpropylamine-N-trifluoroacetamide with Cy5EDA**

15 A mixture of 2mg of succinimidyl active ester of para-hemisuccinito-1-methyl-3-phenylpropylamine-N-trifluoroacetamide and 2.5mg of Cy5EDA in 0.5ml of borate buffer (pH 9) was stirred at room temperature for 4 hours. The resulting solution was purified with a C18 plate, and developed with methanol and water in a ratio of 70/30 (v/v). The product band was cut and extracted with methanol. The coupled product is the preferred amphetamine immunoassay tracer.

Example III: Flow Immunoassay Procedure

20 LifePoint, Inc. developed the Flow Immunoassay Instrument which contains the necessary pumps, valves, tubing, exchangeable columns and fluorescence detector for performing a continuous flow displacement immunoassay. Amphetamine standards were prepared by adding amphetamine (Sigma Chemicals, St. Louis, MO) at different concentrations into the negative saliva. Chemicals and buffers were obtained from Sigma and Aldrich, Company.

(a) Preparation of Reagents

25 To determine the presence of amphetamine in saliva, a specific anti-amphetamine monoclonal antibody (available for example, from Omega Biologicals, Inc., Bozeman, MT) was coupled to or immobilized on Emphase porous beads according to the manufacturer's standard protocol. The antibody-coupled beads were then saturated with prepared Cy5-labeled amphetamine tracers. The resulting tracer-antibody-resin complex mixture was left overnight at 4°C while roller mixing. The complex resin was washed with 0.1M PBS (10% MeOH) until a stable baseline was obtained. The washed resin was

added to an equal volume of 150mM trehalose buffer in 50mM PBS (pH 7.4). The resin was freeze-dried.

(b) Flow Assay

5 A micro-polystyrene column with an inner diameter of 2mm and a length of 10mm was filled with 4mg of the prepared resin. The filled column was installed into one of the five flow channels of the LifePoint Immunoassay Instrument. The column had been pre-washed with an appropriate buffer controlled by an automatic system supported by Labview software (National Instruments, Inc.). 50 μ l of the saliva sample was passed through the channel at a flow rate of 100 to 300 μ l/minute. The average intensity of the fluorescence signal was used to determine the concentration of amphetamine in the sample.

Example IV: Preparation of a preferred methamphetamine immunoassay tracer

Step 1: Preparation of N-methyl-1-methyl-3-phenylpropylamine-N-trifluoroacetamide:

15 A solution of 0.4 g of N-methyl-1-methyl-3-phenylpropylamine in 1 ml of acetonitrile was stirred. 1 ml of trifluoroacetic anhydride and 0.6 ml of pyridine was added to the solution at room temperature, and the resulting mixture was stirred overnight at room temperature. Next, the mixture was placed in ice water. The crude product was extracted with ethyl acetate, and the organic layers were combined and dried over Na_2SO_4 .
20 The desired product was obtained by removal of the organic solvent. TLC analysis ensured that the product was pure enough for the next synthesis step.

Step 2: Preparation of p'-hemisuccinito-N-methyl-1-methyl-3-phenylpropylamine-N-trifluoroacetamide

25 0.2g of AlCl_3 was added to a mixture of 0.1g succinic anhydride and 0.2g N-methyl-1-methyl-3-phenylpropylamine-N-trifluoroacetamide in 5ml of dichloromethane at room temperature. The resulting mixture was stirred at 2°-8°C for 1 hour and then left at room temperature overnight. 2ml of 3M aqueous HCl solution was added to the mixture, and the product was extracted with ethyl acetate. The organic layers were combined and dried over Na_2SO_4 . The organic solvent was removed to obtain 0.2g of a crude product.
30 Further purification of the crude product was completed with a silica gel column. Eluting with (1:2) ethyl: hexanes yielded 0.12g of pure product.

