

[19] 中华人民共和国国家知识产权局



[12] 发明专利申请公布说明书

[21] 申请号 200580022424.7

[51] Int. Cl.
G01N 33/53 (2006.01)
G01N 33/94 (2006.01)

[43] 公开日 2007年6月13日

[11] 公开号 CN 1981193A

[22] 申请日 2005.7.1
[21] 申请号 200580022424.7
[30] 优先权
 [32] 2004.7.2 [33] GB [31] 0414898.7
[86] 国际申请 PCT/GB2005/050099 2005.7.1
[87] 国际公布 WO2006/003472 英 2006.1.12
[85] 进入国家阶段日期 2006.12.31
[71] 申请人 考扎特生物科学有限公司
 地址 英国牛津郡
[72] 发明人 A·M·T·杰汉里 C·W·汉德

[74] 专利代理机构 中科专利商标代理有限责任公司
 代理人 吴小明

权利要求书4页 说明书14页 附图5页

[54] 发明名称

Δ-9-四氢大麻酚检测方法

[57] 摘要

本发明提供了用于 Δ-9-四氢大麻酚(大麻: THC)的高灵敏度检测的竞争性免疫测定技术,它采用大麻生物合成中的中间体的载体缀合物,更具体而言是通过其羟基缀合到大分子载体的5-戊基间苯二酚。通过在侧向流动免疫色谱测试装置中采用这样一种具有抗-THC抗体的缀合物,可以实现便利的用于液体样品中低水平大麻的现场测试。这样的测试特别有利于口腔流体样品中大麻的路边测试。

1. 一种检测液体样品中 Δ -9-四氢大麻酚 (THC) 的方法, 该方法包含:
 - (a) 将所述样品与(i) 5-戊基间苯二酚/大分子载体缀合物和(ii)能够结合 THC 和所述缀合物两者的抗体接触, 其中在所述 5-戊基间苯二酚/大分子载体缀合物中 5-戊基间苯二酚是通过它的苯环上的羟基或其衍生物缀合到所述载体; 和
 - (b) 测定所述抗体与所述缀合物的结合是否在所述样品的存在下减少。
2. 如权利要求 1 要求保护的方法, 其中所述抗体能够结合 Δ -9-四氢大麻酚(THC)和它的代谢物 11-去甲-9-羧基- Δ -9-THC (THC-COOH)和 11-羟基- Δ -9-THC (THC-OH)的全部, 由此可以检测液体样品中的一种或多种 THC、THC-COOH 和 THC-OH。
3. 如权利要求 2 要求保护的方法, 其中所述抗体是针对通过 THC-COOH 的羧酸酯基偶联到载体蛋白质的 THC-COOH 产生的抗体。
4. 如权利要求 1 至 3 任一项要求保护的方法, 其中所述 5-戊基间苯二酚/载体缀合物的载体是蛋白质。
5. 如权利要求 4 要求保护的方法, 其中所述蛋白质选自牛血清白蛋白、辣根过氧化物酶、卵清蛋白、 γ -球蛋白和甲状腺球蛋白。
6. 如在前权利要求任一项要求保护的方法, 其中所述抗体被直接或间接标记。
7. 如权利要求 1 至 5 任一项要求保护的方法, 其中所述 5-戊基间苯二酚缀合物被直接或间接标记或者所述缀合物的载体也用作可检测的标记。

8. 如在前权利要求任一项要求保护的方法，其中所述缀合物是通过利用二甲基氨基吡啶/二琥珀酰亚胺基碳酸酯或乙烯基砒将 5-戊基间苯二酚经由它的羟基偶联到所述载体的氨基上的缀合物。

9. 根据在前权利要求任一项的方法，其中 5-戊基间苯二酚通过间隔团分子偶联到所述载体。

10. 如在前权利要求任一项要求保护的方法，其中将所述抗体和所述 5-戊基间苯二酚/载体缀合物之一固定在固体载体上。

11. 如权利要求 10 要求保护的方法，该方法是侧向流动色谱测定法。

12. 如权利要求 11 要求保护的方法，其中将所述 5-戊基间苯二酚缀合物在用于所述测定法的测试条或片上的分析物检测区中被固定化并且所述抗体是被标记的。

13. 如权利要求 12 要求保护的方法，其中所述抗体是金颗粒标记的。

14. 如在前权利要求任一项要求保护的方法，其中所述样品组成自，或者衍生自尿、血、汗、眼部流体、口腔流体（唾液）或毛发。

15. 如权利要求 11 至 13 任一项要求保护的方法，其中施加到所述测试条或片而进行侧向流动免疫色谱法的样品是缓冲液稀释的口腔流体。

16. 用于进行根据权利要求 11 至 13 任一项的侧向流动免疫色谱测定法的侧向流动分析装置中使用的测试条或片，所述测试条或片具有下列特征：

(i) 包含干燥多孔材料的条或片，其具有在分析物检测区内固定其上的所述 5-戊基间苯二酚/载体缀合物或者所述抗体，和

(ii) 被连接到或整合到提供所述分析物检测区的所述条或片的单独的

标记释放区，所述标记释放区能够将以下两者之一释放到吸引到那个区域内的液体中：标记形式的所述抗体，如果所述分析物检测区提供固定化的5-戊基间苯二酚/载体缀合物，或者是如权利要求7中定义的可检测的5-戊基间苯二酚缀合物，如果所述分析物检测区提供固定化的抗体。

