

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 公開特許公報(A)

(11) 特許出願公開番号

特開2005-41872

(P2005-41872A)

(43) 公開日 平成17年2月17日(2005.2.17)

(51) Int. Cl. ⁷	F I	テーマコード (参考)
CO7K 16/44	CO7K 16/44	4B064
C12N 5/10	GO1N 33/53	4B065
GO1N 33/53	GO1N 33/577	4H045
GO1N 33/577	C12N 5/00	
// C12P 21/08	C12P 21/08	

審査請求 有 請求項の数 11 O L 外国語出願 (全 31 頁)

(21) 出願番号	特願2004-207719 (P2004-207719)	(71) 出願人	591003013
(22) 出願日	平成16年7月14日 (2004. 7. 14)		エフ. ホフマン-ラ ロシュ アーゲー
(31) 優先権主張番号	10/622, 524		F. HOFFMANN-LA ROCH
(32) 優先日	平成15年7月18日 (2003. 7. 18)		E AKTIENGESELLSCHAFT
(33) 優先権主張国	米国 (US)		スイス・シーエイチ-4070バーゼル・
			グレンツアーヘルストラツセ124
(特許庁注：以下のものは登録商標)		(74) 代理人	100091096
1. フロッピー			弁理士 平木 祐輔
		(74) 代理人	100096183
			弁理士 石井 貞次
		(74) 代理人	100118773
			弁理士 藤田 節
		(74) 代理人	100125508
			弁理士 藤井 愛

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 エクスタシー系アナライトを検出するための抗体

(57) 【要約】

【課題】 メチレンジオキシ系またはエクスタシー系ドラッグのメンバーを検出するための従来のアンフェタミンおよび/またはメタンフェタミンのイムノアッセイの使用に関連した問題を取り除くこと。

【解決手段】 メチレンジオキシ系アンフェタミン誘導体に特異的な抗体を産生するのに有用なハプテン、中間体、および免疫原などの化合物を記載する。メチレンジオキシ系アンフェタミン誘導体に特異的な抗体、メチレンジオキシ系アンフェタミン誘導体に特異的な抗体を含む試薬キット、メチレンジオキシ系アンフェタミン誘導体に特異的な抗体の産生方法、およびメチレンジオキシ系アンフェタミン誘導体のメンバーを含むアナライトの検出方法を記載する。

【選択図】 なし

【特許請求の範囲】**【請求項 1】**

細胞系 NEAMP 48.2(ATCC名称PTA-5295)またはNEAMP 62.1(ATCC名称PTA-5294)である、MDEAに優先的に結合するモノクローナル抗体を産生する細胞系。

【請求項 2】

細胞系 NEAMP 48.2(ATCC名称PTA-5295)またはNEAMP 62.1(ATCC名称PTA-5294)から産生される、MDEAに優先的に結合するモノクローナル抗体。

【請求項 3】

細胞系 NEAMP 48.2(ATCC名称PTA-5295)またはNEAMP 62.1(ATCC名称PTA-5294)に由来する抗体と等価な方法でMDEAに優先的に結合するモノクローナル抗体。

10

【請求項 4】

エクスタシー系ドラッグの他のメンバーと比較してMDEAに優先的に結合する抗体。

【請求項 5】

N-エチルアンフェタミンに対して90%超の交差反応性を有することを特徴とする、請求項 4 に記載の抗体。

【請求項 6】

d-メタンフェタミンに対して1%超の交差反応性を有することを特徴とする、請求項 5 に記載の抗体。

【請求項 7】

エフェドリン、プソイドエフェドリン、およびフェニルプロパノールアミンに対してそれぞれ1%未満の交差反応性を有することを特徴とする、請求項 4 に記載の抗体。

20

【請求項 8】

N-エチルアンフェタミンに対して20%未満の交差反応性を有することを特徴とする、請求項 4 に記載の抗体。

【請求項 9】

BDBに対して40%超の交差反応性を有することを特徴とする、請求項 4 に記載の抗体。

【請求項 10】

サンプル中のアナライトを検出する方法であって、
該サンプルを請求項2~9に記載の抗体に接触させることと、
該抗体を該アナライトに結合させることと、
該抗体および該アナライトにより生成された複合体を検出することと、
を含む、上記方法。

30

【請求項 11】

前記アナライトが、アンフェタミン、アンフェタミン誘導体、エクスタシー系ドラッグ、エクスタシー系ドラッグ誘導体、およびそれらの組合せよりなる群から選択される、請求項 10 に記載の方法。

【発明の詳細な説明】**【技術分野】****【0001】**

本発明は、免疫アッセイに関し、より特定のには、アンフェタミンの誘導体(とりわけ、エクスタシー系ドラッグ)の免疫アッセイに関する。

40

【背景技術】**【0002】**

「エクスタシー系ドラッグ」として一般に知られる違法デザイナードラッグ類の使用および乱用は、近年、著しく増加している。縮合メチレンジオキシフェニル環系を有することにより識別されるアンフェタミンの誘導体であるこれらの化合物としては、MDA(3,4-メチレンジオキシアンフェタミン)、「エクスタシー」としても知られるMDMA(3,4-メチレンジオキシ-N-メチルアンフェタミン)、「イヴ」としても知られるMDEA(3,4-メチレンジオキシ-N-エチルアンフェタミン)、BDB(3,4-メチレンジオキシフェニル-2-ブタンアミン)、およびMBDB(3,4-メチレンジオキシフェニル-N-メチルブタンアミン)が挙げられる。

50

【0003】

これまで、エクスタシー系ドラッグの検出方法は、もともとアンフェタミンおよび/またはメタンフェタミンの検出用に開発されたイムノアッセイを主に含むものであった。そのようなアッセイによるエクスタシー系ドラッグの検出は、エクスタシー系ドラッグとアンフェタミン抗体および/またはメタンフェタミン抗体との間の偶然存在しうる限られた交差反応性に依拠する。そのようなアッセイにより肯定的な結果が得られたとしても、依然として、どの特定の物質またはメチレンジオキシ(MD)系誘導体のどのメンバーがサンプル中に存在するかを明らかにできない可能性がある。

【0004】

一般に、アンフェタミンおよびメタンフェタミンのイムノアッセイは、エクスタシー系ドラッグに対して、それほど敏感でなく、非特異的である。そのようなアッセイは、MDEA誘導体に対して、とりわけ限られた認識性を示す。

10

【発明の開示】

【発明が解決しようとする課題】

【0005】

本発明は、メチレンジオキシ系またはエクスタシー系ドラッグのメンバーを検出するための従来のアンフェタミンおよび/またはメタンフェタミンのイムノアッセイの使用に関連したこれらのおよび他の問題を取り除くことを目的とする。

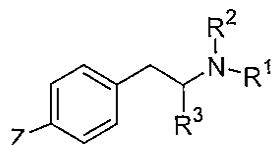
【課題を解決するための手段】

【0006】

20

本発明を具現化した化合物は、構造

【化1】



を有する。上記式中、 R^1 は、2~6個の炭素原子を含むアルキル基であり、 R^2 は、水素、アルキル基、および保護基よりなる群から選択され、 R^3 は、場合により置換されていてもよいアルキル基であり、そしてZは、LXQである。好ましくは、 R^1 は、エチル、プロピル、またはブチルであり、より好ましくは、 R^1 は、エチルである。Lは、1~15個の炭素原子および0~6個のヘテロ原子を含む。Xは、O、CO、 NR^4 、S、 $C(=NH)O$ 、 $NH(CO)$ 、 $NH(CO)NH$ 、 $NH(CS)$ 、 $NH(CS)NH$ 、 $O(CO)NH$ 、 $NH(C=NH)$ 、およびマレイミドチオエーテルよりなる群から選択され、ここで、 R^4 は、水素およびアルキル基よりなる群から選択される。Qは、水素、ヒドロキシル、脱離基、巨大分子担体、および標識よりなる群から選択される。

30

【0007】

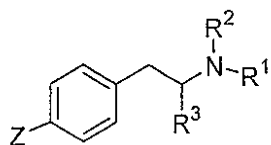
本発明を具現化した第1の抗体は、エクスタシー系ドラッグに特異的である。

【0008】

本発明を具現化した第2抗体は、構造

40

【化2】



を有する化合物に応答して産生される。上記式中、 R^1 は、2~6個の炭素原子を含むアルキル基であり、 R^2 は、水素、アルキル基、および保護基よりなる群から選択され、 R^3 は、場合により置換されていてもよいアルキル基であり、そしてZは、LXQである。好ましくは、 R^1 は、エチル、プロピル、またはブチルであり、より好ましくは、 R^1 は、エチルである。

50

Lは、1～15個の炭素原子および0～6個のヘテロ原子を含む。Xは、O、CO、NR⁴、S、C(=NH)O、NH(CO)、NH(CO)NH、NH(CS)、NH(CS)NH、O(CO)NH、NH(C=NH)、およびマレイミドチオエーテルよりなる群から選択され、ここで、R⁴は、水素およびアルキル基よりなる群から選択される。Qは、タンパク質、ポリペプチド、および多糖よりなる群から選択される。

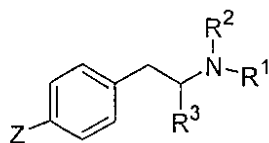
【0009】

本発明を具現化した試薬キットは、上述したタイプの抗体を含む。

【0010】

本発明を具現化した抗体の産生方法は、構造

【化3】



10

を含む免疫原を宿主に接種することを含む。上記式中、R¹は、2～6個の炭素原子を含むアルキル基であり、R²は、水素、アルキル基、および保護基よりなる群から選択され、R³は、場合により置換されていてもよいアルキル基であり、そしてZは、LXQである。好ましくは、R¹は、エチル、プロピル、またはブチルであり、より好ましくは、R¹は、エチルである。Lは、1～15個の炭素原子および0～6個のヘテロ原子を含む。Xは、O、CO、NR⁴、S、C(=NH)O、NH(CO)、NH(CO)NH、NH(CS)、NH(CS)NH、O(CO)NH、NH(C=NH)、およびマレイミドチオエーテルよりなる群から選択され、ここで、R⁴は、水素およびアルキル基よりなる群から選択される。Qは、巨大分子担体である。

20

【0011】

本発明を具現化したサンプル中のアナライトの検出方法は、サンプルを上述したタイプの抗体に接触させることと、抗体をアナライトに結合させることと、抗体およびアナライトにより生成された複合体を直接的または間接的に検出することと、を含む。

【発明を実施するための最良の形態】

【0012】

MD系アンフェタミン誘導体に特異的な抗体の産生に有用なハプテン、中間体、および免疫原などの化合物、MD系アンフェタミン誘導体に特異的な抗体、MD系アンフェタミン誘導体に特異的な抗体を含む試薬キット、MD系アンフェタミン誘導体に特異的な抗体の産生方法、ならびにMD系アンフェタミン誘導体のメンバー(すなわち、エクスタシー系ドラッグ)を含むアナライトの検出方法を見いだした。これらについてこれ以降で説明する。

30

【0013】

本明細書全体にわたり、および添付の特許請求の範囲において、以下の定義が適用されるものとする。

【0014】

「免疫原」という用語は、生物中で免疫応答を惹起しうる任意の物質を意味する。

【0015】

「コンジュゲート」という用語は、2つの部分を連結一体化させることにより形成される任意の物質を意味する。本発明に係る代表的なコンジュゲートとしては、小分子とタンパク質のような大分子とを連結一体化させることにより形成されたコンジュゲートが挙げられる。「コンジュゲート」という用語は、「免疫原」という用語を包含する。

40

【0016】

「ハプテン」という用語は、単独では抗体産生を刺激しない典型的には低分子量である免疫原の一部を意味する。

【0017】

「活性化ハプテン」という表現は、たとえば、担体、免疫原、標識、トレーサー、または他の部分にハプテンを連結させるために使用することのできる反応性部分を有する連結基を結合させることにより、利用可能な反応部位を含むハプテンを意味する。

50

【0018】

「連結基」および「リンカー」という用語は、巨大分子担体、標識、トレーサー、または他の部分にハプテンを連結させるために用いられる化学部分を意味する。連結基の使用は、特定のハプテンおよび担体ならびに抗体の所望の特異性に応じて、有利であったり必要であったりすることもある。好適なリンカーとしては、鎖内、鎖上、および/またはその末端に1個以上のヘテロ原子(すなわち、炭素以外の原子、たとえば、酸素、窒素、硫黄など)が組み込まれていてもよい直線状、分枝状、飽和、または不飽和の炭素鎖が挙げられる。

【0019】

「担体」および「巨大分子担体」という表現は、ハプテンに結合することにより抗体産生用の免疫原を形成したりイムノアッセイに用いられるコンジュゲートを形成したりすることができる高分子量物質を意味する。好適な巨大分子担体としては、外来物として確認されることにより宿主からの免疫学的応答を惹起するタンパク質、糖タンパク質、ポリマー、多糖、ポリペプチド、および核酸が挙げられるが、これらに限定されるものではない。