Step 3: Reduction reaction of para-hemisuccinito-N-methyl-1-methyl-3-phenylpropylamine-N-trifluoroacetamide

0.2 g of the prepared of para-hemisuccinito-1-methyl-3-phenylpropylamine-N-trifluoroacetamide was dissolved in 3ml of acetic acid. 0.3g of 10% Pd/C was added to the solution. The mixture was hydrogenated under H₂ overnight at room temperature. Removal of the catalyst and solvent yielded an oily residue. The resulting mixture was purified by silica TLC using (1/1) ethyl acetate/hexane as developing solvents. 62mg of the pure product was obtained at the end of this step.

10 Step 4: Preparation of succinimidyl active ester of para-hemisuccinito-1-methyl-3-phenylpropylamine-N-trifluoroacetamide:

40mg of para-hemisuccinito-1-methyl-3-phenylpropylamine-N-trifluoroacetamide was stirred into 1ml of acetonitrile. 40mg of N,N'-disuccinimidyl carbonate and 60µl of pyridine was added to the solution. The resulting mixture was stirred at room temperature for 4 hours. Purification of the reaction mixture with a silica plate gave 25mg of succinimidyl active ester of para-hemisuccinito-1-methyl-3-phenylpropylamine-N-trifluoroacetamide.

15 Step 5: Coupling of succinimidyl active ester of para-hemisuccinito-1-methyl-3-phenylpropylamine-N-fluoroacetamide with Cy5EDA:

20 2mg of succinimidyl active ester of para-hemisuccinito-1-methyl-3-phenylpropylamine-N-fluoroacetamide was mixed with 2.5mg of CyEDA in 0.5ml of borate buffer pH 9. The solution was stirred at room temperature for 4 hours, and the resulting solution was directly spotted onto a C18 plate and developed with 70/30-methanol/ water. The product band was cut out and the coupled succinimidyl active ester of para-hemisuccinito-1-methyl-3-phenylpropylamine-N-fluoroacetamide with Cy5EDA 25 was extracted with methanol.

Example V: Flow Immunoassay of Amphetamine in Saliva

a) Preparation of Reagents

The selected anti-amphetamine antibody (available for example, from Omega

30 Biologicals, Inc., Bozeman, MT) was coupled to Emphase resin according to the manufacturer's standard procedure and then, saturated with prepared tracers such as GW3-

38, a novel tracer of the present invention (Figure 9) and GW5-12, a conventional tracer (Figure 11). The resulting complex mixture was allowed to proceed at 4°C overnight while roller mixing. The complex resin was washed with 0.1M PBS (10% MeOH) until a stable baseline was obtained. The washed resin was added to the same volume of 150 mM 5 trehalose buffer in 50 mM PBS (pH 7.4), and freeze dried.

a) Flow Immunoassay Procedure

4 mg of the prepared resin was filled into a micro-polystyrene column with an 10 inner diameter of 2 mm and a length of 10 mm. The filled column was installed into one of the five flow channels of the LifePoint Immunoassay Instrument. This immunoassay involves pre-washing the column with the appropriate buffer controlled by an automatic system supported by Labview software (National Instruments, Inc.). After that, 50 µl of the test sample was passed through the channel at a flow rate of 100 µl/ minute and followed by 350 µl of 0.2 % BSA/PBS buffer.

b) Results

15 The average intensity of the fluorescence signal was used to determine the drug concentration in the sample. The comparison of the flow immunoassay of amphetamine with tracers GW3-38 and GW5-12 is shown in Figures 14 and 15. The preferred tracer of the present invention shows almost ten times (10X) the signal intensity as that of the conventional tracer.

Claims:

1. A synthetic tracer for use in an immunoassay for detecting the presence and or quantity of amphetamine and its derivatives in a sample comprising the general formula depicted in Figure 5 wherein:

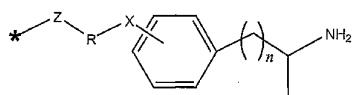


Fig. 5

- 5 (a) n is a number selected from the group consisting of 2, 3 and 4;
- (b) R is a linkage selected from the group consisting of -(CH₂)_n- and C(O)-(CH₂)_nCO;
- (c) X is a compound selected from the group consisting of O, NH, CO, HNCSNH, CH₂, S, and SO₂;
- 10 (d) Z is a compound selected from the group consisting of amines and carboxyls;
- (e) * a label