17. 根据权利要求16的测试条或片，其中所述干燥多孔材料是硝化纤维素。

18. 根据权利要求16或17的测试条或片，其中将5-戊基间苯二酚缀合物在分析物检测区内固定化。

19. 根据权利要求16至18任一项的测试条或片，该测试条或片还包含在预期液体流动方向上位于所述分析物检测区远端的控制区。

20. 根据权利要求16至19任一项的测试条或片，该测试条或片还包含在关于液体流动的预期方向上在所述标记释放区域近端的样品接收部件或垫板。

21. 根据权利要求16至20任一项的测试条或片，该测试条或片还包含在预期的液体流动方向上所述分析物检测区域的远端的吸收绒垫。

22. 被插入到箱中的权利要求16至21任一项中的测试条或片。

23. 结合根据权利要求16至22任一项的测试条或片的侧向流动装置。

24. 用于实施根据权利要求1至3任一项方法的试剂盒，其包含所述5-戊基间苯二酚/载体缀合物和所述抗体。

25. 如权利要求24中要求保护的试剂盒，其中所述抗体是直接标记或提供次级标记的抗体用于标记所述抗体。

26. 如权利要求 24 中要求保护的试剂盒，其中所述缀合物是如权利要求 7 中定义的可检测缀合物。

27. 如权利要求 24 至 26 任一项中要求保护的试剂盒，其中将所述抗体或所述缀合物在固体载体上固定化。

28. 如权利要求 27 中要求保护的试剂盒，其包含根据权利要求 16 至 22 任一项的测试条或片。

29. 一种缀合物，其中 5-戊基间苯二酚是通过它的苯环上的羟基或其衍生物偶联到大分子载体，由此所述缀合物能够结合根据权利要求 2 或权利要求 3 的抗体。

30. 如权利要求 29 要求保护的缀合物，该缀合物是被标记的或固定在固体载体上。

31. 一种抗体生产方法，其中采用权利要求 29 中要求保护的缀合物作为免疫原。

32. 一种制造根据权利要求 29 的缀合物的方法，其中 5-戊基间苯二酚通过其羟基或这样一种基团的衍生物偶联到所述载体。

Δ-9-四氢大麻酚检测方法

本发明涉及用于生物基质、环境组合物中和表面处的大麻素检测的竞争性免疫测定技术，特别涉及 Δ-9-四氢大麻酚（大麻；THC）和相关代谢物。特别地，本发明提供了在即时诊断（point-of-care）和现场测试中所用装置的 THC 的高灵敏度检测的程序。

发明背景

现在大麻是世界上最广泛滥用的违禁药物(*Journal of Chromatography B*, 卷 733,第 119-126 页)并且在许多国家它被归为 1 类或 2 类禁止的药物。大麻检测由法庭科学家、毒理学家、药物康复临床常规地进行并且作为药物滥用的工作场所测试的部分。近来，根据影响力测试它已经成为针对驾驶的主要违禁药物。

Δ-9-四氢大麻酚(THC，见图 1 中的结构图 I)是植物大麻 (*Cannabis sativa*) 的开花的或水果的顶端、叶子和树脂中主要的影响精神活动的分析物。THC 在人体中广泛地代谢成两种主要产物，11-去甲-9-羧基-Δ-9-THC (THC-COOH，见图 1 中的结构图 II)和 11-羟基-Δ-9-THC (THC-OH，见图 1 中的结构图 III)。在这两种代谢物中，只有所述羟基代谢物具有影响精神活动的效果。

已知的 THC 检测方法和已知的大麻检测方法一般可以归为三组。金标准技术采用 GS/MS、级联 GC/MS/MS、LC/MS 和级联 LC/MS/MS (GC = 气相色谱法；LC = 液相色谱法；MS = 质谱法)。这些技术是严格基于实验室的并且需要专门的训练和设备，这使它们不适合即时诊断测试。

大麻检测的定量方法在本领域中也是已知的。美国专利 3715189、4196167、4771005、4816415 和 5457054，还有英国专利号 1426177 和其中的参考文献，描述了基于涉及颜色改变化学反应的大麻检测方法。然而，化学方法趋于是非特异性的并且缺乏对于生物基质中药品检测所需要的灵敏度水平。

第三组已知的大麻素检测方法采用免疫技术。例如，针对缀合到载体大分子的多种大麻素衍生物产生抗体并且然后利用这些抗体和它们的标记衍生物建立免疫测定法，例如在放射性免疫测定法和荧光免疫测定法中使用的放射性标记的或荧光的衍生物和在多种形式的酶免疫测定法中使用的酶标记的衍生物。这样的酶免疫测定法包括，例如，利用固定化的药物衍生物和酶标记抗体的直接的 ELISA 法。作为一种备选的形式，标记的抗-大麻素抗体，例如，这样的用乳胶颗粒或胶体金 (colloidal gold) 标记的抗体，已经通过侧向流动免疫色谱法(lateral flow immunochromatography) 被用于大麻素检测。使用的药物衍生物一般基于母体分子 Δ -9-四氢大麻酚 (THC)和它的主要代谢物 THC-COOH。对于 THC 修饰，通常将交联的试剂在 C2、C5'或苯酚基 C1 位置连接到所述化合物(例如，见专利 GB1364925、EP0276732、EP0279308、US5237057、US5747352 和 Nature New Biology (1972) 236 卷 216-217 页)。也可以将与 THC 同样方式将 THC-COOH 衍生化。另外，在 THC-COOH 的 C9 的羧基的可用性使其可以利用碳二亚胺交联反应直接交联到载体分子的氨基。预期针对通过 C1、C2 和 C5'偶联的 THC 或 THC-COOH 产生的抗体对于这两种化合物显示不同的交叉反应性，原因分别在于 C9 的羧基是不存在和存在的。因此，为了实现 THC 和 THC-COOH 可比较的交叉反应性，许多已知的用于这些化合物检测的免疫测定法采用针对通过羧基在 C9 偶联到载体分子的 THC-COOH 产生的抗体。

许多用于 THC 的免疫测定是可商购的。Roche Diagnostics 放射性免疫测定(美国专利号 4438207)和荧光极化免疫测定(欧洲专利号 0392332)使用针对通过苯酚基在 C1 偶联到载体蛋白的 THC-COOH 和类似放射性标记的或荧光标记的 THC-COOH 产生的抗体。正如所料，这个测定显示优异的所述酸的检测而与母体药物 THC 只有 5%的交叉反应性。Abbott 荧光极化免疫测定法(欧洲专利号 0279308)使用针对通过羧酸酯基在 C9 连接到载体蛋白质的 THC-COOH 和在同样位置具有荧光部分的 THC-COOH 而产生的抗体。这个测定法显示了和母体药物以及 11-羟基衍生物 (图 1, 化合物 III) 更佳的交叉反应性。许多用于大麻素检测的酶免疫测定也是可商购的，其包括由 Cozart Bioscience Limited 制造提供的一种。

这些采用针对通过羧基酯基连接到载体蛋白质的 THC-COOH 而产生的抗体和辣根过氧化物酶(HRP)-标记的 THC-COOH (通过所述酸的羧酸酯基连接的标记)。

几乎全部所述的免疫测定法适于检测 THC-COOH, 使它们适合于利用基质(matrice)例如尿和血液检测大麻的使用。然而, 来自大麻使用者的口腔流体(唾液)不显示或显示微量的 THC-COOH 和 THC-OH。因而, 主要的影响精神活动组分 THC 的测定在利用口腔流体样品(推荐作为路边测试滥用药物的最佳基质)路边测试在此药物影响下的驾驶的情况下是必要的。检测少量的母体药物 THC 的能力也是必需的以能够发现这个药物的最近使用。本发明通过提供新的竞争性免疫测定技术用于 THC 检测解决了该问题, 所述竞争性免疫测定技术也可以提供对 THC-COOH 和 THC-OH 两者都表现高交叉反应性的优点。