10

【0020】

「ポリペプチド」という用語は、アミド結合を介して2つ以上のアミノ酸を連結させることにより生成された任意の化合物を意味する。代表的なポリペプチドとしては、各非末端アミノ酸残基の α -アミノ基が直鎖中の隣接する残基の β -カルボキシル基に連結された α -アミノ酸のポリマーが挙げられる。高分子量ポリペプチドは、「タンパク質」と呼ばれる。

20

【0021】

「標識」または「トレーサー」という用語は、担体物質または分子に結合させてアナライトの検出に使用することのできる同定用タグを意味する。標識は、連結部分または架橋部分によりその担体物質に直接的または間接的に結合されることが可能である。好適な標識としては、酵素(たとえば、 β -ガラクトシダーゼ、ペルオキシダーゼなど)、蛍光性化合物(たとえば、ローダミン、フルオレセインイソチオシアネートすなわちFITCなど)、ルミネセンス化合物(たとえば、ジオキセタン、ルシフェリンなど)、放射性アイソトープ(たとえば、 ^{125}I)、タンパク質結合パートナー(たとえば、ビオチン)などが挙げられるが、これらに限定されるものではない。

30

【0022】

「抗体」という用語は、抗原またはその一部分に結合することができる特異的タンパク質を意味する。抗体は、注射により宿主(たとえば、動物またはヒト)に導入されたものであってもよい免疫原に応答して産生される。「抗体」という総称用語は、ポリクローナル抗体、モノクローナル抗体、および抗体フラグメントを包含する。

【0023】

「アナライト」という用語は、その存在または量が測定の対象となる任意の物質または物質群を意味する。代表的なエクスタシー系ドラッグアナライトとしては、MDA、MDMA、MDEA、BDB、MBDBなどが挙げられるが、これらに限定されるものではない。

【0024】

「誘導体」という用語は、1つ以上の化学反応により親化合物から生成された化合物を意味する。

40

【0025】

「アナライト類似体」という用語は、抗体への結合親和性に関してアナライトと類似した挙動を示し競合イムノアッセイに利用しうる任意の物質または物質群を意味する。代表的なアナライト類似体としては、ドラッグ、ドラッグ誘導体、およびそれらの異性体、ホルモン、ポリペプチド、ヌクレオチドなどが挙げられるが、これらに限定されるものではない。アナライト類似体はまた、アナライト自体であってもよい。

【0026】

「アナライトの検出」という表現は、一般的にはアナライト、特定的にはエクスタシー

50

系ドラッグを測定するための任意の定量的、半定量的、または定性的方法ならびにすべての他の方法を意味する。たとえば、サンプル中のドラッグの量または濃度に関するデータを提供する方法と同様に、サンプル中のエクスタシー系ドラッグの存在または不在を単に検出する方法もまた、本発明の範囲内にある。「検出」、「測定」、「同定」などの用語は、本明細書中では同義的に用いられ、すべて本発明の範囲内にある。

【0027】

「試薬キット」という表現は、アッセイを行うときに用いられる材料および試薬の集合体を意味する。試薬は、その交差反応性および安定性に応じて同一の容器中または個別の容器中にパッケージ化して組み合わせた形態で、および液体または凍結乾燥形態で、提供することができる。キット中に提供される試薬の量および割合は、特定用途に対して最適な結果が得られるように選択することができる。本発明を具現化した試薬キットは、エクスタシー系ドラッグに特異的な抗体を含む。キットは、アナライトの類似体および検量物質および対照物質をさらに備えていてもよい。試薬は、液体形態のままであってもよいし、凍結乾燥されたものであってもよい。

10

【0028】

「検量物質および対照物質」という表現は、既知量のアナライトを含有する任意の標準物質または参照物質を意味する。アナライトを含有すると推測されるサンプルおよび対応する検量物質は、類似の条件下でアッセイされる。アナライトの濃度は、未知試料で得られた結果を標準で得られた結果と比較することにより計算される。これは、一般に、図4および5に示されるような検量線を作成することにより行われる。

20

【0029】

「アルキル基」という表現は、任意の直線状、分枝状、環状、非環状、飽和、または不飽和の炭素鎖を意味する。代表的なアルキル基としては、アルカン、アルケン、アルキン、シクロアルカン、シクロアルケン、シクロアルキン、アリールなど、およびそれらの組合せが挙げられるが、これらに限定されるものではない。

【0030】

「場合により置換されていてもよい」という表現は、アルキル基上に1つ以上の置換基が場合により結合されていることを意味する。

【0031】

「脱離基」という表現は、反応させる試薬で置換されうる基質の任意の化学部分を意味する。好適な脱離基としては、ハライド、メシレート、トシレート、アルコキシ、第四級アンモニウム塩、などが挙げられるが、これらに限定されるものではない。本発明の好ましい実施形態に従って使用される好ましい脱離基は、トリフルオロエトキシエステル、N-ヒドロキシスクシンイミドエステル、p-ニトロフェニルエステル、ペンタフルオロフェニルエステル、イミダゾリルエステル、N-ヒドロキシベンゾトリアゾリルエステルなどの活性化エステルにより提供され、カルボニル炭素に結合されたエステルの酸素含有部分が、反応の過程で置換される。

30

【0032】

「保護基」という表現は、その通常の反応性を改変するために反応性原子または反応中心に結合された任意の部分の意味する。好適な保護基としては、専門書 "Protective Groups in Organic Synthesis(有機合成時の保護基)", 第3版, Theodora W. Greeneおよび Peter G. M. Wuts著, John Wiley & Sons, Inc., New York, 1999に記載されているものが挙げられるが、これらに限定されるものではない。この文献の全内容は、参照により本明細書に組み入れられるものとする。ただし、本出願と一致しない開示または定義である場合には、本明細書に記載の開示または定義が優先するものとする。アミンの窒素に対する種々の保護基は、当技術分野で公知であり(たとえば、上記参照)、その中でも、トリフルオロアセチルは、本発明の好ましい窒素保護基である。

40

【0033】

抗体は、抗原性化合物と他の化合物とを識別する能力を有する場合、該抗原性化合物に「特異的である」と言われる。

50

【0034】

「交差反応性」とは、抗体と、該抗体の誘導に使用されなかった抗原との反応を意味する。

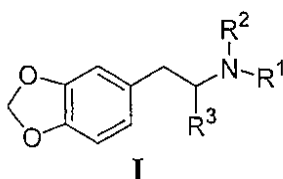
【0035】

抗体は、抗原性化合物に対してその化合物クラスの他のメンバーよりも大きな結合性を呈する場合、該抗原性化合物に「優先的に結合する」と言われる。たとえば、表2、3、および4において、抗体NEAMP 1.3、NEAMP 48.2、およびNEAMP 62.1は、MDEAの属する化合物クラスの他のメンバー(すなわち、メチレンジオキシ誘導体)と比較して、MDEAに優先的に結合する。

【0036】

本発明を具現化した化合物は、エクスタシー系ドラッグに特異的な抗体の産生において、中間体、ハプテン、または免疫原として有用である。本発明を具現化した第1の系統の化合物は、構造：

【化4】



を有する。上記式中、 R^1 はJMTであり、 R^2 は、水素、アルキル基、および保護基よりなる群から選択され、そして R^3 は、場合により置換されていてもよいアルキル基である。Jは、1~15個の炭素原子および0~6個のヘテロ原子を含む。Mは、O、CO、 NR^4 、S、 $C(=NH)O$ 、 $NH(CO)$ 、 $NH(CO)NH$ 、 $NH(CS)$ 、 $NH(CS)NH$ 、 $O(CO)NH$ 、 $NH(C=NH)$ 、およびマレイミドチオエーテルよりなる群から選択され、ここで、 R^4 は、水素およびアルキル基よりなる群から選択される。Tは、水素、ヒドロキシル、脱離基、巨大分子担体、および標識よりなる群から選択される。 R^2 が水素である場合かつ R^3 がメチルである場合、 R^1 は、 CH_2CN 、 $CH_2C=CH_2$ 、 CHO 、 CH_2CH_2OH 、 $CH_2CH_2OCH_3$ 、および CH_2CCH のいずれでもない。

【0037】

好ましくは、巨大分子担体は、タンパク質、ポリペプチド、および多糖よりなる群から選択される。好ましいタンパク質としては、KLH(キーホールリンペットヘモシアニン)、BSA(ウシ血清アルブミン)、およびBTG(ウシチログロブリン)が挙げられる。好ましくは、アルキル基は、直鎖もしくは分枝鎖の、1~15個の炭素原子、より好ましくは1~11個の炭素原子、さらに好ましくは1~9個の炭素原子を含む。

【0038】

この第1の系統の好ましい実施形態では、Jは、 $(CH_2)_k$ を含むことが好ましく、ここで、kは、1、2、3、4、5、または6であり、より好ましくは、kは3である。MはCOであることがさらに好ましい。好ましくは、 R^2 は、水素、メチル、エチル、n-プロピル、またはn-ブチルであり、より好ましくは、 R^2 は水素である。好ましくは、 R^3 は、水素、メチル、エチル、n-プロピル、またはn-ブチルであり、より好ましくは、 R^3 はメチルである。好ましくは、Tは、N-オキシスクシンイミド、ヘモシアニン類、グロブリン類、およびアルブミン類よりなる群から選択され、より好ましくは、Tは、KLH、BSA、およびBTGよりなるタンパク質群から選択される。

【0039】

図1は、この第1の系統の好ましい実施形態に係る化合物および免疫原を合成する代表的なスキームを示している。当然のことながら、この代表的な合成スキームにおいて、出発物質、試薬、個々の合成的変換、および反応条件は、単なる例示にすぎず、これらに限定されるものと解釈してはならない。図示されているものとまったく異なる出発物質に基づく合成法を含めて、他の合成的調製法を、添付の特許請求の範囲の精神および範囲から逸脱することなく開発することができる。

10

20

30

40

50

【0040】

図1に示されるように、エクスタシー系ドラッグであるメチレンジオキシアンフェタミン(MDA)2から合成を開始する。2の第一級アミノ基を4-プロモ酪酸エチルエステルと反応させてアルキル化生成物4を得る。得られた4の第二級アミノ基を好適なアミノ保護基により保護する。図1に示されるように、4のアミノ基を無水トリフルオロ酢酸(TFAA)でトリフルオロアセチル化し、保護されたトリフルオロアセチル化誘導体6を得る。6のエチルエステル部分を加水分解してカルボン酸誘導体8を取得し、これをN-ヒドロキシスクシンイミド(NHS)との反応によりエステル化して活性化エステル誘導体10を得る。活性化エステル誘導体10を巨大分子担体部分T(たとえば、KLH、BTG、またはBSA)と反応させ、たとえば炭酸カリウムでまたはpH13で脱保護し、そして透析し、免疫原12を得る。

10

【0041】

図1の化合物6、8、10、および12において、好ましい部分(CH₂)₃およびCOは、それぞれ、JおよびMに対応するが、この合成に示される特定の化合物は単なる例示にすぎず、図1に描かれた合成ストラテジーに変更を加えて実質的に異なる化学構造を有する化合物を調製することができる点を強調しておきたい。たとえば、図1に示されるアルキル化剤4-プロモ-酪酸エチルエステルは、脱離基(たとえば、臭化物)を末端官能基(たとえば、エチルエステル)から分離させるより多くのまたはより少ない連続メチレン単位を有する試薬で置き換えることができる。同様に、これらの末端を分離する炭素鎖は、ヘテロ原子、置換、不飽和などを含有しうる。さらに、このアルキル化ステップを介して導入される官能基(すなわち、4-プロモ-酪酸エチルエステルのエチルエステル部分)は、広範にわたる一連の代替部分で、たとえば、限定されるものではないが、アルコール類、保護アルコール類、カルボン酸類、保護カルボン酸類、アミン類(たとえば、第一級、第二級、または第三級保護アミン類)、チオール類、保護チオール類、チオエーテル類、アミド類、チオアミド類、イミド類、チオイミド類、ニトリル類、イミン類、ヒドラゾン類、マレイミドチオエーテル類などで、または当技術で十分に確立されているように1つ以上の合成的変換によりこれらの部分に変換することのできるこれらの部分の任意の官能基前駆体で、置き換えることができる。

20

【0042】

図1に描かれた合成ストラテジーでは、MDA 2に含まれるアミノ基のアルキル化を介してJ-M-T部分を導入するが、すでに窒素を含有しているメチレンジオキシフェニル環系を改変するこのストラテジーは、単なる例示にすぎず、多くの代替ストラテジーをその代わりに利用することができる点を強調しておきたい。たとえば、MDA 2のアミノ基の代わりに脱離基を含有するメチレンジオキシフェニル環系を、アミノ含有求核剤と、またはアミノ基の前駆体(たとえば、アジド、シアニドなど)を含有する求核剤と、反応させることができる。実際には、アミノ基の代わりに脱離基を含有するMDA 2の類似体を4-プロモ-酪酸エチルエステルのアミノ類似体(すなわち、NH₂-(CH₂)₃-CO₂Et)と反応させることによって、異なる経路で化合物6が得られるであろう。たとえば、限定されるものではないが、専門書"Comprehensive Organic Transformations," 第2版, Richard C. Larock著, Wiley-VCH, New York, 1999ならびに"March's Advanced Organic Chemistry," 第5版, Michael B. SmithおよびJerry March著, John Wiley & Sons, Inc., 2001さらにはそこに引用されている参考文献に記載されている方法を含めて、当技術分野で公知の化学変換法はすべて、本発明の好ましい実施形態に従って使用しうると考えられる。