2. A synthetic tracer for use in an immunoassay for detecting the presence and or quantity of amphetamine and its derivatives in a sample comprising the general formula depicted in Figure 6 wherein:

15

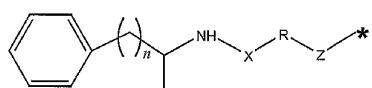


Fig. 6

- (a) n is a number selected from the group consisting of 2, 3 and 4;
- (b) R is a compound selected from the group consisting of -(CH₂)_n- and C(O)-(CH₂)_nCO;
- (c) X is a compound selected from the group consisting of O, NH, CO, HNCSNH, CH₂, S, and SO₂;
- (d) Z is a compound selected from the group consisting of amines and carboxyls;
- (e) * a label

(3) A synthetic tracer for use in an immunoassay for detecting the presence and 10 or quantity of methamphetamine and its derivatives in a sample comprising the general formula depicted in Figure 7 wherein:

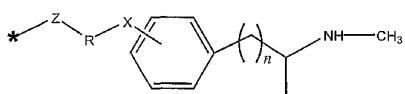


Fig. 7

- (a) n is a number selected from the group consisting of 2, 3 and 4;
- (b) R is a compound selected from the group consisting of -(CH₂)_n- and C(O)-(CH₂)_nCO;

(c) X is a compound selected from the group consisting of O, NH, CO, HNCSNH, CH₂, S, and SO₂;

(d) Z is a compound selected from the group consisting of amines and carboxyls;

5 (e) * a label

4. A synthetic tracer for use in an immunoassay for detecting the presence and or quantity of methamphetamine and its derivatives in a sample comprising the general formula depicted in Figure 8 wherein:

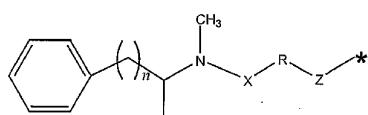


Fig. 8

(a) n is a number selected from the group consisting of 2, 3 and 4;

10 (b) R is a compound selected from the group consisting of -(CH₂)_n- and C(O)-(CH₂)_nCO;

(c) X is a compound selected from the group consisting of O, NH, CO, HNCSNH, CH₂, S, and SO₂;

15 (d) Z is a compound selected from the group consisting of amines and carboxyls;

(e) * a label

5. A synthetic tracer of claims 1-4, wherein the label is selected from the group consisting of a fluorophore, a chromophore, a radiolabel, a metal colloid, an enzyme, or a chemiluminescent or bioluminescent molecule.

6. A synthetic tracer of claims 1-4, wherein the label is a fluorescent dye as
5 shown in Figure 3 and 4 and wherein:

(a) m is a number selected from the group consisting of 0, 1, 2, 3 and 4;
and

(b) X is a compound selected from the group consisting of OSu and
EDA.

10 7. A method for determining the presence and or quantity of amphetamine and
its derivatives in a sample comprising the steps of:

(a) providing a solid phase-immobilized antibody to amphetamine,

15 (b) exposing an antigen binding site of the antibody to the synthetic
tracer of claims 1-4 to form a solid phase-immobilized, labeled synthetic tracer-antibody
complex, wherein the antigen binding sites of the antibody are saturated with the labeled
synthetic tracers,

(c) continuously flowing a sample suspected of containing
amphetamine past the solid phase-immobilized, labeled antigen-antibody complex under
nonequilibrium conditions, and

20 (d) detecting the displaced labeled synthetic tracer of claims 1-4, the
amount of said displaced labeled synthetic tracer being directly proportional to the
concentration of said amphetamine in the sample.

8. A method in accordance with claim 7 wherein the sample is a biological
sample such as saliva, whole blood, serum, plasma or urine.

9. A method in accordance with claim 7 wherein the sample is an aqueous sample.

10. A method in accordance with claim 7 wherein the specific antibody is a monoclonal antibody or polyclonal antibody specific for amphetamines and their derivatives.

11. A synthetic tracer for use in an immunoassay for detecting the presence and or quantity of amphetamine and its derivatives in a sample comprising the compound depicted in Figure 9.

