

(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2005-506520

(P2005-506520A)

(43) 公表日 平成17年3月3日(2005.3.3)

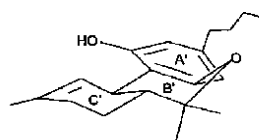
(51) Int. Cl. ⁷	F I	テーマコード (参考)
GO 1 N 33/53	GO 1 N 33/53	2 G O 4 5
CO 7 D 311/80	CO 7 D 311/80	2 G O 5 4
GO 1 N 21/78	GO 1 N 21/78	4 C O 6 2
GO 1 N 33/50	GO 1 N 33/50	
GO 1 N 33/533	GO 1 N 33/533	
審査請求 未請求 予備審査請求 有 (全 54 頁) 最終頁に続く		

(21) 出願番号	特願2002-572424 (P2002-572424)	(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 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
(86) (22) 出願日	平成14年2月28日 (2002.2.28)	(74) 代理人	100068526 弁理士 田村 恭生
(85) 翻訳文提出日	平成15年9月12日 (2003.9.12)	(74) 代理人	100096079 弁理士 大角 美佐子
(86) 国際出願番号	PCT/US2002/006401	(74) 代理人	100126778 弁理士 品川 永敏
(87) 国際公開番号	W02002/073214	(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 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
(87) 国際公開日	平成14年9月19日 (2002.9.19)		最終頁に続く
(31) 優先権主張番号	09/805,469		
(32) 優先日	平成13年3月12日 (2001.3.12)		
(33) 優先権主張国	米国 (US)		

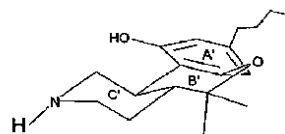
(54) 【発明の名称】 新規カンナビノイド検出用試薬

(57) 【要約】

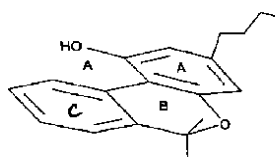
生物学的試料中のカンナビノイドを検出する免疫測定法における使用に適した新規カンナビノール-ベースのトレーサーが本明細書に開示されている。これらのカンナビノール-ベースのトレーサーは特に連続流動置換免疫測定法に有用である。本明細書はまた新規トレーサーの合成法および、生物学的試料中のカンナビノイドの定性および定量のための蛍光免疫測定法におけるこれらのトレーサーの使用を記載している。



Δ⁹-THC



THC Analog



Cannabinol

【特許請求の範囲】

【請求項 1】

カンナビノール分子またはその誘導体；
カンナビノール分子またはその誘導体と結合している標識
を含む合成トレーサー。

【請求項 2】

標識が、カンナビノール分子またはその誘導体と、1、2、3、4、8、9および10位
からなる群から選ばれる位置で結合している、請求項1記載の合成トレーサー。

【請求項 3】

標識が、フルオロフォア (fluorophore)、発色団、ハプテン、放射性標識、金属性コロイ
ド、酵素、化学ルミネセンス分子および生物発光分子からなる群から選ばれる、請求項
2記載の合成トレーサー。

10

【請求項 4】

フルオロフォアが、FIG. 8 に示される蛍光染料であり、
(a) m が、0、1、2、3および4からなる群から選ばれる整数であり；および
(b) Y が、スクシニミジル活性エステル (OSu) およびエチレンジアミン (EDA) からなる
群から選ばれる化合物である、
請求項3記載の合成トレーサー。

【請求項 5】

フルオロフォアが、FIG. 9 [式中、 Y はスクシニミジル活性エステル (OSu) およびエチレ
ンジアミン (EDA) からなる群から選ばれる化合物である] に示される蛍光染料である、
請求項3記載の合成トレーサー。

20

【請求項 6】

標識が、カンナビノール分子またはその誘導体と、1つまたはそれ以上の連結基を通して
結合している、請求項2記載の合成トレーサー。

【請求項 7】

トレーサーが、FIG. 3、4、5、6および7 [式中、

- (a) R は、伸長基であり；
(b) X および Z は、反応基であり；および
(c) $*$ は、標識である]

30

に示される一般式からなる群から選ばれる一般式で示される、請求項2記載の合成トレー
サー。

【請求項 8】

R が、 $-(CH_2)_n-$ および $C(O)-(CH_2)_nCO$ からなる群から選ばれ； n は、0 ~ 約 15
の数を表す、請求項7記載の合成トレーサー。