发明概述

已经发现通过使用 THC 生物合成中的中间体的载体缀合物, 更具体而言是通过其羟基缀合到大分子载体例如牛血清白蛋白的 5-戊基间苯二酚(见图 2), 即使在非常低水平如可以在口腔流体样品中发现的例如 ≤ 20 ng/ml 的 THC 也可以被竞争性免疫测定法检测。出乎意料地, 发现自由溶液中的 5-戊基间苯二酚不干扰可商购的抗-THC 抗体(从 East Coast Biologics, USA 得到的小鼠单克隆抗-THC 抗体)对固定化的 5-戊基间苯二酚-大分子缀合物的结合。而且, 可以利用这样一种缀合物和抗体组合以对所述母体药物可比较的灵敏度检测 THC-OH, 而可以以低到约 1.0 ng/ml 的远远更高的灵敏度检测 THC-COOH。

因此, 本发明在一个方面提供了在液体样品中检测 THC 的方法, 该方法包含:

(a) 将所述样品与(i) 5-戊基间苯二酚/大分子载体缀合物, 其中 5-戊基间苯二酚是通过它的苯环上的羟基或其衍生物缀合到所述载体, 和(ii)能够结合 THC 和所述缀合物两者的抗-THC 抗体相接触; 和

(b) 测定所述抗体与所述缀合物的结合是否在所述样品的存在下减少。
理想地, 所述抗-THC 的抗体将另外同时结合 THC-COOH 和 THC-OH,

例如将采用针对通过羧酸酯基连接到载体蛋白质的 THC-COOH 而产生的抗体，举例说明是上面提到的商业的抗-THC 抗体。那么所述抗体对本发明中缀合物结合的减少将用来指示所述样品含有一种或多种等于或大于最小检测限的 THC、THC-COOH 和 THC-OH。

本发明的测定方法可以符合任何常规的竞争性免疫测定的形式。例如，它可以采用常规的竞争性 ELISA 的形式，其中将所述抗体或 5-戊基间苯二酚/载体缀合物固定在固体载体上。然而，对于现场测试例如路边测试最便利是，本发明的方法采用多孔测试条的侧向流动免疫色谱测定的形式。还在这个情况下，用于分析物检测的固定化试剂可以是固定化的抗体或固定化的 5-戊基间苯二酚/载体缀合物。

在进一步的方面中，本发明也提供了用于实施本发明的免疫测定的试剂盒，该试剂盒包含(i) 如上所述的 5-戊基间苯二酚/载体缀合物和(ii)能够同时结合所述缀合物和 THC 的抗体，更优选能够结合 THC、THC-COOH 和 THC-OH 的全部的抗体。

在更进一步的方面中，本发明提供了通过它的苯环上的羟基或其衍生物缀合到载体的 5-戊基间苯二酚以便它能够结合抗体，所述抗体也结合 THC、THC-COOH 和 THC-OH 的全部，这样一种标记的或固定在固体载体上的缀合物，制造这样缀合物的方法和这样的缀合物作为抗体生产的免疫原的用途。

附图简述

图 1: THC (I)、THC-COOH (II)和 THC-OH (III)的结构图

图 2: 5-戊基间苯二酚的结构图和将这个化合物通过羟基偶联到牛血清白蛋白的图解。

图 3: 抗-THC 抗体对固定化的利用碳二亚胺偶联方法获得的 THC-COOH/BSA 缀合物的结合的滴定曲线。

图 4: 将抗-THC 抗体结合到固定化的 5-戊基间苯二酚/BSA 缀合物 (BSA-CAN) 的滴定曲线。

图 5: 图解根据本发明在进行侧向流动免疫色谱测试中使用的侧向流动条的图，其中(1)是层压到后撑上的硝化纤维素片的多孔测试条，(2)是提

供固定化 BSA-CAN 的分析物检测区, (3)是提供固定化抗体捕捉标记的抗体的控制区, (4)是将标记的抗体释放到液体的标记释放垫板, 所述液体从样品接收垫板(5)被吸引到标记释放垫板中, 和(6)是芯吸垫板。

发明详述

5-戊基间苯二酚缀合物

在进行根据本发明的测定中使用的适合的 5-戊基间苯二酚缀合物是任何这样的缀合物, 其中 5-戊基间苯二酚经由羟基连接到大分子载体以便能够结合抗体, 所述抗体结合 THC、THC-COOH 和 THC-OH 的全部。如上所指出, 这个可以通过用作为所述免疫原的经由其羧酸酯基连接到载体蛋白质的 THC-COOH 而获得的抗体, 如由上面已经提及的商业的小鼠单克隆抗 THC 抗体所列举。

应当理解, 5-戊基间苯二酚到所选载体的缀合可以通过其苯环上的两个羟基的任一个并且可以采用含有这样缀合物的混合物的缀合物制剂, 可以预期其在本发明的测定中在功能上相同。(通过脂族侧链经过如图 2 中所示的 5-戊基间苯二酚的结构画一条线那么所述苯环产生两个对称的具有两个相同 OH 基团的等分)。然而, 也可以设计, 为了载体偶联, 5-戊基间苯二酚的羟基可以是衍生化的, 更具体而言, 例如, 转化为羧酸酯基。在这个情况下, 偶联到所述载体可以通过已知的碳二亚胺方法。

在一个实施方案中, 所述载体可以是蛋白质。为了例举, 发现使用牛血清白蛋白(BSA)是便利的, 但是可以采用其它蛋白质例如卵清蛋白、 γ -球蛋白和甲状腺球蛋白。适合的载体蛋白质可以是酶, 例如辣根过氧化物酶。在这个情况下, 预计所述载体也可以在本发明的测定中用作可检测的标记。也可以预计, 连接到 5-戊基间苯二酚的载体可以是含有氨基酸侧链的均聚物或杂聚物例如聚赖氨酸、聚鸟氨酸或聚(谷氨酰胺, 赖氨酸)。

所述 5-戊基间苯二酚缀合物也可以是用可检测标记直接或间接标记的, 所述标记不是所述载体。在这个情况下, 所述标记可以结合到所述缀合物的任何部分, 由此保持结合适合的抗体例如载体蛋白质的能力。适合的标记包括, 例如, 放射性同位素例如 ^{125}I 、 ^{32}P 或 ^{35}S , 颗粒标记例如胶体金, 荧光标记例如荧光素和生物素。

为了列举的目的，利用交联试剂将 5-戊基间苯二酚直接连接到载体。下面描述了两种这样的方法，二甲基氨基吡啶/二琥珀酰亚胺基碳酸酯（disuccinimidylyl carbonate）方法的使用和乙烯基砒的使用。然而，已知用于将羟基结合到氨基的其它方法是已知的并且可以发现同样是适合的（对于综述见“Bioconjugate Techniques” by G. T. Hermanson, 1996, Academic Press）。在形成适合的 5-戊基间苯二酚缀合物中，可以采用间隔团分子，例如氨基己酸间隔团。