30

40

【0043】

図1に示される代表的な合成に変更を加えるのに有用であろうと思われる変換としては、フィッシャーエステル化;他の活性化エステル、たとえば、カルボニルジイミダゾール、ジシクロヘキシルカルボジイミド、2-クロロピリジニウム、3-クロロイソオキサゾリウム、2,2'-ジピリジルジスルフィド、2-ピリジルチオクロロホルメートなどの調製;酸化、たとえば、アルコール類、アミン類、チオール類、チオエーテル類の酸化、バイヤー・ピリガー酸化など;還元、たとえば、ニトロ基の還元、カルボニル基の還元、水素化など;アミノ基の保護、たとえば、カルバメート類、アミド類、N-アルキルアミン類、N-アリ

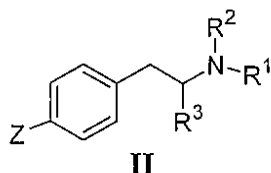
50

ールアミン類、イミン類、エナミン類、N-ヘテロ原子誘導体など、および対応する脱保護；縮合反応、たとえば、アルドール縮合、クライゼン縮合、クネーベナーゲル縮合など；1,4-付加反応、たとえば、マイケル反応、コーリー・ホワイトサイズ・ハウス有機クプレートカップリングなど；1,2-付加反応、たとえば、グリニャール反応、カルボニル還元など；ニトリル類の還元；アルコール類の脱保護；カルボン酸類の脱保護；ケトン類の脱保護；アルデヒド類の脱保護；アジド類の還元；イミン類の還元；などが挙げられるが、これらに限定されるものではない。

【0044】

本発明を具現化した第2の系統の化合物は、構造：

【化5】



を有する。上記式中、 R^1 は、2~6個の炭素原子を含むアルキル基であり、 R^2 は、水素、アルキル基、および保護基よりなる群から選択され、 R^3 は、場合により置換されていてもよいアルキル基であり、そしてZは、L-X-Qである。Lは、1~15個の炭素原子および0~6個のヘテロ原子を含む。Xは、O、CO、 NR^4 、S、 $C(=NH)O$ 、 $NH(CO)$ 、 $NH(CO)NH$ 、 $NH(CS)$ 、 $NH(CS)N$ 、 $O(CO)NH$ 、 $NH(C=NH)$ 、およびマレイミドチオエーテルよりなる群から選択され、ここで、 R^4 は、水素およびアルキル基よりなる群から選択される。Qは、水素、ヒドロキシル、脱離基、巨大分子担体、および標識よりなる群から選択される。

【0045】

好ましくは、巨大分子担体は、タンパク質、ポリペプチド、および多糖よりなる群から選択される。好ましいタンパク質としては、KLH(キーホールリンペットヘモシアニン)、BSA(ウシ血清アルブミン)、およびBTG(ウシチログロブリン)が挙げられる。好ましくは、アルキル基は、直鎖もしくは分枝鎖および1~15個の炭素原子、より好ましくは1~11個の炭素原子、さらに好ましくは1~9個の炭素原子を含む。

【0046】

この第2の系統の好ましい実施形態では、Lを構成する炭素原子およびオプションのヘテロ原子の連結は、制限されず、直線状、分枝状、環状、また非環状の系であってもよい。Lは、 $(CH_2)_j$ を含むことが好ましく、ここで、jは、1、2、3、4、5、または6であり、より好ましくは、jは3である。XはCOであることがさらに好ましい。好ましくは、 R^1 は、エチル、n-プロピル、またはn-ブチルであり、より好ましくは、 R^1 は、エチルである。好ましくは、 R^2 は、水素または保護基であり、より好ましくは、 R^2 は、トリフルオロアセチル基のような保護基である。好ましくは、 R^3 は、水素、メチル、エチル、n-プロピル、またはn-ブチルであり、より好ましくは、 R^3 はメチルである。好ましくは、Qは、ヒドロキシ、N-オキシスクシンイミド、ヘモシアニン類、グロブリン類、およびアルブミン類よりなる群から選択され、より好ましくは、Qは、KLH、BSA、およびBTGよりなるタンパク質群から選択される。

【0047】

図2は、この第2の系統の好ましい実施形態に係る化合物および免疫原を合成する代表的なスキームを示している。当然のことながら、この代表的な合成スキームにおいて、出発物質、試薬、個々の合成的変換、および反応条件は、単なる例示にすぎず、これらに限定されるものと解釈してはならない。図示されているものとまったく異なる出発物質に基づく合成法を含めて、他の合成的調製法を、添付の特許請求の範囲の精神および範囲から逸脱することなく開発することができる。

【0048】

図2に示されるように、1-メチル-2-フェニル-エチルアミン14から合成を開始する。14

10

20

30

40

50

のアミノ基をエチルブロミドでアルキル化してN-エチルアミン誘導体16を得る。16のアミノ基を好適なアミノ保護基により保護する。図2に示されるように、16のアミノ基を無水トリフルオロ酢酸(TFAA)でトリフルオロアセチル化する。フリーデル・クラフツ型反応によりトリフルオロアセチル化誘導体18を無水コハク酸と反応させてカルボン酸誘導体20を得る。カルボン酸誘導体20のベンジルカルボニル基を還元して還元生成物22を取得し、これをN-ヒドロキシスクシンイミド(NHS)との反応によりエステル化して活性化エステル誘導体24を得る。活性化エステル誘導体24を巨大分子担体部分Q(たとえば、KLH、BSA、またはBTG)と反応させ、塩基性条件下で窒素を脱保護し、そして透析し、免疫原26を得る。

【0049】

他の選択肢として、図3に示されるように、活性化エステル誘導体24を、たとえば、4-アミノメチル安息香酸との反応によりさらに改変し、安息香酸誘導体32を得ることもできる。安息香酸誘導体32、およびN-ヒドロキシスクシンイミドとの反応により32から得られる活性化エステル誘導体34は、本発明に係る広範にわたる一連のコンジュゲート、標識などの合成に有用な中間体である。図3に描かれた改変ストラテジー(すなわち、アミノベンゾエート部分の導入)は、図1に示されるタイプのメチレンジオキシ化合物で使用するよう容易に適合化させることができる(たとえば、活性化エステル誘導体10を4-アミノメチル安息香酸と反応させることにより)。

【0050】

図2の化合物22、24、および26において、好ましい部分(CH₂)₃およびCOは、それぞれLおよびXに対応するが、この合成に示される特定の化合物は単なる例示にすぎず、図2に描かれた合成ストラテジーに変更を加えて実質的に異なる化学構造を有する化合物を調製することができる点を強調しておきたい。たとえば、図2に示される無水コハク酸は、より多くのまたはより少ない環炭素原子および/または環ヘテロ原子(これ自体、置換されていてもよいし、不飽和などを含有していてもよい)を有する環状無水物と置き換えることができる。このほか、必ずしも、フリーデル・クラフツアシル化剤として環状無水物を利用する必要はない。非環状試薬(たとえば、ハロゲン化アシル類、カルボン酸類、ケトン類など)を利用することもできる。さらに、図2に示されるようにフェニル環の構造を改変するために、必ずしも、フリーデル・クラフツアシル化反応を利用する必要はない。たとえば、限定されるものではないが、フリーデル・クラフツアルキル化、ハロゲン化、ニトロ化、スルホン化、イプソ置換などの多くの他の求電子芳香族置換を利用することができる。同様に、フリーデル・クラフツアシル化ステップを介して導入された官能基(すなわち、化合物20および22に示される末端カルボン酸部分)は、広範にわたる一連の代替部分で置き換えるかまたは代替部分に変換することができる。代替部分としては、アルコール類、保護アルコール類、保護カルボン酸類、アミン類(たとえば、第一級、第二級、または第三級保護アミン類)、チオール類、保護チオール類、チオエーテル類、アミド類、チオアミド類、イミド類、チオイミド類、ニトリル類、イミン類、ヒドラゾン類、マレイミドチオエーテル類など、または当技術で十分に確立されているように1つ以上の合成的変換によりこれらの部分に変換することのできるこれらの部分の任意の官能基前駆体が挙げられるが、これらに限定されるものではない。

【0051】

図2に描かれた合成ストラテジーでは、トリフルオロアセチル化誘導体18のフェニル環のアシル化を介してL-X-Q部分を導入するが、求電子置換により既存のフェニル環を改変するこのストラテジーは、単なる例示にすぎず、多くの代替ストラテジーをその代わりに利用することができる点を強調しておきたい。たとえば、アミノ含有側鎖のパラ位がハロゲン(たとえば、Cl、Br、I)で置換されたフェニル環は、有機金属試薬(たとえば、グリニャール、有機リチウム、有機スタンナン、オルガノボラン、有機クプレートなど)に変換可能であり、当技術分野で周知の手順を用いて、求電子試薬(たとえば、ケトン、アルデヒド、酸ハロゲン化物、ハロアルカンなど)と反応させることにより、炭素-炭素結合を形成可能である。他の選択肢として、アミノ含有側鎖のパラ位が適切な脱離基(たとえば、Cl、Br、I、アルコキシなど)で置換されたフェニル環は、当技術分野で周知の手順を用い

10

20

30

40

50

て、求核芳香族置換反応に付することができる。さらに、フェニル環の置換パターンは、当技術分野で周知の試薬(たとえば、限定されるものではないが、水素化触媒(たとえば、Pt、Pd、Niなど)、SおよびSe、キニーネなど)を用いて芳香族化される完全飽和もしくは部分不飽和のシクロヘキサン環系またはそれらの前駆体上に発生させることも可能である。

【0052】

図1に示される合成スキームに関連して先に述べたように、当技術分野で公知の化学変換法はすべて、本発明の好ましい実施形態に従って使用しうると考えられる。図2に示される代表的な合成に変更を加えるのに有用であろうと思われる変換としては、図1の合成スキームに関連して先に明示したもの、さらにはウォルフ・キッシュナー還元、クレメンセン還元、ヒドラゾン類の還元(たとえば、 LiAlH_4 、 NaBH_4 、 NaBH_3CN などを用いて)が挙げられるが、これらに限定されるものではない。

10

【0053】

本発明を具現化した第1の抗体は、エクスタシー系ドラッグに対して特異的かつ優先的である。好ましくは、エクスタシー系ドラッグは、MDA、MDMA、MDEA、BDB、MBDB、およびそれらの組合せよりなる群から選択される。

【0054】

本発明を具現化した第2抗体は、MDEAおよびN-エチルアンフェタミン(NEAMP)に優先的に結合し、d-メタンフェタミンに対して1%超の交差反応性を有する。

【0055】

本発明を具現化した第3の抗体は、MDEAに優先的に結合し、BDBに対して40%超の交差反応性およびd-アンフェタミンに対して1%超の交差反応性を有する。

20

【0056】

本発明を具現化した第4の抗体は、Qが巨大分子担体である先に図示し説明した構造IまたはIIを有する化合物に応答して産生される。

【0057】

上記の第1の系統の好ましい実施形態(すなわち、縮合メチレンジオキシフェニル環系を含む系統の化合物(たとえば、図1))に由来する免疫原は、エクスタシー系ドラッグ(たとえば、MDA、MDMA、MDEA、BDB、MBDBが挙げられるが、これらに限定されるものではない)に特異的な抗体を産生するのに有用である。表1は、エクスタシー系ドラッグに特異的な抗体(とくに、TがKLHである図1の免疫原12に反応して産生される抗体MDMA 2.1.1)に対する交差反応性データを示している。このデータの取得時に使用した抗体は、当技術分野で十分に確立されたタイプの古典的免疫化プロトコールにより産生された。表1において、略号d-AMPはd-アンフェタミンを表し、略号d-MAMPはd-メタンフェタミンを表し、略号l-AMPはl-アンフェタミンを表し、略号l-MAMPはl-メタンフェタミンを表し、そして略号MDPAは3,4-メチレンジオキシ-N-プロピルアンフェタミンを表す。

30

【0058】

免疫原12(たとえば、TはKLHである)により惹起される抗体は、エクスタシー系ドラッグに対して良好な応答および特異性を示す。さらに、これらの抗体は、関連ドラッグに対してほとんどまたはまったく交差反応性を示さない。標準メタンフェタミンの結合の50%減少(ED_{50})を生じるドラッグ濃度を測定し、それぞれ他のドラッグの ED_{50} で割り、次に、その結果に100を掛けることにより、交差反応性パーセントを計算した。

40

【0059】

交差反応性パーセントはまた、本発明に係る抗体およびコンジュゲートを利用するイムノアッセイで測定することもできる。標準曲線は、既知量の標的アナライトMDMAまたはMDEAを用いて作成可能である。既知量の種々のアンフェタミン関連ドラッグをイムノアッセイでサンプルとして分析することができ、これらのドラッグの見掛けの濃度を標準曲線から求めることができる。ドラッグの見掛けの濃度を実際の濃度で割って100を掛けた値は、ドラッグの交差反応性パーセントに等しい。KIMS(溶液中の微粒子の速度論的相互作用)に基づくそのようなイムノアッセイについては、実施例20に記載されている。