【請求項 9】

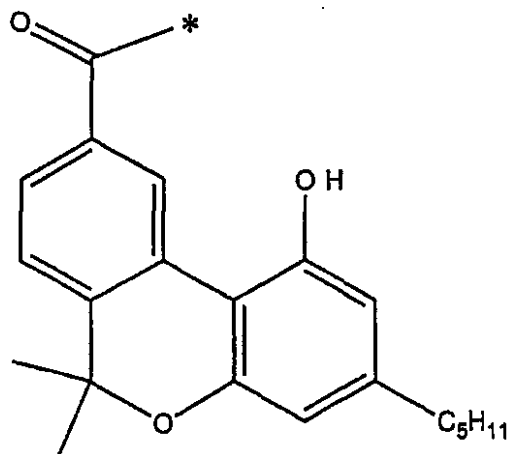
X もしくは Z 、またはその両方が、 O 、 NH 、 CO 、 $HNC(S)NH$ 、 CH_2 、 S 、 SO_2 、
イミノ、イミノカルボニル、カルボニル、カルボニミドイル、イミノスルホニル、スルホ
ニル、イミノカルボニミドイル、チオカルボニルジイミノ、イミノカルボニルオキシ、イ
ミノチオカルボニルオキシ、(スルホニルイミノカルボニル)ジイミノ、トリアジニルジイ
ミノ、スクシニミジル活性エステル (OSu) 基およびエチレンジアミン (EDA) からなる
群から選ばれる、請求項7記載の合成トレーサー。

40

【請求項 10】

標識が、カンナビノール分子の9位で結合しており、トレーサーが、一般式：

【化 1】



10

[式中、*は標識である]で示される、請求項 2 記載の合成トレーサー。

【請求項 1 1】

標識が、EDA-Cy5 である、請求項 1 0 記載の合成トレーサー。

【請求項 1 2】

試料中のカンナビノイドおよびその代謝物の検出における請求項 1 ~ 1 1 のいずれか 1 項に記載の合成トレーサーの使用。

20

【請求項 1 3】

合成トレーサーが、⁹-THC またはその代謝物と結合し得る抗体とともに用いられる、請求項 1 2 記載の合成トレーサーの使用。

【請求項 1 4】

試料中のカンナビノイドまたはカンナビノイド代謝物を検出するための測定システムであって、システムが、

(a) 請求項 1 ~ 1 1 のいずれか 1 項に記載の合成トレーサー；および

(b) トレーサーと、およびカンナビノイドまたはカンナビノイド代謝物と結合し得る認識分子

30

を含むことを特徴とする測定システム。

【請求項 1 5】

測定システムが、試料中のカンナビノイドまたはカンナビノイド代謝物が、認識分子と結合するためにトレーサーと競合するように設定されている、請求項 1 4 記載の測定システム。

【請求項 1 6】

認識分子が、抗体、カンナビノイドの受容体、カンナビノイド代謝物の受容体、⁹-THC の受容体、⁹-THC 代謝物の受容体からなる群から選ばれる、請求項 1 4 記載の測定システム。

【請求項 1 7】

認識分子がトレーサーと結合し、カンナビノイドまたはカンナビノイド代謝物が認識分子と結合するためにトレーサーと競合する、請求項 1 5 記載の測定システム。

40

【請求項 1 8】

免疫測定法が、動力学的置換測定法として設定されている、請求項 1 5 記載の測定システム。

【請求項 1 9】

抗体が、固体支持体に固定化されている、請求項 1 5 記載の測定システム。

【請求項 2 0】

固体支持体が、樹脂、ビーズ、およびカラム壁からなる群から選ばれる、請求項 1 9 記載の測定システム。

50

【請求項 2 1】

抗体が、⁹-THC およびその代謝物と結合し得る、請求項 1 6 記載の測定システム。

【請求項 2 2】

抗体が、カンナビノイドに対してまたはカンナビノイド代謝物に対してより、トレーサーに対してより低い結合親和性を有している、請求項 1 6 記載の測定システム。

【請求項 2 3】

トレーサーが、カンナビノイドまたはカンナビノイド代謝物と比較して、抗体に対して約 1 4 % ~ 約 8 5 % の交叉反応性を有する、請求項 2 2 記載の測定システム。

【請求項 2 4】

さらに、標識を検出するためのセンサーを含む、請求項 1 4 ~ 2 3 のいずれか 1 項記載の測定システム。 10

【請求項 2 5】

試料中のカンナビノイドおよび/またはカンナビノイド代謝物の検出方法であって、方法が、工程：

(a) 認識分子を請求項 1 ~ 1 1 のいずれか 1 項に記載の合成トレーサーに暴露し、認識分子 - トレーサー複合体を形成させ；

(b) カンナビノイドまたはカンナビノイド代謝物を含有する疑いのある試料を、認識分子 - 複合体と接触させ；および

(c) 認識分子からはずれたトレーサーを検出する
を含むことを特徴とする方法。 20

【請求項 2 6】

認識分子が固体支持体に固定化されている、請求項 2 5 記載の方法。

【請求項 2 7】

試料を認識分子 - トレーサー複合体と接触させる工程が、さらに、試料を非 - 平衡条件下連続的に認識分子 - トレーサー複合体を通過させて流す工程を含む、請求項 2 5 記載の方法。