抗体

如上所指出，适用于本发明方法中的抗体将能够特异地结合到如上所述的 5-戊基间苯二酚缀合物并且也将能够特异地结合到 THC。理想地，采用的抗体将能够另外特异地同时结合 THC-COOH 和 THC-OH。最理想地，所述抗体将显示与侧向流动免疫色谱法测试中这两种代谢物大约至少相等或更高的交叉反应性，所述测试采用如下面列举的固定化 5-戊基间苯二酚缀合物。理想地，这样一种抗体将能够在该测试中检测 ≤ 20 ng/ml 的 THC。虽然已经在上面提及了用于这个目的的可商购抗体，应当理解利用常规技术和通过其羧酸酯基偶联到载体蛋白质的 THC-COOH 或其它结合到载体分子的 THC 衍生物作为免疫原可以产生同样适合的其它抗体（多克隆的或单克隆的）。

设想适合的抗体也可以如上述通过用作免疫原的 5-戊基间苯二酚缀合物而产生。据推测这种 5-戊基间苯二酚通过其羟基到蛋白质，例如，BSA 的连接引起化合物构型以这样一种方式改变，以便抗-THC 抗体能够特异地识别所述构型。

在本发明的方法中使用的抗体可以被直接或间接标记，例如，通过次级标记的抗体。用于此目的的适合标记是在免疫测定中常规采用的任何标记，其包括放射性标记、荧光标记、颗粒标记如胶体金、酶标记例如辣根过氧化物酶和生物素。

这里所用术语“抗体”将被理解成延伸到抗体片段，例如 Fab、Fab' 和 Fv 片段，其保持抗体的结合能力并可以利用在本发明的方法中。

竞争性测定

也如上所指出，本发明的方法可以采用进行竞争性免疫测定的任何形式。药物-抗体结合可以发生在溶液中，随后是结合的配合标记的分离。备选地并优选地，抗-THC 抗体和 5-戊基间苯二酚缀合物的一种可以结合到固体载体，例如，包含硝化纤维素或塑料的固体载体，例如塑料孔表面，或固体珠，例如塑料或玻璃珠。因而，本发明的方法可以，例如，与常规竞争性 ELISA 形式一致，采用直接或间接标记的抗-THC 抗体或 5-戊基间苯二酚/载体缀合物。在这个情况下，可以将 5-戊基间苯二酚/载体缀合物或者抗-THC 抗体固定在微量滴定板的孔中或者固定在固体珠上。然而，备选地，可以将抗-THC 抗体或 5-戊基间苯二酚/载体缀合物固定多孔测试条或片上而可以由侧向流动免疫色谱测定便利地进行现场药物测试，例如包含硝化纤维素的测试条或片。这样一种测试条或片，例如，可以是结合到后撑(backing support)的硝化纤维素形式，例如塑料片。这样一种条或片可以是硝化纤维素卡片。根据本发明的优选侧向流动免疫色谱测试在紧接的下面将更充分地讨论并且通过举例说明。

侧向流动方法

根据本发明的侧向流动免疫色谱测试可以利用任何已知的侧向流动装置形式进行并且依赖于用于分析物检测的竞争性抗体结合。这样的测试可以利用在 Cozart Bioscience Limited 的英国专利 2339615，相应公布的国际申请 WO 00/04831 和 Journal of Forensic Science 2001, 46 卷, 1214-1220 页中描述的操作法进行。

分析物检测用侧向流动装置的共同特征是提供包含干燥多孔材料例如硝化纤维素的测试条或片，液体样品可以通过其被吸引到达一个或多个空间上独立的分析物检测区。每一个这样的区域提供一种固定化的特异性结合试剂。为此目的的根据本发明的侧向流动免疫色谱测试，将提供至少一个这样的分析物检测区，其提供适合的 5-戊基间苯二酚/载体缀合物或者适合的抗-大麻素抗体。这样一种测试条或片也将具有连接到那里或者结合到那里的标记释放区，所述标记释放区能够将下列两种物质之一释放到吸引到那个区域中的液体中：或者是标记的抗体，如果所述分析物检测区提

供固定化的缀合物，或者是可检测的缀合物，如果所述分析物检测区提供固定化的抗-大麻素抗体。

因而，通过本发明也提供一种用于进行根据本发明的侧向流动免疫色谱测试的测试条或片，其具有下列特征：

(i) 包含干燥多孔材料、优选硝化纤维素的条或片，在分析物检测区中具有固定于其上的如上所述适合的 5-戊基间苯二酚/载体缀合物或者适合的抗-THC 抗体；和

(ii) 被连接到或整合到提供所述分析物检测区的所述条或片的单独的标记释放区，所述标记释放区能够将下列两种物质之一释放到吸引到那个区域中的液体中：或者是标记形式的所述抗体，如果所述分析物检测区提供固定化的 5-戊基间苯二酚缀合物，或者是如上所述的可检测的 5-戊基间苯二酚缀合物，如果所述分析物检测区提供固定化的抗体。这样的可检测的缀合物可以是，例如，用金或有色乳胶颗粒标记的 5-戊基间苯二酚缀合物。

实施例更加详述了根据本发明的采用固定化 5-戊基间苯二酚缀合物和标记的抗-THC 抗体的侧向流动免疫色谱测试，更具体而言标记的抗体能够结合 THC 并表现与 THC-COOH 和 THC-OH 的高交叉反应性。举例说明的是金颗粒标记的抗体的优选使用，尽管可以采用其它的标记，例如，还是有色的乳胶颗粒。利用这个方法和如上所述的金-标记的可商购抗-THC 抗体，发现 THC 和 THC-OH 两者在 ≤ 20 ng/ml 都是可检测的，而 THC-COOH 是以更大的灵敏度可检测的（约 1.0 ng/ml）。

除如上所述的分析物检测区之外，根据本发明的侧向流动测试用测试条或片也可具有一个或多个另外的分析物检测区用于检测一种或多种另外的药物或药物种类或组。

应当理解，在侧向流动装置中，考虑到液体流动的方向，所述标记释放区将处于所述分析物检测区的近端。它可以以垫板形式，例如包含玻璃纤维的垫板，连接到提供所述分析物检测区的条或片。在这样一种条或片中提供整体标记释放区的方法也是众所周知的。例如，硝化纤维素条的区域可以通过沉积糖或纤维素的水溶液而磨光，并且因而将磨光的区域与标记的试剂接触（见，例如，欧洲专利号 0291194 和相关的欧洲专利 0560410