【表 1】

表1. 種々のドラッグとのMDMA 2.1.1の交差反応性

ドラッグ	交差反応性%
MDMA	100
MDEA	204
MDA	60.6
MBDB	26.1
BDB	20.5
MDPA	365
d-AMP	0
d-MAMP	0.65
l-AMP	0
l-MAMP	0
セサミン	0
フェンテルミン	0
チラミン	0
プソイドエフェドリン	0
エフェドリン	0
フェニルプロパノールアミン	0
ノルエピネフリン	0
アドレナリン	0
ラニチジン	0

10

20

【0060】

上記の第2の系統の好ましい実施形態(すなわち、縮合メチレンジオキシフェニル環系が欠如している一連の化合物)に由来する免疫原は、エクスタシー系ドラッグ(たとえば、MDA、MDMA、MDEA、BDB、MBDB、およびそれらの組合せが挙げられるが、これらに限定されるものではない)に対する抗体を産生するのに有用である。この第2の系統に由来するN-エチル置換免疫原(すなわち、構造II中のR¹はエチルである)に反応して産生される抗体は、従来のアンフェタミンおよびメタンフェタミンのイムノアッセイでは一般に検出が不十分であるエクスタシー系ドラッグMDEAに対してとりわけ高い認識性を示す。このように産生された抗体は、既存のアンフェタミンまたはメタンフェタミンのアッセイにおける検出を増強するブースター抗体としてまたはMD系ドラッグ用のイムノアッセイにおけるMDEAに対する個別抗体として、用いることができる。

30

【0061】

表2、3、および4は、QがKLHである図2の免疫原26に反応して産生された抗体NEAMP 1.3、NEAMP 48.2、およびNEAMP 62.1の交差反応性データを示している。上述した手順により、標準としてMDEAを用いて、表2、3、および4に示される交差反応性パーセントを計算した。表2は、ELISAアッセイで生成された、NEAMP 1.3の交差反応性を示し、表3および4は、それぞれ、KIMSイムノアッセイ(ONLINE DAT II, Roche Diagnostics)におけるNEAMP 48.2およびNEAMP 62.1の交差反応性を示している。このデータの取得時に使用した抗体は、古典的免疫化プロトコルを用いて産生された。

40

【表 2】

表2. ELISAアッセイで生成された、種々のドラッグとのNEAMP 1.3の交差反応性

ドラッグ	交差反応性%
d-メタンフェタミン	19.7
d-アンフェタミン	6.4
l-アンフェタミン	6.6
MDMA	22.5
MDEA	100
MBDB	3.9
フェンジメトラジン	0.12
d-プソイドエフェドリン	0.4
l-エフェドリン	1.3
ラニチジン	0.04

10

【表 3】

表3. KIMSアッセイで生成された、種々のドラッグとのNEAMP 48.2の交差反応性

ドラッグ	交差反応性%
d-メタンフェタミン	8
l-メタンフェタミン	0.5
d-アンフェタミン	0
d-N-エチルアンフェタミン	130
MDMA	5
MDEA	100
MBDB	6
BDB	1
フェンジメトラジン	0.04
d-プソイドエフェドリン	0.06
l-エフェドリン	0

20

30

【表 4】

表4. KIMSアッセイで生成された、種々のドラッグとのNEAMP 62.1の交差反応性

ドラッグ	交差反応性%
d-メタンフェタミン	0.5
l-メタンフェタミン	0.2
d-アンフェタミン	1.1
d-N-エチルアンフェタミン	11
MDMA	4.0
MDEA	100
MBDB	13
BDB	46
フェンジメトラジン	0.1
d-プソイドエフェドリン	0.1
l-エフェドリン	0.0

40

【 0 0 6 2 】

N-エチル置換免疫原26(たとえば、QはKLHである)により惹起されるNEAMP 1.3抗体は、一般にエクスタシー系ドラッグに対して、とくにMDEAに対して、良好な応答、特異性、お

50

よび優先性を示す。

【0063】

N-エチル置換免疫原26(たとえば、QはKLHである)により惹起されるNEAMP 48.2抗体は、表3の定量的KIMSイムノアッセイにより示されるように、MDEAおよびN-エチルアンフェタミンに対して良好な応答および優先性を示す。抗体はまた、d-メタンフェタミンに対して5%超の交差反応性を有する。マウスハイブリドーマ細胞系NEAMP 48.2は、2003年6月26日にAmerican Type Culture Collection (ATCC, Manassas, VA)に寄託され、ATCC名称PTA-5295が割り当てられた。

【0064】

N-エチル置換免疫原26(たとえば、QはKLHである)により惹起されるNEAMP 62.1抗体は、表4の定量的KIMSイムノアッセイにより示されるように、MDEAに対して良好な応答および優先性を示し、BDBに対して良好な応答性を示す。抗体はまた、d-アンフェタミンに対して1%超の交差反応性を有する。マウスハイブリドーマ細胞系NEAMP 62.1は、2003年6月26日にAmerican Type Culture Collectionに寄託され、ATCC名称PTA-5294が割り当てられた。

10

【0065】

本発明を具現化した試薬キットは、本発明を具現化した抗体を含む。代表的な試薬キットは、エクスタシー系ドラッグに特異的な抗体、標識化部分に結合されたエクスタシー系ドラッグの類似体またはその誘導体を含む複合体を含みうる。また、場合により、既知量のエクスタシー系ドラッグまたは関連標準を含む1種以上の検量物質をも備えうる。

20

【0066】

本発明を具現化した抗体は、それを利用するための取扱い説明書と共に、キット、容器、バック、またはディスペンサー中に組み入れることができる。抗体がキット中に組み入れられて供給される場合、イムノアッセイのさまざまな成分を個別の容器にパッケージングし、使用前に混合することが可能である。そのように成分を個別にパッケージングすると、活性成分の機能を実質的に低下させることなく、長期間の保存が可能になるであろう。さらに、不活性環境下(たとえば、窒素ガス、アルゴンガスなどの正圧下)で試薬をパッケージングすることが可能であり、これは、空気および/または水分に敏感な試薬にとりわけ好ましい。

【0067】

本発明を具現化したキットに備えられる試薬は、さまざまな成分の活性が実質的に保持される状態で、しかも成分自体が容器の材料により実質的に吸着されたり改変されたりしない状態で、すべての方式の容器中に組み入れて供給することができる。好適な容器としては、アンプル、ボトル、試験管、バイアル、フラスコ、シリンジ、エンベロープ(たとえば、フォイルでライニングされたエンベロープ)などが挙げられるが、これらに限定されるものではない。容器は、任意の好適な材料で構成することが可能である。たとえば、ガラス、有機ポリマー(たとえば、ポリカーボネート、ポリスチレン、ポリエチレンなど)、セラミックス、金属(たとえば、アルミニウム)、金属合金(たとえば、スチール)、コルクなどで構成可能であるが、これらに限定されるものではない。このほか、容器は、セプタムにより提供されうるような滅菌アクセスポート(たとえば、ニードルによりアクセスするためのポート)を1つ以上備えうる。セプタムの好ましい材料としては、ゴムおよびDu Pont (Wilmington, DE)により商品名TEFLONとして販売されているタイプのポリテトラフルオロエチレンが挙げられる。このほか、容器は、成分を混合できるように取外し可能なパーティションまたはメンブレンにより仕切られた2つ以上のコンパートメントを備えうる。

30

40

【0068】

本発明を具現化した試薬キットにはまた、取扱い説明資料を添付することも可能である。取扱い説明書は、紙面上などに印刷されたものおよび/または電子可読媒体(たとえば、フロッピーディスク、CD-ROM、DVD-ROM、ジップディスク、ビデオテープ、オーディオテープなど)として供給されたものであってもよい。他の選択肢として、取扱い説明書は、

50

インターネットウェブサイト(たとえば、キットの製造業者または販売業者により指定されたサイト)にユーザーを案内することにより、および/または電子メールを介して、提供することも可能である。

【0069】

先に述べたように、本発明を具現化した試薬キットは、既知量の測定対象アナライトを含む検量物質および/または対照物質を備えうる。アナライトの濃度は、サンプルで得られた結果を標準で得られた結果と比較することにより計算することができる。検量線は、一連の結果を関連づけるために、およびサンプル中のアナライトの濃度を測定するために、作成し使用することができる。図4および5は、改良されたRoche ONLINE DAT II方式および試薬(すなわち、それぞれ、KIMS、ならびに抗体NEAMP 48.2およびNEAMP 62.1(すなわち、QがKLHである免疫原26から惹起された抗体))を用いてRoche/HITACHIアナライザー(Roche Diagnostics)により作成した検量線を示している。

10

【0070】

本発明を具現化したアナライトの検出方法は、本発明を具現化した抗体にサンプルを接触させることと、抗体をアナライトに結合させることと、抗体およびアナライトにより生成された複合体を検出することと、を含む。

【0071】

アナライト(たとえば、エクスタシー系ドラッグ)を含有すると推測されるサンプルはいずれも、本発明の好ましい実施形態の方法により分析することができる。サンプルは、所望により前処理することができ、アッセイを妨害しない任意の便利な媒質中に調製することができる。好ましくは、サンプルは、宿主に由来する体液のような水性媒質を含む。代表的な体液としては、尿、全血、血漿、血清、唾液、精液、糞便、痰、脳脊髄液、涙、粘液など、およびそれらの組合せが挙げられるが、これらに限定されるものではない。好ましくは、体液は、血漿、血清、または尿を含む。

20

【0072】

当然のことながら、抗体を固相に結合させたアッセイおよび抗体を液体媒質中に存在させたアッセイを含めて、抗体を利用するすべての方式のイムノアッセイが、本発明の好ましい実施形態に従って使用可能であると考えられる。本発明を具現化した抗体を用いてアナライトを検出するために使用することのできるイムノアッセイの方法としては、標識化アナライト(アナライト類似体)およびサンプル中のアナライトが抗体に対して競合する競合(試薬限定)アッセイ;抗体を標識化した単一部位イムノメトリックアッセイ;捕捉抗体(すなわち、固相に結合された抗体)が抗原の第1のエピトープに結合し、検出抗体(すなわち、標識抗体)が抗原-捕捉抗体複合体に結合する二部位イムノメトリック(試薬過剰)アッセイ;などが挙げられるが、これらに限定されるものではない。

30

【0073】

本発明において、用いられるアッセイ方法の1つは、溶液中の微粒子の速度論的相互作用(KIMS)に基づくイムノアッセイであるRoche ONLINE DAT II法であった。このアッセイでは、抗体をポリスチレン粒子上にコーティングし、本発明に記述した化合物の1つを高分子量担体にコンジュゲートさせる。エクスタシー系化合物の不在下では、抗体は、コンジュゲートに結合して粒子凝集を引き起こし、これにより、試薬の吸光度が変化する。エクスタシー系化合物の存在下では、コンジュゲートへの抗体の結合および対応する吸光度の変化は抑制される。粒子を凝集させることにより生じる吸光度の大きさは、サンプル中に存在する遊離ドラッグの量と関連づけることができる。

40

【0074】

種々のタイプのイムノアッセイを行う手順は、当技術分野で十分に確立されており、多くの専門書および刊行物、たとえば、"The Immunoassay Handbook(イムノアッセイ便覧)," 第2版, David Wild編, Nature Publishing Group, 2000に記載されている。これらの文献の全内容は、参照により本明細書に組み入れられるものとする。ただし、本出願と一致しない開示または定義である場合には、本明細書に記載の開示または定義が優先するものとする。

50

【0075】

本発明を具現化した抗体の産生方法は、本発明を具現化した免疫原を宿主に接種することを含む。好適な宿主としては、マウス、ラット、ハムスター、モルモット、ウサギ、ニワトリ、ロバ、ウマ、サル、チンパンジー、オランウータン、ゴリラ、ヒト、および成熟免疫応答を呈しうる任意の種が挙げられるが、これらに限定されるものではない。免疫化手順は、当技術分野で十分に確立されており、多くの専門書および刊行物、たとえば、先に引用した"The Immunoassay Handbook(イムノアッセイ便覧)," 第2版およびそこに引用されている参考文献に記載されている。

【0076】

好ましくは、本発明を具現化した免疫原は、アジュバントと組み合わせて、宿主被験体(たとえば、動物またはヒト)に投与される。好適なアジュバントとしては、フロイントアジュバント、粉末水酸化アルミニウム(ミョウバン)、*Bordetella pertussis*と組み合わせた水酸化アルミニウム、およびモノホスホリルリピドA-合成トレハロースジコリノミコレート(MPL-TDM))が挙げられるが、これらに限定されるものではない。

【0077】

ポリクローナル抗体は、場合によりアジュバントと共に投与することのできる免疫原を1回以上注射することにより、哺乳動物宿主中で産生させることができる。典型的には、免疫原または免疫原とアジュバントとの組合せは、1回もしくは複数回の皮下注射または腹腔内注射により、哺乳動物宿主に注入される。好ましくは、免疫化計画は、少なくとも1週間かけて、より好ましくは2週以上かけて行う。このようにして産生されたポリクローナル抗体は、当技術分野で周知の方法を利用して単離し精製することができる。