12. A synthetic tracer for use in an immunoassay for detecting the presence and or quantity of amphetamine and its derivatives in a sample comprising the compound depicted in Figure 10.

13. A synthetic tracer for use in an immunoassay for detecting the presence and or quantity of amphetamine and its derivatives in a sample wherein the tracer contains any phenylalkylamine as depicted in Figure 2, wherein $n > 1$.

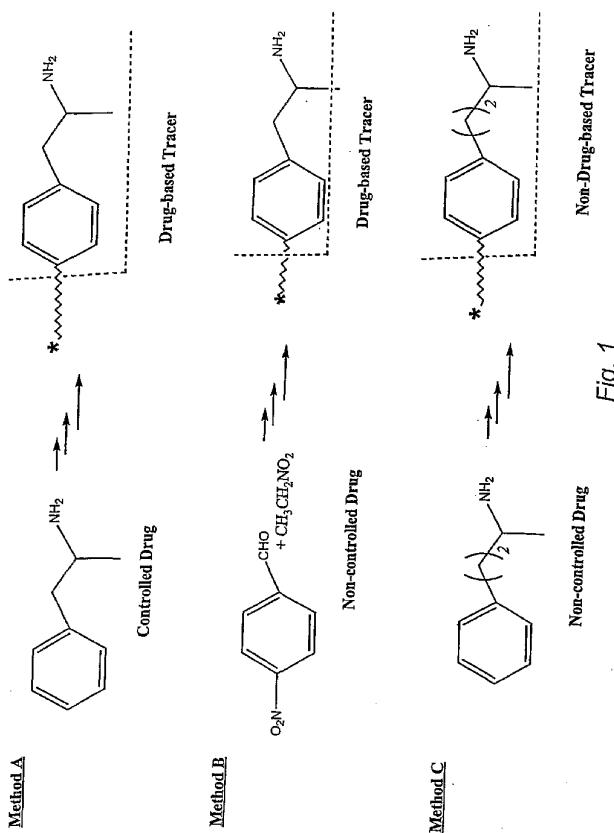


Fig. 1

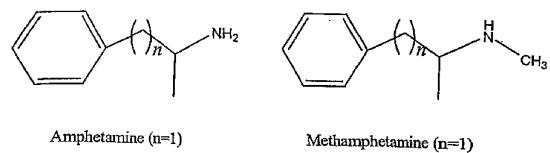


Fig. 2

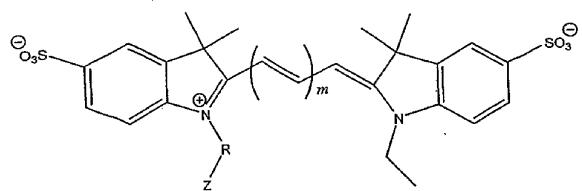


Fig. 3

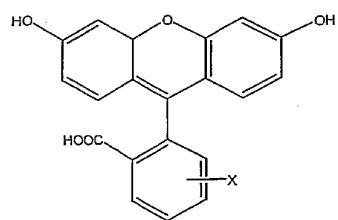


Fig. 4.

SUBSTITUTE SHEET (RULE 26)

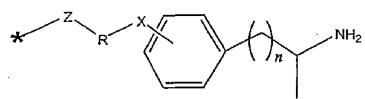


Fig. 5

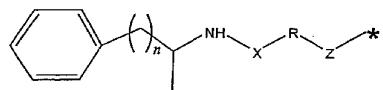


Fig. 6

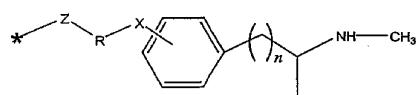


Fig. 7

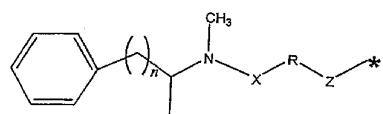


Fig. 8

SUBSTITUTE SHEET (RULE 26)