和 0560411)。

本发明的侧向流动方法中使用的测试条或片也可以另外包含标记释放区近端的样品接收构件或垫板。这样一种样品接收构件或垫板可以由任何能够快速吸收液体的吸水材料制造。

典型地，这样一种测试条或片，在沿所述条预期的液体流动方向上的分析物检测区之外，即，在分析物检测区的远端，将还具有提供固定化特异结合试剂的检测区以便提供控制区 (control zone)。所述控制区起指示样品的液体已经在适于分析物检测的条件下穿过在前的分析物检测区的作用。例如，在由标记释放区提供标记抗体时，控制区可以提供能够结合所述标记抗体的固定化抗体。

在期望的液体流动方向上的检测区的远端，本发明的测试条或片还可以包含吸收绒垫(waste pad) (末端或芯吸垫板)。

本发明也延伸到结合测试条或片的侧向流动装置用于进行本发明的方法，例如便携式筛选装置，如 Cozart Bioscience Limited 的 WO 00/04381 中所描述。

样品

适合的测试样品将以液体形式存在以使其与所述抗大麻素抗体相互作用。如上所指出，本发明的方法特别有利于口腔流体(oral fluid) (唾液) 样品，所述样品可以首先用缓冲液例如 Cozart Oral Fluid Dilution Buffer(Cozart Bioscience 产品 CR-BUFF)稀释。这样的样品特别有利于大麻的现场测试，例如路边测试，使用目视读取测试或采用如上所述的便携的侧向流动读取装置。然而，应当理解本发明的方法可以应用到通常用于测试药物滥用的任何形式的液体样品。因而，所述样品可以是组成自或衍生自任何口腔流体、尿、血、眼部流体(ocular fluid)、汗或毛发的流体样品。适合的样品可以来源于环境来源或药签，例如与口中的口腔液体或怀疑大麻沾污的表面接触的药签。所述样品可以通过将待测试大麻存在的材料例如固体树脂或粉末溶解在缓冲溶液中而获得。对于样品制备可以引用的参考文献包括 Clinical Pharmacokinetics 1996, 30 卷, 211-228 页中的 “Drug Monitoring in Nonconventional Biological Fluids and Matrices” 和 Forensic

Science Review 1997, 9 卷, 23-25 页中的“Testing for Drugs of Abuse in Hair”。

试剂盒

如上所述, 本发明也另外延伸到用于实施本发明方法的试剂盒, 其包含如上描述的适合的 5-戊基间苯二酚/大分子载体缀合物和抗-THC 抗体。可以用可检测的标记将 5-戊基间苯二酚缀合物或者抗-THC 抗体直接标记。在 5-戊基间苯二酚缀合物的情况中, 如上面已经指出的, 所述缀合物的载体部分可以用作可检测的标记。备选地, 可以提供将所述缀合物或者抗-THC 抗体间接标记的方法, 例如, 次级标记的抗体。或者 5-戊基间苯二酚缀合物或者抗-THC 抗体可以被固定在固体载体上。例如, 所述试剂盒可以包含用于进行侧向流动免疫色谱的如上所述测试条或片上固定化的缀合物或者抗-THC 抗体。这样一种测试条或片可以插入箱(housing)中, 所述箱在和这样一种箱一起的分析物检测区上提供一个窗口或多个窗口。

本发明的试剂盒可以包含其它组分。例如, 当从测试对象收集试样时, 所述试剂盒还可以含有流体收集设备, 例如, 口腔流体收集装置或药签, 容器例如适于收集血或尿的容器。用于侧向流动方法中的试剂盒可以包括便携式读取装置和结果的数字显示器, 可以将上面描述箱安装到所述便携式读取装置内用于检测在检测区中结合的标记。

下面的实施例阐明了本发明。

实施例

I. 牛血清白蛋白-THC(BSA-THC)缀合物的制备

利用碳二亚胺偶联方法将 THC-COOH 缀合到 BSA。将所述药物的羧酸基团如下连接到赖氨酸残基的侧链 ϵ -氨基:

1. 将 5.0 mg 的 Δ^9 -THC 酸(Helena, 目录号 DR021) 溶解在 1 ml 乙醇中。

2. 加入 1.0 ml 的二甲基甲酰胺(DMF)。
3. 加入 10 μ l 的 N-甲基吗啉(NMM, Sigma Co., 目录号 67869)。
4. 加入 N-羟基琥珀酰亚胺 (N-HS), 50 μ l 的二甲基甲酰胺(DMF)中的 6.3 mg。在室温下黑暗中将混合物搅拌 24 小时。
5. 在棕色瓶中称出 30 mg 牛血清白蛋白。溶解在 4 ml 的 0.1 M 碳酸氢钠中。
6. 向所述 BSA 溶液中逐滴加入活化的药物。在室温下黑暗中搅拌过夜。
7. 加入 100 μ l 的 2 M Tris 并继续搅拌另外 60 分钟。
8. 对 pH 7.3 含有 0.1%叠氮化钠的磷酸盐缓冲盐水透析过夜。
9. 利用 Lowry 蛋白质测定法确定蛋白质浓度并且在 PBS/叠氮化物中调节到 1mg/ml。将等分部分保存在-20°C。

利用酶免疫吸附测定测试所述缀合物。将 96-孔微量滴定板用所述缀合物以 5 μ g/ml、100 μ l/孔在 50 mM、pH 9.6 碳酸钠/碳酸氢钠缓冲液中在室温下过夜包被。然后将所述孔用 pH 7.4、含 0.05%吐温-20 的磷酸盐缓冲盐水（洗涤缓冲液）洗（4 次，330 μ l/孔）并在相同缓冲液中封闭 30 分钟。将含有 5 mg/ml BSA 的洗涤缓冲液（测定缓冲液）中 3-倍稀释的小鼠单克隆抗-THC 抗体 (East Coast Biologics, USA)加入到所述孔(100 μ l/孔)。在室温下保温 1 小时后如前将孔板用洗涤缓冲液洗 4 次并将辣根过氧化物酶-标记的山羊抗-小鼠 IgG 加入到测定缓冲液中(1/2000 稀释, 100 μ l/孔)并将孔板继续保温另外 30 分钟。然后如前洗涤所述孔板并将底物溶液四甲

联苯胺加入到所述孔(100 μ l/孔)。在保温 30 分钟后,通过加入 1 M 硫酸(100 μ l/孔)停止显色并且在 450 nm 读取光密度。图 3 表示了典型的滴定曲线。