【0078】

モノクローナル抗体は、KohlerおよびMilsteinの十分に確立されたハイブリドーマ法(たとえば、*Nature* 256, pp. 495-497, 1975)により、産生することができる。ハイブリドーマ法は、典型的には、宿主または宿主に由来するリンパ球を免疫化することと、モノクローナル抗体を分泌するかまたはモノクローナル抗体を分泌する能力を有するリンパ球を採取することと、不死化細胞にリンパ球を融合させることと、所望のモノクローナル抗体を分泌する細胞の選択することと、を必要とする。

【0079】

宿主を免疫化することにより、免疫原に特異的な抗体を産生するかまたは産生しうるリンパ球を惹起することができる。他の選択肢として、リンパ球を*in vitro*で免疫化することも可能である。ヒト細胞が望ましい場合、末梢血リンパ球を用いることができるが、他の哺乳動物源に由来する脾臓細胞またはリンパ球が好ましい。

【0080】

リンパ球を不死化細胞系に融合させることにより、ハイブリドーマ細胞を形成することができる。このプロセスは、融合剤(たとえば、ポリエチレングリコール)を用いて容易に行うことができる。例示として、トランスフォーメーションにより不死化された突然変異型の齧歯動物、ウシ、またはヒトの骨髄腫細胞を用いることができる。非融合不死化細胞に対して実質的に純粋なハイブリドーマ細胞集団が好ましい。したがって、融合後、たとえば、酵素ヒポキサンチングアニンホスホリボシルトランスフェラーゼ(HGPRT)が欠如している突然変異骨髄腫細胞を使用することにより、非融合不死化細胞の増殖または生存を阻害する好適な培地中で、細胞を増殖させることができる。その場合、ヒポキサンチン、アミノプテリン、およびチミジンを、培地(HAT培地)に添加することにより、ハイブリドーマの増殖を可能にした状態で、HGPRT欠損細胞の増殖を防止することができる。

【0081】

好ましくは、不死化細胞は、効率的に融合し、HATのような培地中における選択により混合集団から単離することが可能であり、そして融合後、安定かつ高レベルの抗体発現を持続する。好ましい不死化細胞系としては、American Type Culture Collection, Manassas, VAから入手可能な骨髄腫細胞系が挙げられる。

【0082】

10

20

30

40

50

ハイブリドーマ細胞は典型的には細胞外に抗体を分泌するので、MD系アンフェタミン誘導体に特異的なモノクローナル抗体が培養培地に存在するかをアッセイすることができる。免疫沈降アッセイまたはin vitro結合アッセイ、たとえば、ラジオイムノアッセイ(RIA)、酵素結合イムノソルベントアッセイ(ELISA)を用いて、モノクローナル抗体の結合特異性を測定することができる。

【0083】

モノクローナル抗体を分泌するハイブリドーマ細胞は、限界希釈手順により単クローンとして単離し、継代培養することができる。好適な培養培地としては、Dulbecco改変Eagle培地、RPMI-1640、および無ポリペプチド培地、低ポリペプチド培地、または無血清培地、たとえば、Biowhittaker, Walkersville, MDから入手可能なUltra DOMA PFおよびHL-1が挙げられるが、これらに限定されるものではない。他の選択肢として、ハイブリドーマ細胞を腹水としてin vivoで増殖させることもできる。

【0084】

モノクローナル抗体は、従来の免疫グロブリン(Ig)精製手順により、たとえば、限定されるものではないが、ポリペプチドA-SEPHAROSE、ヒドロキシルアパタイトクロマトグラフィー、ゲル電気泳動、透析、硫酸沈澱、またアフィニティークロマトグラフィーにより、培養培地または腹水から単離および/または精製することができる。

【0085】

モノクローナル抗体はまた、米国特許第4,166,452号に記載されているような組換え法により産生することもできる。モノクローナル抗体をコードするDNAは、従来の手順を用いて、たとえば、マウス重鎖および軽鎖抗体遺伝子に特異的に結合するオリゴヌクレオチドプローブを用いて、好ましくは、エクスタシー系ドラッグに特異的な抗体を分泌するモノクローナル抗体ハイブリドーマ細胞系から単離されたDNAをプローブすべく、単離し配列決定することができる。単離されたDNA断片を発現ベクター中にサブクローニングし、次に、宿主細胞(たとえば、トランスフェクタントしなればIgポリペプチドを産生しないサルCOS-7細胞、チャイニーズハムスター卵巣(CHO)細胞、または骨髓腫細胞)中にトランスフェクトし、モノクローナル抗体を発現させることができる。単離されたDNA断片は、米国特許第4,816,567号に記載されているように相同マウス配列の代わりにヒト重鎖および軽鎖定常ドメインのコード配列を用いることにより、またはIgコード配列を非Igポリペプチドのコード配列の全部または一部分に融合させることにより、改変することができる。そのような非Igポリペプチドは、キメラ二価抗体を形成すべく、抗体の定常ドメインと置き換えることができるかまたは1つの抗原結合部位の可変ドメインと置き換えることができる。

【0086】

本発明を具現化した免疫原を調製するための、およびエクスタシー系ドラッグに対するハイブリドーマを産生するための、以下の代表的な手順は、例示として提供されているにすぎず、添付の請求項またはそれらの均等物の範囲を限定しようとするものではない。

【実施例】

【0087】

化学試薬は、別段の記載がないかぎり、Aldrich Chemical Co., Milwaukee, WI, USAから入手したものである。溶媒は、別段の記載がないかぎり、J.T. BakerまたはFisher Scientificのいずれかから入手したものであり、ACSもしくはHPLCグレードまたはそれ以上であった。塩化メチレン(CH_2Cl_2)は、水素化カルシウムを介して蒸留することにより乾燥させた。テトラヒドロフラン(THF)は、ナトリウムおよびベンゾフェノンを用いて蒸留することにより乾燥させた。無水ジメチルホルムアミド(DMF)は、密封SURESEALボトルに入った状態でAldrich Chemical Co.から入手した。カラムクロマトグラフィーは、E.M. Scienceフラッシュグレードシリカゲル(Cat. No. 9385-9, シリカゲル60, 230~400メッシュ ASTM)を用いて行った。薄層クロマトグラフィーは、E.M. Scienceから入手したシリカゲルプレート(Cat. No. 5715-7, 厚さ0.025cm)を用いて行った。「KPi」は、リン酸カリウム緩衝液を意味する。混合溶媒は、体積対体積百分率として表され、たとえば、10% MeOH

10

20

30

40

50

-CHCl₃またはCHCl₃中の10% MeOHは、体積基準で10%のメタノールを含有するクロロホルムを意味する。

【0088】

実施例1. MDA誘導体4の合成

塩化メチレン(CH₂Cl₂)中の700mgのメチレンジオキシアンフェタミン臭化水素酸塩の懸濁液/溶液を、飽和炭酸水素ナトリウム水溶液(NaHCO₃)と共に十分に振盪させた。層を分離させ、無視できる有機物質が抽出されるにすぎない状態になるまで追加のCH₂Cl₂で水相を繰り返し抽出した。合わせた有機層を減圧下でロータリーエバポレーター(rotovap)により蒸発乾固させ、高真空下でさらに短時間乾燥させ、408mgの遊離塩基のメチレンジオキシアンフェタミン2を油として得た。

10

【0089】

5mLの無水ジメチルホルムアミド(DMF)中の400mgの遊離塩基2の溶液に387μL(1.2モル当量)のエチル4-プロモブチレート(Fluka Chemical Co.)を添加し、アルゴン下、室温で、反応系を一晩攪拌した。反応混合物を20mLのCH₂Cl₂で希釈し、25mLの飽和NaHCO₃水溶液と共に攪拌し、層を分離させ、水相を50mLのCH₂Cl₂で抽出し、続いて50mLの酢酸エチル(EtOAc)で抽出し、有機抽出物を合わせ、硫酸ナトリウム(Na₂SO₄)で脱水し、減圧(rotovap)下で蒸発させ、高真空(マニホールド)下で残渣を乾燥させ、520mgの生成物4を得た。¹H-NMRにより、この生成物は、純度約90%であることがわかった。さらなる精製を行うことなく、この物質を次のステップで使用した。

【0090】

20

同様な反応系の抽出から水性クエンチ後に得られた物質の¹H-NMRにより、生成物4は、少量の二置換生成物と共に、HBr塩として存在することがわかった。シリカゲルクロマトグラフィー精製[第1のカラム、クロロホルム(CHCl₃)中の20%メタノール(MeOH)を溶出液とする;第2のカラム、EtOAc-MeOH-アセトン-水(6:1:1:1)を溶出液とする]により、純粋な生成物4を得た。質量スペクトルM-H, 292.

実施例2. 6の合成

アルゴン下、約0 (氷浴)に冷却された無水CH₂Cl₂中の500mgの粗製物4および950μL(4モル当量)のトリエチルアミンの溶液に、289μL(1.2モル当量)の無水トリフルオロ酢酸(TFAA)を添加した。攪拌しながら一晩かけて反応系を室温まで加温した。反応系を50mLの体積になるようにCH₂Cl₂で希釈し、水(2×50mL)、飽和NaHCO₃水溶液(2×50mL)、飽和塩化ナトリウム水溶液(NaCl, 1×50mL)で洗浄し、Na₂SO₄で脱水し、蒸発させ(rotovap)、高真空下で乾燥させ、約730mgの粗生成物を得た。物質をシリカゲルのクロマトグラフィーにかけてヘキサン中の30% EtOAcで溶出させ、淡色の液体として449mgの生成物6を得た。質量スペクトル(M+H): 実測値, 389.1449; 計算値, 389.1450.

30

実施例3. 8の合成

2mLのTHFおよび2mLの3N過塩素酸中の445mgの6の溶液を、アルゴン下、50 (油浴)で、4.5時間攪拌した。反応系を75mLの水中に注ぎ、混合物をEtOAc(2×50mL)で抽出し、有機抽出物を水で洗浄し、脱水し(Na₂SO₄)、蒸発させ(rotovap)、416mgの粗生成物を得た。物質をシリカゲルのクロマトグラフィーにかけてCH₂Cl₂中の5% MeOHで溶出させ、生成物を含有する画分を合わせ、蒸発させ(rotovap)、高真空下で乾燥させ、崩潰性フォームとして320mgの生成物8を得た。低分解能質量スペクトル(M+H): 実測値, 362.1. 高分解能質量スペクトル(M+Na): 実測値, 384.1024; 計算値, 384.1035.

40

実施例4. 10の合成

アルゴン下、20mLの無水CH₂Cl₂中の310mgの8の溶液を、296mg(3モル当量)のN-ヒドロキスクシンイミドで処理し、続いて329mg(2モル当量)の1-エチル-3-(3-ジメチルアミノプロピル)カルボジイミド塩酸塩(EDC·HCl, Sigma Chemical Co.)で処理し、室温で一晩攪拌した。反応系を水(1×20mL)、飽和NaHCO₃水溶液(2×20mL)、飽和NaCl水溶液(1×20mL)で洗浄し、脱水し(Na₂SO₄)、蒸発させた(rotovap)。残渣をシリカゲルのクロマトグラフィーにかけてヘキサン中の30% EtOAcで溶出させ、生成物画分を合わせ、蒸発させた(rotovap)。残渣を無水CH₂Cl₂に再溶解させ、次に、再蒸発させ(6回)、その後、高真空下で乾

50

燥させ、白色の/無色の崩潰性フォームとして280mgのNHSエステル誘導体10を得た。高分解能質量スペクトル(M+H): 実測値, 459.1381; 計算値, 459.1379.