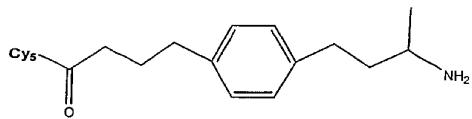


Fig. 9

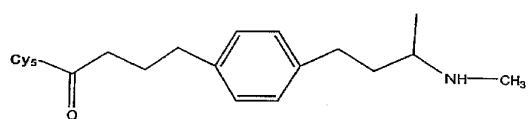


Fig. 10

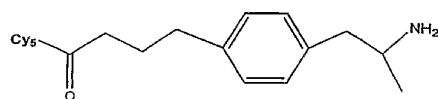


Fig. 11

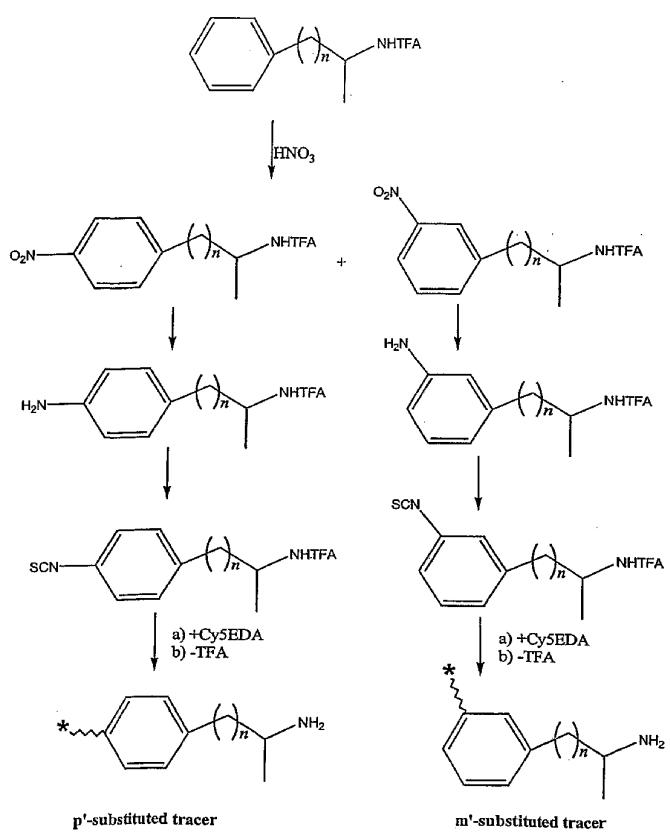


Fig. 12

SUBSTITUTE SHEET (RULE 26)

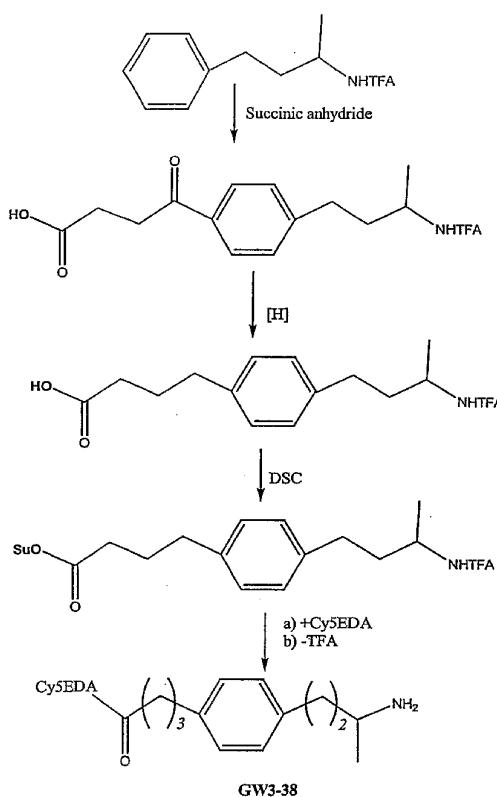


Fig. 13

SUBSTITUTE SHEET (RULE 26)