II. 牛血清白蛋白-5-戊基间苯二酚缀合物(BSA-CAN)的制备

利用二甲基氨基吡啶(DMAP)/二琥珀酰亚胺基碳酸酯(DSC)方法或乙烯基砜,通过它的羟基将 5-戊基间苯二酚偶联到牛血清白蛋白,如下:

(i) 利用二甲基氨基吡啶/二琥珀酰亚胺基碳酸酯的偶联:

1. 将 10 mg 的 5-戊基间苯二酚溶解在 1 ml 异丙醇中。
2. 将 88 mg 的 DSC 溶解在 0.4 ml DMF 中。
3. 将 42mg of DMAP 溶解在 0.4 ml 丙酮中。
4. 将 DSC 溶液逐滴加入到 5-戊基间苯二酚溶液。
5. 将 DMAP 溶液缓慢并逐滴加入。在室温下黑暗中搅拌过夜。
6. 将活化的药物加入到在 4 ml 的 0.1 M 碳酸氢钠中的 70mg 的 BSA。在室温下搅拌过夜。
7. 将所述缀合物对 pH 7.3 的含有 0.1%叠氮化钠的磷酸盐缓冲盐水 (PBS)透析三天,更换三次、每次 1 升。
8. 利用 Lowry 蛋白质测定法确定蛋白质浓度并且调节到 1mg/ml。将等分部分保存在-20°C。

用具有氨基己酸间隔团的 BSA 替换这个方法中的 BSA 得到同样适合的缀合物。

(ii) 利用乙烯基砒的偶联:

1. 将 10mg 的 BSA 溶解在 pH 10.0 的 1 ml 的 0.1 M 碳酸钠/碳酸氢钠缓冲液中。缓慢加入 0.1 ml 的乙烯基砒并在室温下将所述混合物搅拌过夜。将活化蛋白对 0.15 M 氯化钠在室温下透析 6 小时。
2. 加入在 0.2 ml 异丙醇中的 1.5 mg 的 5-戊基间苯二酚并将所述混合物在室温下保温过夜。
3. 将所述缀合物对 PBS/叠氮化物透析 3 天, 更换 3 次每次 2 升。
4. 利用 Lowry 蛋白质测定法确定蛋白质浓度并且稀释到 1mg/ml。将等分部分保存在-20°C。

也通过对 BSA-THC 缀合物描述的酶免疫测定法测试 BSA-CAN 缀合物。图 4 表示典型的滴定曲线。

III. 对大麻的侧向流动免疫色谱测试

将 BSA-THC 和 BSA-CAN 用于建立大麻的侧向流动测试。图 5 表示这个测试的形式。将所述缀合物在含有 3%乙醇的 PBS 中稀释到 1mg/ml。将 BSA-THC 或 BSA-CAN 利用喷墨或直接接触方法固定在硝化纤维素条上。也将绵羊抗-小鼠 IgG 抗体(作为控制线(3))以 0.5 mg/ml 固定在所述硝化纤维素条(2)上。在 37°C 过夜干燥所述条。将含有金-标记的小鼠单克隆抗-THC 抗体(从 East Coast Biologics, USA 获得的未标记抗体)的玻璃纤维垫板(4)样品垫板(5)和芯吸垫板(6)层压到所述硝化纤维素条上, 如图 5 中所示。利用 Cozart 样品收集垫板(产品号 MANU018)收集口腔流体样品(1 ml)并用 2 ml 的 Cozart 口腔流体稀释缓冲液(产品号 CR-BUFF)稀释。将 120 μ l 稀释的口腔流体缓慢加入到所述样品垫板。通过毛细作用所述液体移动经过所述条而水合所述金-标记的抗体。

如果所述样品不含大麻, 那么标记的抗体结合到固定化的 BSA-药物缀合物而得到微红/棕色线。所述控制线捕捉过量的标记抗体。如果稀释的口

腔流体含有大麻，那么这优先于固定化的 BSA-药物缀合物结合到所述金-标记的抗体导致 BSA-药物线的颜色强度减小。利用 Cozart® Rapiscan 阅读器(德国专利号 2339615，对应公开的国际专利申请 WO 00/04831 和 Journal of Forensic Science 2001, 46 卷, 1214-1220 页, 产品号 CR200S-UK) 读出每一个测试的结果。阅读器测量所述 BSA-药物线的颜色强度，其与稀释的口腔流体样品中的药物浓度负相关，报告所述测试结果为对于预设截止值为阳性或阴性。用 THC (I)或 THC-COOH (II)或 THC-OH (III)以不同浓度掺入不含药物的口腔流体并且然后利用 BSA-THC 或 BSA-CAN 侧性流动条测试。表 1 中列出了在阅读器的给出阳性信号的药物的最低浓度。显然利用新的 BSA-CAN 缀合物将 THC 检测的灵敏度增加了约 10 倍。

表 1

固定化的缀合物	测试的化合物	给出阳性 Cozart® Rapiscan 响应的浓度[ng/ml]
BSA-THC	THC	200
	THC-COOH	10
	THC-OH	200
BSA-CAN	THC	20
	THC-COOH	1.0
	THC-OH	20