実施例5. MDMA免疫原12(T=KLH, 12a)の合成

氷水浴で冷却された13mLの50mM KPi (pH7.5)中の220mgの精製キーホールリンペットヘモシアニン(KLH)の攪拌溶液に、4.33mLのジメチルスルホキシド(DMSO)を滴下し、25% DMSO-KPi中のKLHの溶液を得た。1.58mL(約20mgのタンパク質に相当する)を抜き取って対照として使用した。残りの部分に、合計1.5mLのDMSOに溶解させた26mgの10(KLH中、リシン1当量あたり約0.6当量)の溶液を添加し、10を約31% DMSO-KPi中のKLHと反応系させた。氷浴を取り除き、反応系(共栓フラスコ)を一晩攪拌した。オパール様の灰色の反応系を透析チューブ(15,000MWカットオフ; SpectraPor 7)に移し、逐次的に、30% DMSO-KPi/室温(3×1.1 L)、15% DMSO-KPi/室温、次に、KPi(1×2.2 L/室温、約4 以上; 5×2.2 L/約4)に対して透析した。KPiはすべて、50 mM KPi, pH 7.5であった。対照KLHもまた透析チューブ(15,000MWカットオフ; SpectraPor 7)に移し、30% DMSO-KPiに対して別に透析し、その後、15% DMSO-KPiに減少させるとき、免疫原と共に同一の透析容器に入れた。濃縮液の1mLを取り出して、リシン改変の度合を測定した。残りの部分を50mMのK₂CO₃(4×2.2 L/室温/2日間)に対して透析し、次に、KPi(4×2.2 L/約4)に対して透析した。室温で約7日間かけてpH13緩衝液(KOHでpH13に塩基性化された50mM K₂CO₃)に対して再透析し、続いて、50mM KPi pH7.5(3回交換)に対する透析に戻して、アミンの脱保護を終了することにより、ほとんど無色の清澄な溶液としてMDMA免疫原12(T=KLH, 12a)を得た。クーマシーブルータンパク質アッセイ(改変Bradfordアッセイ, Biorad Laboratories, Hercules, CA)により、タンパク質が1.9mg/mLであることがわかった。脱保護されていない免疫原のトリニトロペンゼンスルホン酸(TNBS)アッセイ(上記参照, クーマシーブルーアッセイによるタンパク質濃度測定の後)により、KLH上の利用可能なリシンの38%が改変されたことがわかった。

10

20

【0091】

実施例6. MDMAコンジュゲート12(T=BSA, 12b)の合成

氷水浴で冷却された11mLの50mM KPi, pH 7.5中の0.55gのウシ血清アルブミン(BSA, Pentex Fraction V, Miles Inc., Kankakee, IL)の攪拌溶液に、4.0mLのDMSOを滴下した。所望により、対照として使用するために、得られた約27% DMSO-KPi中のBSAの溶液から、約0.05gのBSAを含有する1.36mLを抜き取った。残りの溶液に、合計0.6mLのDMSOに溶解させた8.2mg(約2.4モル当量)の10を添加し、30% DMSO-KPi中の10およびBSAの混合物を得た。氷水浴を取り除き、共栓フラスコ中で反応系を一晩攪拌した。透明な反応系を透析チューブ(15,000MWカットオフ, SpectraPor 7)に移し、逐次的に、30% DMSO-KPi/室温(1.1L)、15% DMSO-KPi/室温(1.1L)、KPi/室温(1×1.1)、次に、50mM K₂CO₃(4×1.1 L/室温/2日間)、その後、KPi(4×2.2 L/約4)に対して透析した。KPiはすべて、50 mM KPi, pH 7.5であった。対照KLHもまた透析チューブ(15,000MWカットオフ, SpectraPor 7)に移し、30% DMSO-KPiに対して別に透析し、その後、15% DMSO-KPiに減少させるとき、免疫原と共に同一の透析容器に入れ、並行して処理を進めた。濃縮液の一部を分析したところ、タンパク質濃度は18.9mg/mLであり(クーマシーブルータンパク質アッセイ)、ハプテンによる置換は約1.6(BSA対照に対するUV差)まで進行したことがわかった。室温で約4日間かけてpH13緩衝液(KOHでpH13に塩基性化された50mM K₂CO₃)に対して再透析し、続いて、50mM KPi pH 7.5(4回交換)に対する透析に戻して、アミンの脱保護を終了することにより、無色の清澄な溶液としてMDMAコンジュゲート12(T=BSA, 12b)を得た。UV(コンジュゲートのOD₂₈₀を親のBSAのOD₂₈₀(=1mg/mLで0.6)とほぼ同一であるとみなした)によりタンパク質濃度を測定したところ、タンパク質は約1.9mg/mLであった。

30

40

【0092】

実施例7. N-エチルアンフェタミン16の合成

5.0gのd-アンフェタミンスルフェート(Sigma Chemical Co., St. Louis, MO)を100mLのCH₂Cl₂および30mLの1N NaOHで処理し、そして15分間激しく攪拌した。層を分離させ、水性部分を25mLのCH₂Cl₂で抽出した。有機性部分を合わせ、無水Na₂SO₄で脱水し、減圧下で濃縮させ、清澄な油として3.66gのd-アンフェタミン遊離塩基14を得た。これを30mLの無

50

水DMFに溶解させ、2.9gの臭化エチルで処理し、そして室温で3日間攪拌した。混合物を6.6gになるまで減圧下で濃縮し、次のステップで粗製物のまま使用した。生成物には、いくつかの出発物質と、カラムクロマトグラフィーにより精製するのが困難であるジエチル化副生物と、が含まれていた。

【0093】

実施例8. 18の合成

75mLの無水 CH_2Cl_2 中の6.6gの粗製N-エチルアンフェタミンの溶液を10mLのトリエチルアミンで処理した。混合物を氷浴で冷却させ、4.3mLの無水トリフルオロ酢酸で処理し、アルゴン下、室温で一晩攪拌した。混合物を減圧下で濃縮させた。残渣を75mLのEtOAcに溶解させ、3×25mLの飽和 NaHCO_3 、25mLの H_2O 、25mLの飽和ブラインで洗浄し、無水 Na_2SO_4 で脱水し、減圧下で濃縮させた。残渣を300gのシリカゲルのクロマトグラフィーにかけ、溶出液として30% EtOAc-ヘキサンを使用し、依然として前のステップに由来するいくつかのジエチル化副生物を含有する4.0gの清澄な油を得た。これを再び250gのシリカゲルのクロマトグラフィーにかけ、溶出液として5% EtOAc-ヘキサンを使用し、清澄な油として2.6gの18を得た。

10

【0094】

実施例9. 20の合成

アルゴン下の50mLの無水 CH_2Cl_2 中の2.0gの18の溶液を1.2gの無水コハク酸で処理した。混合物を氷浴で冷却させ、次に、4.0gの AlCl_3 を少しずつ添加して処理した。反応系を0で2時間攪拌し、次に、室温で一晩攪拌した。最初に、18mLの3N HCLを徐々に添加して混合物を処理し、次に、激しく30分間攪拌した。層を分離させ、有機層を25mLの H_2O および25mLの飽和ブラインで洗浄し、 Na_2SO_4 で脱水し、減圧下で濃縮し、琥珀色の油を得た。これを150gのシリカゲルのクロマトグラフィーにかけ、溶出液として3% MeOH- CH_2Cl_2 を使用し、琥珀色の油として2.6gの20を得た。

20

【0095】

実施例10. 22の合成

500mL Parrボトルに115mgの10% Pd/Cを仕込み、続いて、30mLの酢酸中の600mgの20の溶液を仕込み、そして50psiで17時間水素化した。Celite Corporationより商品名CELITEとして販売されている濾過材(Aldrich Chemical Company, Inc., Milwaukee, WIから入手可能)に通して触媒を濾別し、濾液を減圧下で濃縮させた。25mLのトルエンと共に5回蒸発させることにより、残留する酢酸を追い出した。 CH_2Cl_2 と共に5回蒸発させることにより、トルエンを追い出し、琥珀色の油として576mgの22を得た。

30

【0096】

実施例11. 24の合成

アルゴン下の25mLの無水 CH_2Cl_2 中の576mgの22の溶液を260mgのN-ヒドロキシスクシンイミドで処理し、続いて、435mgの1-エチル-3-(3-ジメチルアミノプロピル)カルボジイミドHClで処理し、そして室温で一晩攪拌した。混合物を25mLの0.1N HCL、25mLの H_2O 、2×25mLの飽和 NaHCO_3 、25mLの飽和ブラインで洗浄し、 Na_2SO_4 で脱水し、減圧下で濃縮させ、琥珀色の油として735mgの24を得た。

【0097】

40

実施例12. 32の合成

5mLの H_2O および10mLの蒸留THF中の108mgの4-(アミノメチル)安息香酸の混合物を、10mLの蒸留THF中の315mgの24の溶液で処理し、続いて、1.2mLの1N NaOHで処理し、そして室温で1時間攪拌した。反応系のpHは9であった。THFを減圧下で除去し、水性残渣を5mLの H_2O で希釈し、6N HCLでpH6に酸性化した。これを2×15mLのEtOAcで抽出した。EtOAc抽出物を合わせ、無水 Na_2SO_4 で脱水し、真空中で濃縮し、白色のアモルファス固体として290mgの32を得た。

【0098】

実施例13. 34の合成

アルゴン下の10mLの無水 CH_2Cl_2 中の270mgの32の溶液を85mgのN-ヒドロキシスクシンイ

50

ミドで処理し、続いて、140mgの1-エチル-3-(3-ジメチルアミノプロピル)カルボジイミドHClで処理し、そして室温で一晩攪拌した。混合物を10mLのCH₂Cl₂で希釈し、10mLの0.1N HCL、10mLの飽和ブライン、2×10mLの飽和NaHCO₃、10mLの飽和ブラインで洗浄し、Na₂SO₄で脱水し、減圧下で濃縮させ、白色のアモルファス固体を得た。これを80gのシリカゲルのクロマトグラフィーにかけ、EtOAcを溶出液として使用し、白色のアモルファス固体として190mgの34を得た。

【0099】

実施例14. N-エチルアンフェタミン免疫原26(Q=KLH, 26a)の合成

10mLの50mM KPi, pH 7.5中の342mgの精製KLHの溶液を氷浴で冷却させ、4mLのDMSOを滴下して処理した。1.7mLを取り出し、これを参照として使用した。この結果、溶解状態で300mgのKLHが残った。次に、これに1.0mLのDMSO中の50mgの24の溶液を滴下して処理した。反応系を室温で一晩攪拌した。反応系および参照サンプルを別々の10,000MWカットオフ透析チューブ(SpectraPor 7)に入れ、1リットルの33% DMSO-50mM KPi, pH7.5中で透析した。この透析は、室温、3回交換、各回少なくとも3時間、最後は一晩の条件で行った。次に、1リットルの20% DMSO、1リットルの10% DMSO、1リットルの100% KPi, pH 7.5のステップダウングラジエントを用いて、室温で、それぞれ少なくとも3時間かけて、これを透析した。次に、バッグを1リットルの50mM K₂CO₃, pH 11.4に入れ、40 で4日間透析した(2日目に1回交換)。次に、これを1リットルの50mM KPi, pH 7.5中で透析した。この透析は、4、6回交換、各回少なくとも6時間の条件で行った。クーマシーブルータンパク質アッセイ(改変Bradfordアッセイ, Biorad Chemical Co.)により、タンパク質濃度が8.16mg/mLであることがわかった。保護サンプルのトリニトロベンゼンスルホン酸(TNBS)アッセイにより、利用可能なリシンの41.4%が改変されたことがわかった。

【0100】

実施例15. N-エチルアンフェタミンコンジュゲート26(Q=BSA, 26b)の合成

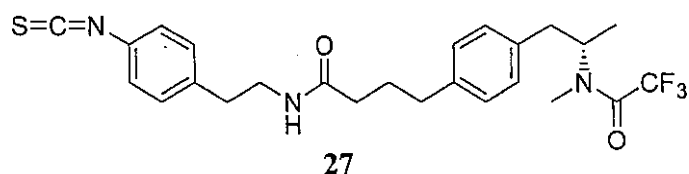
8mLの50mM KPi, pH 7.5中の500mLのウシ血清アルブミン(BSA, Cohn Fraction V modified powder, Intergen Company, Purchase, NY)の溶液を氷浴で冷却させ、11mLのDMSOを徐々に滴下して処理した。次に、これに1mLのDMSO中の6.7mgの24の溶液を滴下して処理し、室温で一晩攪拌した。混合物を10,000MWカットオフ透析チューブ(SpectraPor 7)に入れ、1リットルの60% DMSO-50mM KPi, pH7.5中で透析した。この透析は、室温、3回交換、各回少なくとも3時間、最後は一晩の条件で行った。次に、1リットルの40% DMSO、1リットルの20% DMSO、1リットルの10% DMSO、および1リットルの100% 50mM KPi, pH 7.5のステップダウングラジエントを用いて、室温で、それぞれ少なくとも3時間かけて、これを透析した。次に、これを1リットルの50mM K₂CO₃ (KOHでpH13に調整した)中で4日間透析した。この際、緩衝液を4回交換した。次に、これを1リットルの50mM KPi, pH 7.5中で透析した。この透析は、4、6回交換、各回少なくとも6時間の条件で行った。クーマシーブルータンパク質アッセイにより、タンパク質濃度が12.2mg/mLであることがわかった。

【0101】

実施例16. メタンフェタミン-BSAコンジュゲート28の合成

出発物質としてd-メタンフェタミン(遊離塩基)を使用したことおよび溶媒として塩化メチレンを用いて第1のステップを行ったこと以外は米国特許第5,501,987号(実施例1)に記載されているアンフェタミン標識類似体のときと同じようにして、前駆体誘導体27を生成させた。

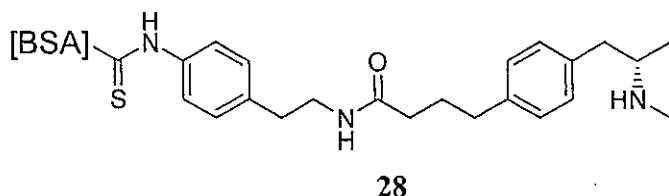
【化6】



【0102】

次に、pHを調整することなく50mM K_2CO_3 に対する透析を行ったこと以外は実施例15に記載したのと同じようにして27をウシ血清アルブミンと反応させることにより、メタンフェタミン-BSAコンジュゲート28を生成させた。最後に回収した濃縮液のクーマシーブルータンパク質アッセイにより、タンパク質濃度が11.6mg/mLであることがわかった。