Fig. 14 FLOW IMMUNOASSAY OF AMPHETAMINE WITH PREFERRED NON-DRUG-BASED TRACER IN FIG. 9

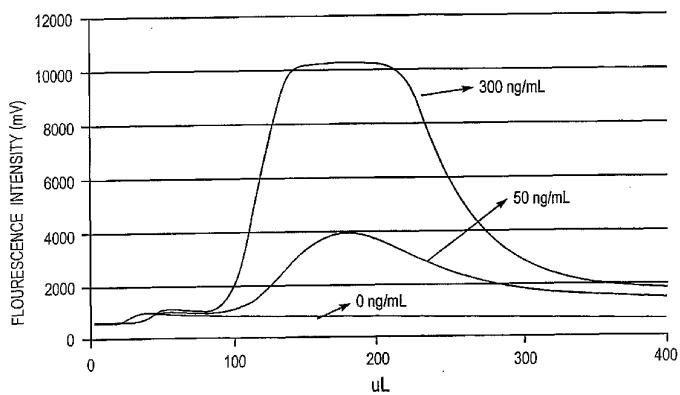
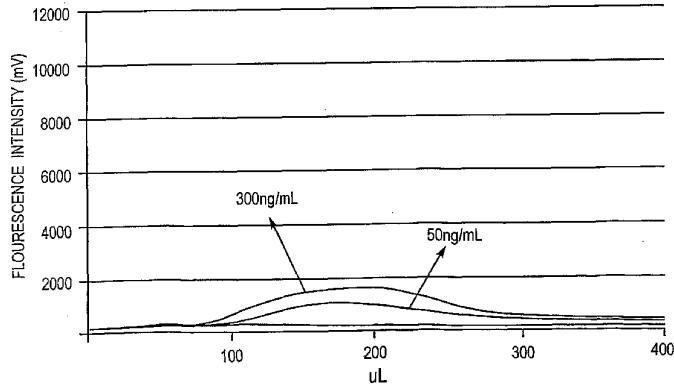


Fig. 15 FLOW IMMUNOASSAY OF AMPHETAMINE WITH CONVENTIONAL DRUG-BASED TRACER IN FIG. 11



SUBSTITUTE SHEET (RULE 26)

【国際公開パンフレット（コレクトバージョン）】

(12) INTERNATIONAL APPLICATION PUBLISHED UNDER THE PATENT COOPERATION TREATY (PCT)

(19) World Intellectual Property Organization
International Bureau(43) International Publication Date
25 July 2002 (25.07.2002)

PCT

(10) International Publication Number
WO 02/057739 A3

(51) International Patent Classification: G01N 33/532, 33/533, 33/534, 33/535, 33/545, C07D 209/04, 311/82

(21) International Application Number: PCT/US01/45024

(22) International Filing Date: 29 November 2001 (29.11.2001)

(25) Filing Language: English

(26) Publication Language: English

(30) Priority Data: 09/730,095 4 December 2000 (04.12.2000) US

(71) Applicant (for all designated States except US): LIFE-POINT, INC, [US/US]; 10400 Trademark Street, Rancho Cucamonga, CA 91730 (US).

(72) Inventors: and

(75) Inventors/Applicants (for US only): WANG, Guohong [CN/US]; 10400 Trademark Street, Rancho Cucamonga, CA 91730 (US). FOLEY, Thomas [IE/US]; 10400 Trademark Street, Rancho Cucamonga, CA 91730 (US).

(74) Agent: LYON & LYON LLP; 633 West Fifth Street, Suite 4700, Los Angeles, CA 90071 (US).

(81) Designated States (national): A1, AG, A1, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CI, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GI, GM, IIR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NO, NZ, OM, PH, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TI, TM, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VN, YU, ZA, ZM, ZW.

(84) Designated States (regional): ARIPO patent (GH, GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SI, TZ, UG, ZM, ZW), Eurasian patent (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), European patent (AL, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SI, TR), OAPI patent (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

Published:
with international search report(88) Date of publication of the international search report:
23 January 2003

For two-letter codes and other abbreviations, refer to the "Guidance Notes on Codes and Abbreviations" appearing at the beginning of each regular issue of the PCT Gazette.