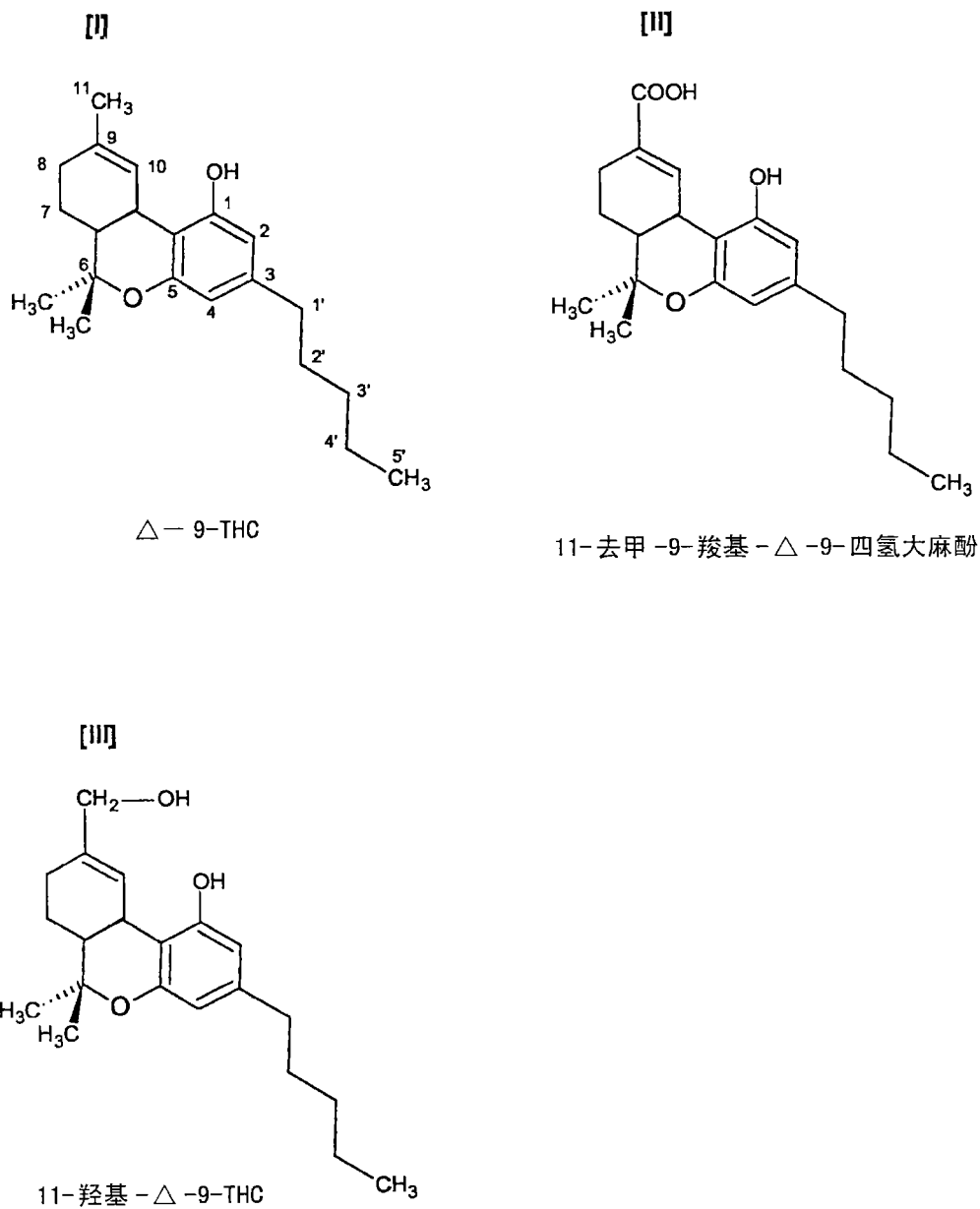


图 1

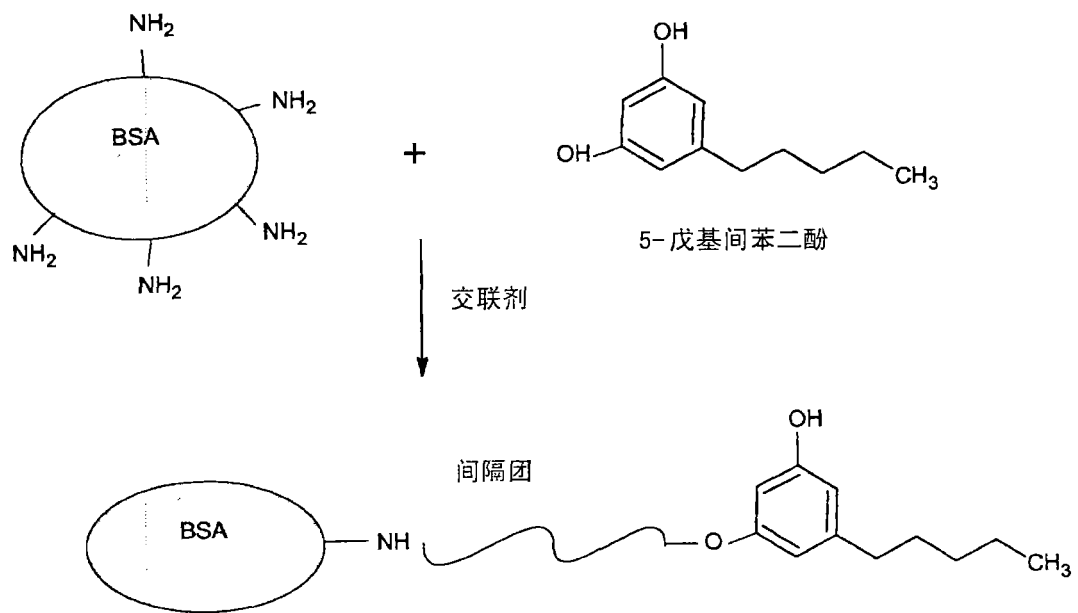


图 2

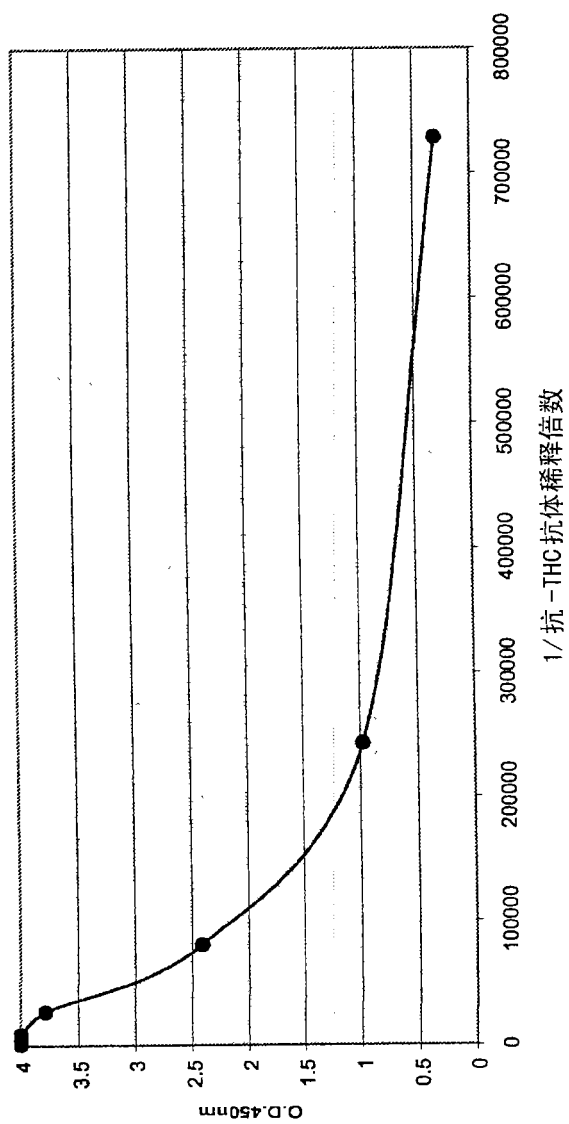


图 3

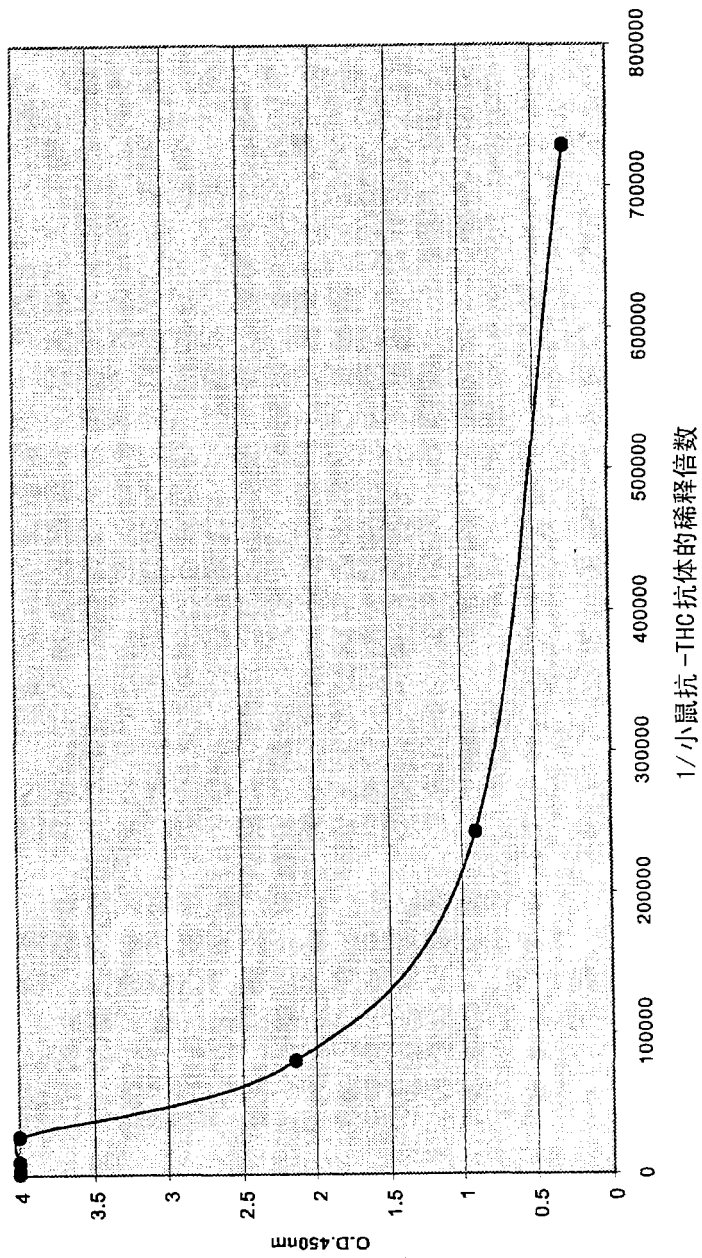


图 4

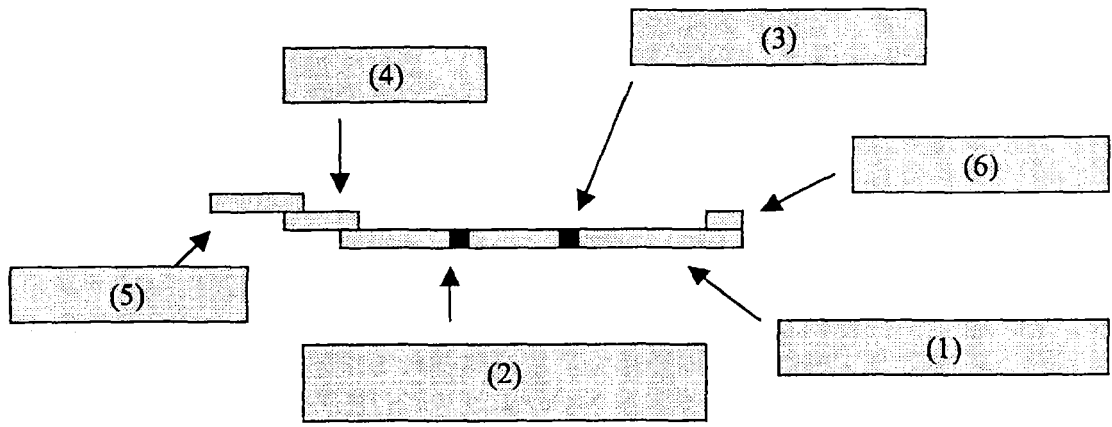


图 5

专利名称(译)	Δ - 9 - 四氢大麻酚检测方法		
公开(公告)号	CN1981193A	公开(公告)日	2007-06-13
申请号	CN200580022424.7	申请日	2005-07-01
申请(专利权)人(译)	考扎特生物科学有限公司		
当前申请(专利权)人(译)	考扎特生物科学有限公司		
[标]发明人	AMT杰汉里 CW汉德		
发明人	A·M·T·杰汉里 C·W·汉德		