【化7】



10

【0103】

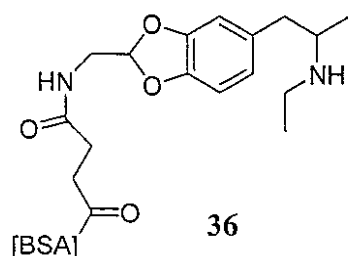
実施例17. MDEA-BSAコンジュゲート36の合成

本出願と同時に提出された同時係属の同一譲受人の米国特許出願第10/087,469号、公開第2003/0175995号の記載に従って、MDEA-BSAコンジュゲート36を合成した。6.7mLの50mMリン酸カリウム(pH7.5)中の500mgのウシ血清アルブミン(BSA)の溶液を氷浴で冷却させた。溶液に8.5mLのDMSOを滴下し、反応混合物を室温未満に保持した。タンパク質溶液に、1.5mLの無水DMF中の12mg(0.022mmol)のN-(5-{2-[エチル-(2,2,2-トリフルオロ-アセチル)-アミノ]-プロピル}-ベンゾ[1,3]ジオキサソール-2-イルメチル)-スクシンアミド酸2,5-ジオキソ-ピロリジン-1-イルエステルの溶液を滴下した。反応混合物を室温で48時間攪拌した。得られたコンジュゲートを透析チューブ(10,000MWカットオフ)に入れ、室温において、50mMリン酸カリウム中の1Lの70% DMSO(pH 7.5, 3回交換, 各回少なくとも3時間)、50mMリン酸カリウム中の1Lの50% DMSO(少なくとも3時間)、50mMリン酸カリウム中の1Lの30% DMSO(少なくとも3時間)、50mMリン酸カリウム中の1Lの10% DMSO(少なくとも3時間)中で透析した。得られたコンジュゲートを10%水酸化アンモニウム(約24時間ごとに1Lずつ)に対して3日間透析し、続いて、4において50mMリン酸カリウム(pH7.5)で6回交換(各1L)して透析することにより、コンジュゲートのトリフルオロアセトアミド基を脱保護した。BioRadクーマシーブルータンパク質アッセイ(Bradford, M., Anal. Biochem. 72:248, 1976)を用いてタンパク質濃度を測定したところ、7.12mg/mLであった。合計45mLのコンジュゲートを得た。

20

30

【化8】



40

【0104】

実施例18. MDMA免疫原12aを用いるエクスタシー系ドラッグに対するハイブリドーマの産生 免疫化

18~24週齢のBALB/c雌マウスを12(T=KLH, 12a)で免疫化した。免疫原をフロイントアジュバント中に乳化させ、腹腔内(IP)注射により投与した。注射剤は、21日間以上の間隔で投与され、典型的には、100 μ Lの50%生理食塩水/50%アジュバント乳濁液中に50 μ gのコンジュゲートを含むものであった。完全フロイントアジュバントを一次免疫化に使用し、その後、不完全フロイントアジュバントを使用した。同一乳濁液中の50 μ gの追加免疫化を融合の4日前に腹腔内に行った。

50

。次に、プレートを0.15M Tris, pH7.2~7.4中の2%スクロース溶液で短時間満たし、次に、空にして室温で空気乾燥させた。乾燥後、いくつかの乾燥剤ピローの入ったZIPL0C(Dow Chemical Co.)プラスチックバッグ中にプレートを詰め込み、密封し、使用時まで4 で保存した。

【0110】

一次融合スクリーニング

融合プレートの増殖中のクローンを一次スクリーニングするために、MDMA-BSA 12(T=BSA, 12b)がコーティングされたプレートだけを使用した。50 μ LのPBSを各ウェルに添加し、続いて、融合プレート上のウェルの培養培地のサンプル50 μ Lを添加し、そしてPBSで1:10に希釈した。プレートを37 でカバーをかけた状態で1時間インキュベートし、次に、PBS-TWEEN(0.1%)で洗浄した。次に、ウェルを100 μ Lのヤギ抗マウスIgG-HRPコンジュゲート(Zymed Labs)で満たし、PBS-TWEENで希釈し、再びプレートを1時間インキュベートした。次に、プレートを再び洗浄し、100 μ LのK-Blue 基質(Neogen Corp.)を添加した。これを5~15分間発色させてから、100 μ Lの1N HCLを添加することにより反応を停止させた。色をマイクロプレートリーダーにより450nmで読み取り、コンピュータにより収集し、分析に付した。MDMA-BSA 12(T=BSA, 12b)に結合する抗体の存在を示したウェルを選択し、さらなる処理に付した。細胞を限界希釈サブクロニングに付し、増殖が観察された時点で、二次スクリーニングにより試験した。

【0111】

二次スクリーニング

1枚目のプレートのウェルにリン酸塩緩衝生理食塩水(PBS) 50 μ Lを、2枚目のプレートに遊離MDMA(800ng/mL)の溶液50 μ Lを、第3枚目のプレートにMDEA(800ng/mL)の溶液50 μ Lを、4枚目のプレートにブソイドエフェドリン(8 μ g/mL)の溶液50 μ Lを添加することにより、MDMA-BSAコンジュゲート12(T=BSA, 12b)でコーティングされた4枚のプレートを準備した。ドラッグはすべて、PBSに溶解させた。MAMP-BSA(28)およびAMP-BSA(30)でコーティングされたウェルに、50 μ LのPBSを添加した。

【0112】

増殖中のサブクローンが試験可能な状態にあると判断された時点で、各ウェルから25 μ Lの上清を採取し、96ウェルフレキシブルプレートに移した。1:10希釈の培地サンプルになるように、各ウェルに培養培地を添加した。コーティングされた上記の各プレートに50 μ Lの希釈サンプルを移した。後続の処理は、一次スクリーニングのときとまったく同じであった。選択の判定基準は、MDMA-BSAコンジュゲート12(T=BSA, 12b)に結合すること、遊離MDMAおよび/またはMDEAによる阻害が現れること、ならびにブソイドエフェドリンによる阻害がほとんどまたはまったくないことである。AMP-BSA(30)およびMAMP-BSA(28)コンジュゲートへの結合は、参照としてのみ用いた。

【0113】

選択されたクローンを直ちにサブクロニングし、準備完了時、二次スクリーニング手順により再試験した。安定なサブクローンを増殖させ、凍結処理し、この処理済み培地を用いて交差反応性アッセイにより特異性を測定した。

【0114】

交差反応性アッセイ

上清を段階希釈に付し、上記のELISAスクリーニングにより再試験した。最大ODよりも約50%少ないODを与える希釈度を選択し、交差反応性試験に移行した。これは、選択された希釈度で抗体を使用して種々の濃度のドラッグの存在下で先のアッセイを繰り返すことから構成されたものであった。

【0115】

実施例 19. N-エチルアンフェタミン免疫原26を用いるエクスタシー系ドラッグ対するハイブリドーマの産生

免疫化

NEAMP 1.3の産生： 18~24週齢のSJL雌マウスを改変RIMMS法(Kilpatrick et al., Hybr

10

20

30

40

50

idoma 16:4, pp. 381-389, 1997)により免疫化した。QがKLHである免疫原26(Q=KLH, 26a)を不完全フロイントアジュバント中に乳化させ、頸の頂部ならびに両側の腓腹部および単径部に分布する6部位に皮下注射により投与した。注射は、0日目、3日目、6日目、および11日目に行った。それぞれの投与量は、全量で50 μ g、25 μ g、12 μ g、および6 μ gであった。

【0116】

NEAMP 48.2およびNEAMP 62.1の産生：初回注射用として完全フロイントアジュバント中に乳化された免疫原26、および後続の注射用として不完全フロイントアジュバント中に乳化された免疫原26により、18~24週齢のBALB/c雌マウスを免疫化した。初回免疫化を25 μ gの免疫原を用いて皮下に行った。30日後、同一の用量および経路の注射を繰り返した。2回目の免疫化の97日後、3回目を行った。このときの用量は、腹腔内注射で100 μ gであった。約11ヵ月後、3回目と同一の用量および経路の最終免疫化を行い、4日後、動物を融合に使用した。

10

【0117】

融合

最終免疫化の4日後、全採血によりマウスを屠殺した。膝窩、単径、鎖骨下、および深単径のリンパ節を採取し、プールした。これらのリンパ節を2枚の滅菌ガラススライド間ですり潰してリンパ球を放出させた。NEAMP 1.3の産生のために、得られたリンパ球懸濁液の半分をF0骨髄腫細胞系との融合のために使用した。残りの半分をP3骨髄腫と融合させた。(骨髄腫は両方とも、ATCCから入手した)。NEAMP 48.2およびNEAMP 62.1では、F0骨髄腫細胞系だけを使用した。

20

【0118】

融合は、骨髄腫細胞(リンパ球の数の1/5)の添加、遠心による洗浄、無血清加温 Iscove 改変 Dulbecco 培地中への再懸濁、および再遠心からなるものであった。得られたペレットが入っている遠心管を軽く叩いて細胞をほぐし、次に、1mLの加温されたPEG/DMSO溶液(Sigma Chemical Co.)を、穏やかに混合しながら徐々に添加した。細胞を加温した状態に1.5分間保持し、その後、予備加温した無血清 INMM を次の速度：1mL/分、2mL/分、4mL/分、および10mL/分で添加した。次に、チューブを50mLまで満たし、密封し、そして15分間インキュベートした。細胞懸濁液を遠心し、上清をデカントし、10%ウシ胎仔血清を含有するIMDMを添加した。細胞をもう一度遠心し、完全クローニング培地中に再懸濁させた。これは、IMDM、10% FCS、10% Condimed H1(Roche Molecular Systems, Pleasanton, CA)、4mM グルタミン、50 μ M 2-メルカプトエタノール、40 μ M エタノールアミン、およびペニシリン/ストレプトマイシン抗生物質を含有していた。細胞を4 \times 10⁵リンパ球/mLの密度で懸濁させ、滅菌96ウェルマイクロ培養プレート中に100 μ L/ウェルになるように分注し、5% CO₂中、37 $^{\circ}$ Cで、24時間インキュベートした。翌日、100 μ LのHMT選択培地(クローニング培地+1:25 HMTサプリメント(Sigma Chemicals製))を添加した。インキュベーションの6日目、低真空源に連結された滅菌8分岐マニホールドを用いて、各ウェルから約150 μ Lの培地を抜き取った。次に、150 μ LのHT培地を添加した。これは、クローニング培地+1:50 HTサプリメントを含んでいた(Sigma Chemical Co.)。プレートをインキュベーターに戻し、増殖の徴候を毎日調べた。増殖が十分であると判断されたとき、ELISAにより抗体産生に関してウェルをスクリーニングした。

30

40

【0119】

ELISAスクリーニング

0.1M炭酸塩緩衝液(pH9.5)中1 μ g/mL、1時間、37 $^{\circ}$ Cの条件(加湿状態)で、マイクロプレートに100 μ Lのメタンフェタミン-BSAコンジュゲート28(NEAMP 1.3のスクリーニング用)または100 μ LのMDEA-BSAコンジュゲート36(NEAMP 48.2およびNEAMP 62.1のスクリーニング用)をコーティングし、別のマイクロプレートに100 μ LのN-エチルアンフェタミン-BSA 26(Q=BSA, 26b)をコーティングした。次に、プレートを空にし、Tris緩衝液、1%ゼラチン加水分解物、2%スクロース、および0.17% TWEEN 20を含有するポストコート溶液で満たした(試薬はすべて、Sigma Chemical Co.から入手したものであった)。プレートを37 $^{\circ}$ Cでさ

50

らに1時間インキュベートし(加湿状態)、その後、0.1% TWEEN 20を含有するリン酸塩緩衝生理食塩水で洗浄した。次に、プレートを0.15M Tris, pH7.2~7.4中の2%スクロース溶液で短時間満たし、次に、空にして室温で空気乾燥させた。乾燥後、いくつかの乾燥剤ピローの入ったZIPLOCバッグ中にプレートを詰め込み、密封し、使用時まで4 で保存した。

【0120】

増殖中のクローンが試験可能な状態にあると判断された時点で、ウェルから25 μ Lの上清を採取し、96ウェルフレキシブルプレートに移した。1:10希釈の培地サンプルになるように、各ウェルに培養培地を添加した。コーティングされた上記の各プレートに100 μ Lの希釈サンプルを移した。プレートを37 でカバーをかけた状態で1時間インキュベートし、次に、PBS-TWEENで洗浄した。次に、ウェルをPBS-TWEENで希釈した100 μ Lのヤギ抗マウスIgG-HRPコンジュゲート(Zymed Labs)で満たし、再びプレートを1時間インキュベートした。次に、プレートを再び洗浄し、100 μ LのK Blue 基質(Neogen Corp)を添加した。これを5~15分間発色させてから、100 μ Lの1N HCLを添加することにより反応を停止させた。色をマイクロプレートリーダーにより450nmで読み取り、コンピュータにより収集し、分析に付した。選択の判定基準は、メタンフェタミン-BSAコンジュゲート28(NEAMP 1.3の選択用)またはMDEA-BSAコンジュゲート36(NEAMP 48.2およびNEAMP 62.1のスクリーニング用)に結合することであった。選択されたクローンを直ちにサブクロニングし、準備完了時、再試験した。安定なサブクローンを増殖させ、凍結処理し、この処理済み培地を用いて交差反応性アッセイにより特異性を測定した。