WO 02/057739 A3

(54) Title: COMPOSITION AND METHODS FOR SYNTHESIS OF NOVEL TRACERS FOR DETECTING AMPHETAMINE AND METHAMPHETAMINE IN SAMPLES

(57) Abstract: This invention relates to novel tracers and their synthesis and use in an immunoassay for the detection of controlled drugs such as amphetamine (APM), methamphetamine (MAPM) and their derivatives, in a biological or aqueous sample. In particular, this invention provides methods for synthesizing novel tracers in which a non-controlled substance is both the starting material in tracer synthesis and the binding site on the resulting novel tracer for the antibody, thereby eliminating the necessity of using controlled substances as starting materials. In addition, the novel tracers of the present invention can be used as an analyte analog in an immunoassay, such as a continuous flow displacement immunoassay. It was unexpectedly discovered that the novel tracers of the present invention substantially improve the performance of the continuous flow displacement immunoassay as compared with conventionally designed tracers.

【国際調査報告】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT		International application No. PCT/US01/45024												
A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER IPC(7) : G01N 33/532, 533, 534, 535, 545; C07D 209/04, 311/82 US CL. : 435/7.93, 436/525, 526, 531, 534, 544, 545, 546, 548/455; 549/391 According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC														
B. FIELDS SEARCHED Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) U.S. : 436/546														
Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched														
Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used) APS, CASONLINE: structure searches; search term phenylalkylamines, amphetamine, methamphetamine, tracer, label														
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT <table border="1" style="width: 100%; border-collapse: collapse;"> <thead> <tr> <th style="width: 10%;">Category *</th> <th style="width: 80%;">Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages</th> <th style="width: 10%;">Relevant to claim No.</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>A</td> <td>BUDD, R.D. Amphetamine: EMIT - Structure Versus Reactivity. Clinical Toxicology. 1981, Vol. 18, no. 1, pages 91-110, especially TABLE 1, structures 16-19; TABLE 3: p-Methylphenethylamine; 3-Phenyl-1-propylamine; 4-Phenylbutylamine.</td> <td>1-13</td> </tr> <tr> <td>A</td> <td>EP 371,253 A2 (ABBOTT LABORATORIES) 06 June 1990, Figure 10, Formulas 4-6.</td> <td>1-13</td> </tr> <tr> <td>A</td> <td>EP 375,422 A2 (SYNTEX, INC.) 27 June 1990, claim 13.</td> <td>1-13</td> </tr> </tbody> </table>			Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.	A	BUDD, R.D. Amphetamine: EMIT - Structure Versus Reactivity. Clinical Toxicology. 1981, Vol. 18, no. 1, pages 91-110, especially TABLE 1, structures 16-19; TABLE 3: p-Methylphenethylamine; 3-Phenyl-1-propylamine; 4-Phenylbutylamine.	1-13	A	EP 371,253 A2 (ABBOTT LABORATORIES) 06 June 1990, Figure 10, Formulas 4-6.	1-13	A	EP 375,422 A2 (SYNTEX, INC.) 27 June 1990, claim 13.	1-13
Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.												
A	BUDD, R.D. Amphetamine: EMIT - Structure Versus Reactivity. Clinical Toxicology. 1981, Vol. 18, no. 1, pages 91-110, especially TABLE 1, structures 16-19; TABLE 3: p-Methylphenethylamine; 3-Phenyl-1-propylamine; 4-Phenylbutylamine.	1-13												
A	EP 371,253 A2 (ABBOTT LABORATORIES) 06 June 1990, Figure 10, Formulas 4-6.	1-13												
A	EP 375,422 A2 (SYNTEX, INC.) 27 June 1990, claim 13.	1-13												
<input checked="" type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C. <input type="checkbox"/>		See patent family annex.												
* Special categories of cited documents: "T" later document published after the international filing date or priority date and in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance "B" earlier application or patent published on or after the international filing date "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date and in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention "Y" document of particular relevance the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone "X" document of particular relevance the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art "G" document member of the same patent family														
Date of the actual completion of the international search 04 June 2002 (04.06.2002)	Date of mailing of the international search report 12 JUL 2002													
Name and mailing address of the ISA/US Commissioner of Patents and Trademarks Box PCT Washington, D.C. 20231 Facsimile No. (703)305-3230	Authorized officer <i>Janice Ford</i> Mary E. Ceperley Telephone No. (703) 308-1234													