IPC分类号	G01N33/53 G01N33/94 G01N33/50 G01N33/52		
CPC分类号	G01N33/5038 G01N33/5008 G01N33/526 G01N33/94 G01N33/948 G01N33/50		
代理人(译)	吴小明		
优先权	2004014898 2004-07-02 GB		
其他公开文献	CN1981193B		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明提供了用于Δ - 9 - 四氢大麻酚(大麻 : THC)的高灵敏度检测的竞争性免疫测定技术, 它采用大麻生物合成中的中间体的载体缀合物, 更具体而言是通过其羟基缀合到大分子载体的5 - 戊基间苯二酚。通过在侧向流动免疫色谱测试装置中采用这样一种具有抗 - THC抗体的缀合物, 可以实现便利的用于液体样品中低水平大麻的现场测试。这样的测试特别有利于口腔流体样品中大麻的路边测试。

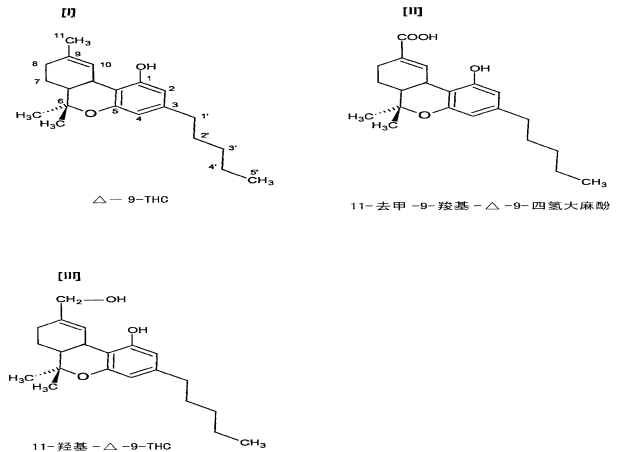


图 1