10

【0121】

交差反応性アッセイ

上清を段階希釈に付し、上記のELISAスクリーニングにより再試験した。最大ODよりも約50%少ないODを与える希釈度を選択し、交差反応性試験に移行した。これは、選択された希釈度で抗体を使用して種々の濃度のドラッグの存在下で先のアッセイを繰り返すことから構成されたものであった。図4および5に示されるグラフは、そのような測定の結果を表しており、一方、表2(上記参照)は、測定された交差反応性パーセントを示している。

20

【0122】

実施例20. HITACHI臨床化学アナライザーを用いる本発明に係る抗体およびコンジュゲートによるONLINE DAT II-type assay (KIMS)

NEAMP 48.2微粒子試薬の調製

100mLの50 μ g/mL NEAMP 48.2抗体を、50mM MES緩衝液(pH6.5)中の100mLの1% 0.201 μ mラテックス粒子と共に室温で一晩インキュベートした。50mM MES緩衝液(pH6.5)中の10mLの100mg/mL BSAで粒子を2時間ブロックした。接線流動濾過系を用いてラテックスを50mM MOPS緩衝液(pH7.1)で洗浄した。

30

【0123】

アミノデキストランへのN-エチルアンフェタミンのコンジュゲーション

90mgのアミノデキストラン(Ghoshal et al., Publ. No. US 2003/0060431 A1, page 12, paragraphs 147-152, March 27, 2003.)を5mL DMSOに溶解させた。10mgの24を1mL DMSOに溶解させ、ポリマー担体の溶液に滴下し、そして室温で一晩攪拌した。混合物を10,000 MWカットオフ透析チューブ(SNAKESKIN, Pierce)に入れ、室温において1リットルの80% DM 40
SO中で一晩透析した。次に、1リットルの60% DMSO、1リットルの40% DMSO、1リットルの20% DMSO、および4リットルの脱イオン水のステップダウングラジエントを用いて、室温で、それぞれ少なくとも3時間かけて、これを透析した。次に、KOHでpH13に調整した1リットルの100mM K₂CO₃で、これを4日間透析した。この際、緩衝液を4回交換した。最終透析ステップは、4リットルの脱イオン水、2日間、4回交換で行った。次に、コンジュゲートを凍結乾燥させた。

【0124】

試薬の調製

試薬R2は、微粒子試薬(pH7.1)であり、以下の組成を有していた。

【表 5】

抗体でコーティングされた微粒子	固形分0.1%
3-メルホリノプロパンスルホン酸	25mM
3-メルホリノプロパンスルホン酸ナトリウム塩	25mM
BSA	0.1% (w/v)
ナトリウムアジド	0.09% (w/v)

【0125】

試薬R1は、コンジュゲート試薬(pH7.1)であり、以下の組成を有していた。

10

【表 6】

N-エチルアンフェタミンコンジュゲート	0.125 μ g/mL
ピペラジン-1,4-ビス(2-エタンスルホン酸)ジナトリウム塩	144mM
ピペラジン-1,4-ビス(2-エタンスルホン酸)	31mM
BSA	0.1% (w/v)
ナトリウムアジド	0.09% (w/v)
ポリアクリル酸	1.5% (w/v)

【0126】

20

アッセイプロトコール

HITACHI 917アナライザー (Roche Diagnostics)を用いてアッセイを行った。10 μ Lのサンプルをキュベット中にピペットで添加し、その直後、180 μ Lのコンジュゲート試薬(R1)を添加した。混合物を約90秒間インキュベートし、80 μ Lの微粒子試薬(R2)をキュベットに添加した。反応混合物を37 $^{\circ}$ Cで約8分間インキュベートし、その間、粒子凝集反応を505 nmでモニターした。R2添加後の2ポイントエンド測定に基づいて、標準曲線を作成した。

【0127】

結果

ONLINE DAT II-type assay (KIMS)におけるNEAMP 48.2抗体およびNEAMP 62.1抗体の交差反応性を、それぞれ表3および4に示す。NEAMP 48.2およびNEAMP 62.1の標準曲線を図4および5に示す。

30

【0128】

以上の詳細な説明および実施例は、解説および例示のために提供されたものであり、添付の特許請求の範囲を限定することを意図したものではない。本明細書に例示されている本発明の好ましい実施形態の多くの変形例が、当業者には自明であろう。これらは、添付の請求項およびその均等物の範囲内にある。

【図面の簡単な説明】

【0129】

【図1】本発明を具現化した化合物および免疫原を合成する第1の代表的なスキームを示している。

40

【図2】本発明を具現化した化合物および免疫原を合成する第2の代表的なスキームを示している。

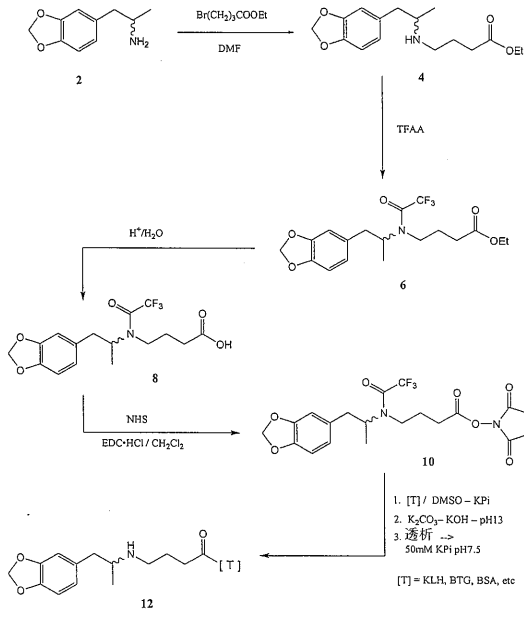
【図3】本発明を具現化した化合物を合成する第3の代表的なスキームを示している。

【図4】KIMSイムノアッセイ法および抗体MDMA 2.1.1(すなわち、TがKLHである免疫原12から産生された抗体)を用いて作成された検量線を示している。

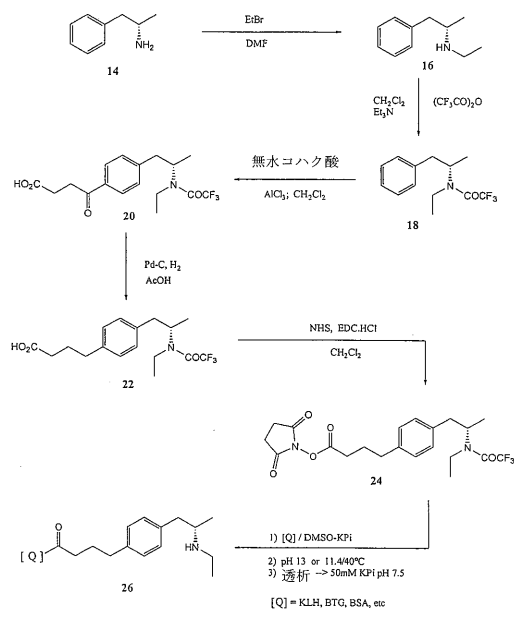
【図5】KIMSイムノアッセイ法および抗体NEAMP 48.2(すなわち、QがKLHである免疫原26から産生された抗体)を用いて作成された検量線を示している。

【図6】KIMSイムノアッセイ法および抗体NEAMP 62.1(すなわち、QがKLHである免疫原26から産生された抗体)を用いて作成された検量線を示している。

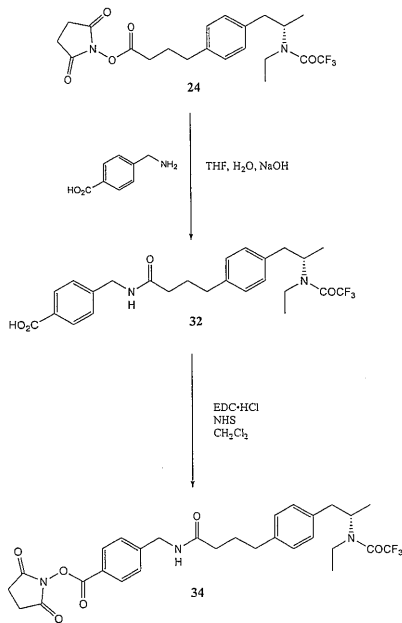
【 図 1 】



【 図 2 】

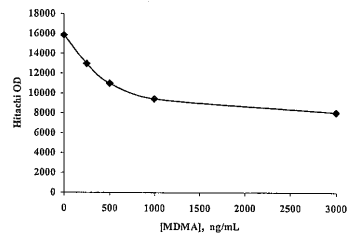


【 図 3 】



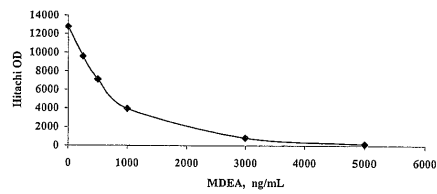
【 図 4 】

抗体MDMA 2.1.1を用いた検量線



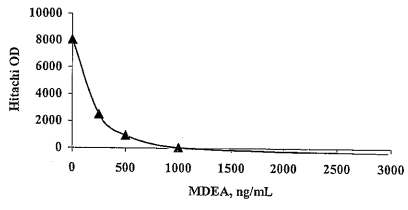
【 図 5 】

抗体NEAMP 48.2を用いた検量線



【 図 6 】

抗体 NEAMP 62.1 を用いた検量線



フロントページの続き

- (72)発明者 レイモンド エイ．ヒュイ
アメリカ合衆国 4 6 2 5 0 インディアナ州，インディアナポリス，カンクスホルム ドライブ
9 3 4 6 ，アパートメント ビー．
- (72)発明者 リチャード ティー．ルート
アメリカ合衆国 4 6 0 3 8 インディアナ州，フィッシャーズ，ヒッコリー ウッズ ドライブ
7 4 8 4
- (72)発明者 スティーブン エス．ヴィトン
アメリカ合衆国 4 6 0 6 0 インディアナ州，ノブレスヴィル，パークシャー レーン 2 0 9
- (72)発明者 イリーナ バブリナ
アメリカ合衆国 4 6 0 3 2 インディアナ州，カーメル，パーキンス ストリート 1 1 5 5 8
- (72)発明者 シェリ ジョーダン
アメリカ合衆国 4 6 0 3 8 インディアナ州，フィッシャーズ，キーリー コート 1 2 4 9 9
- F ターム(参考) 4B064 AG27 CA10 CA20 CC24 DA13
4B065 AA92X AB05 BA08 CA25 CA46
4H045 AA11 AA20 AA30 BA10 DA76 EA50 FA72

【外国語明細書】

2005041872000001.pdf

专利名称(译)	用于检测摇头丸型分析物的抗体		
公开(公告)号	JP2005041872A	公开(公告)日	2005-02-17
申请号	JP2004207719	申请日	2004-07-14
申请(专利权)人(译)	F.霍夫曼 - 罗氏公司		
[标]发明人	レイモンドエイヒュイ リチャードティールート スティーブンエスヴィトン イリーナバブリナ シェリジョーダン		
发明人	レイモンド エイ.ヒュイ リチャード ティー.ルート スティーブン エス.ヴィトン イリーナ バブリナ シェリ ジョーダン		
IPC分类号	G01N33/53 C07C233/47 C07C237/22 C07D207/404 C07D207/46 C07K14/435 C07K14/76 C07K14/795 C07K16/44 C12N5/10 C12P21/08 G01N33/577 G01N33/94		
CPC分类号	C07C233/47 C07D207/46 C07K16/44 G01N33/946		
FI分类号	C07K16/44 G01N33/53.G G01N33/577.B C12N5/00.B C12P21/08 C12N5/00.102 C12N5/20		
F-TERM分类号	4B064/AG27 4B064/CA10 4B064/CA20 4B064/CC24 4B064/DA13 4B065/AA92X 4B065/AB05 4B065/BA08 4B065/CA25 4B065/CA46 4H045/AA11 4H045/AA20 4H045/AA30 4H045/BA10 4H045/DA76 4H045/EA50 4H045/FA72		
代理人(译)	藤井 爱		
优先权	10/622524 2003-07-18 US		
其他公开文献	JP4236617B2		
外部链接	Espacenet		

摘要(译)

需要解决的问题：消除在常规免疫测定中使用安非他明和/或甲基安非他明检测亚甲二氧基或摇头丸药物成员的问题。解决方案：提供了一种化合物，例如半抗原，中间体和免疫原，其可用于产生对基于亚甲二氧基的苯丙胺衍生物特异的抗体。此外，对亚甲二氧基苯丙胺衍生物具有特异性的抗体，含有对亚甲二氧基苯丙胺衍生物特异的抗体的试剂盒，制备对亚甲二氧基苯丙胺衍生物特异的抗体的方法，以及检测分析物的方法包括亚甲二氧基苯丙胺衍生物的成员，分别提供。Z

本發明を具現化し
【化2】