Form PCT/ISA/210 (second sheet) (July 1998)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT		International application No. PCT/US01/45024
C. (Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	EP 279,213 B1 (ABBOTT LABORATORIES) 21 October 1992, Figures 5-9.	1-13
A	TURNER et al. A broad spectrum immunoassay using fluorescence polarization for the detection of amphetamines in urine. Annals of Clinical Biochemistry. November 1991, Vol. 28, pages 588-594.	1-13

Form PCT/ISA/210 (second sheet) (July 1998)

フロントページの続き

(51) Int.Cl.⁷

F I

テーマコード(参考)

G 01 N 33/553

G 01 N 33/577

B

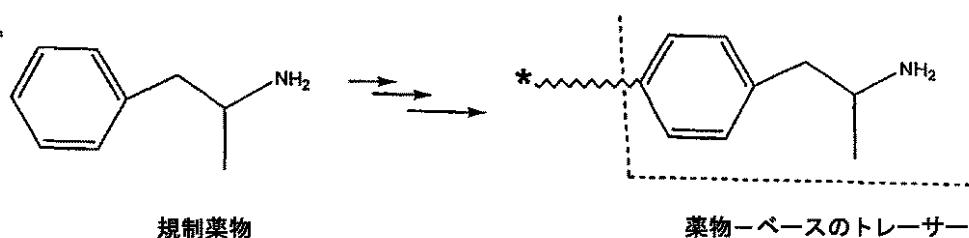
(81) 指定国 AP(GH, GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), EA(AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), EP(AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE, TR), OA(BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG), AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NO, NZ, OM, PH, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VN, YU, ZA, ZM, ZW

(72) 発明者 トマス・フォーリー

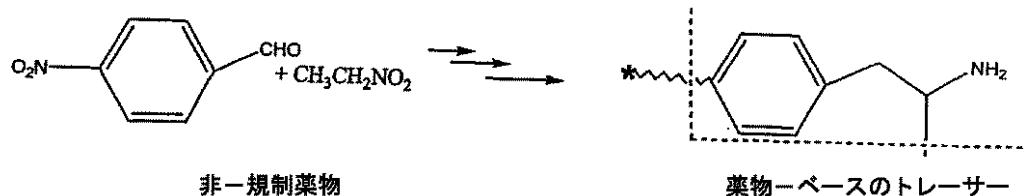
アメリカ合衆国 カリフォルニア州 91730 ランチョウ キュカモンガ トレイドマーク
ストリート 10400

【要約の続き】

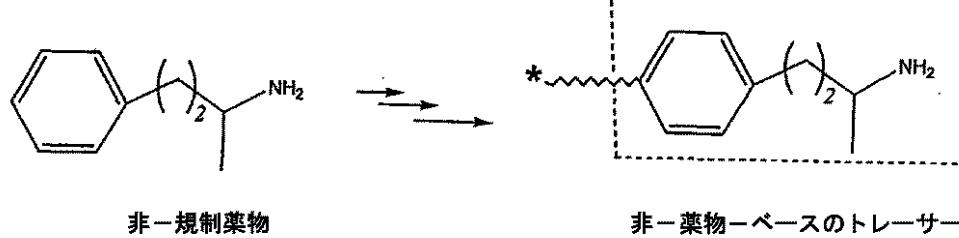
方法 A



方法 B



方法 C



免疫測定トレーサー(*標識)の合成経路

本発明は生物学的または水性試料中のアンフェタミン(APM)、メタンフェタミン(MAPM)およびそれらの誘導体などの規制薬物の検出のための免疫測定における新規トレーサーおよびそれらの合成および使用に関する。具体的には、本発明は、非規制薬物がトレーサー合成の出発物質および抗体に関して得られた新規トレーサー上の結合部位の両方であり、それによって、出発物質として規制薬物の使用の必要性を排除することができる新規トレーサーの合成方法を提供する。さらに、本発明の新規トレーサーは連続流動置換免疫測定法などの免疫測定法における分析物類似体として用いることができる。意外にも、本発明の新規トレーサーが、従来設計されたトレーサーと比較して、連続流動置換免疫測定法の性能を実質的に改善することが判明した。