【請求項 2 8】

認識分子をトレーサーに暴露させる工程が、実質的に認識分子上の結合部位をトレーサーで飽和させることになる、請求項 2 5 記載の方法。

【請求項 2 9】

はずれたトレーサーの量が、試料中の⁹-THC およびその代謝物の濃度に正比例する、請求項 2 5 記載の方法。 30

【請求項 3 0】

試料が、生物学的試料である、請求項 2 5 ~ 2 9 のいずれか 1 項記載の方法。

【請求項 3 1】

生物学的試料が、唾液、全血、血清、血漿、毛髪または尿からなる群から選ばれる、請求項 3 0 記載の方法。

【請求項 3 2】

試料が、水性試料である、請求項 2 5 ~ 2 9 のいずれか 1 項記載の方法。

【請求項 3 3】

認識分子が、抗体、カンナビノイドを結合する受容体、カンナビノイド代謝物を結合する受容体、⁹-THC を結合する受容体、および⁹-THC 代謝物を結合する受容体からなる群から選ばれる、請求項 2 5 ~ 2 9 のいずれか 1 項記載の方法。 40

【請求項 3 4】

固体支持体；

固体支持体に固定化された抗体；

抗体に結合した請求項 1 ~ 1 1 のいずれか 1 項に記載の合成トレーサーを含むカラム。

【請求項 3 5】

固体支持体が、樹脂、ビーズ、およびカラム壁からなる群から選ばれる、請求項 3 4 記載 50

のカラム。

【請求項36】

抗体が、⁹-THCまたはその代謝物と結合し得る、請求項34記載のカラム。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明の分野は規制物質の検出に関する。特に、生物学的試料中のカンナビノイドおよびテトラヒドロカンナビノイド(THC)の検出のための標識トレーサーに関する。

【背景技術】

【0002】

マリファナは、公知の向精神薬であり、カンナビノイドのかなりの量を産生するアサ科の植物から誘導される。特に、最も重要なカンナビノイドは、マリファナの主要生理学的活性成分である⁹-テトラヒドロカンナビノール(⁹-THC)である。⁹-THCが規制物質であるのは、心臓血管系および中枢神経系に鎮静および抑制-様作用の両方があり、カンナビジオールとは反対に、マリファナの非-向精神薬成分であるからである。マリファナを吸うと、⁹-THCは急速に肺から吸収されて血流に入り、11-ノル-⁹-THCを経て、第1次代謝物としての11-ノル-⁹-THC-カルボン酸を伴った一連の極性代謝物に代謝される。

【0003】

よくあるカンナビノイドの濫用のために、生物学的標本中のこれらの規制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。現在、生物学的試料中のカンナビノイドは、薄層クロマトグラフィー(TLC)、ガスクロマトグラフィー/質量分析(GC/MS)、放射性免疫測定法または酵素免疫測定法などの多数の技法によって検出されてきた。試験法の感度に依存して、カンナビノイド代謝物は、たまに喫煙する人で10日、病み付きの喫煙者で36日まで尿中に検出することができる(Wangら、U.S. Pat. No. 5,264,373, col 1, lines 36-37参照)。

【0004】

近年、薬物監視のための唾液の使用に関する報告が多くなっている。⁹-THCの存在についての唾液試験は、薬物動態学的研究および長期にわたる薬物治療中の患者の管理に用いられてきた(Samynら、Forensic Science Review, vol.11, p.1, (1999)参照)。唾液試験は薬物の血中濃度を定量できないが(Grossら、"Validated Direct Blood ⁹-THC Radioimmunoassay Quantitation", J. Anal. Toxi. Vol.2, p.98 (1978)参照)、唾液中の⁹-THCの存在がカンナビノイドの最近の喫煙を検出し得ることから、唾液試験は特に重要である。⁹-THCの血中濃度はまた、唾液中の⁹-THCの濃度から推測することができる;血中濃度は通常唾液中の薬物濃度よりかなり高い(Idowuら、"A Review of the Use of Saliva in the Forensic Detection of Drugs and Other Chemicals", J. Forensic Science Society, vol.22, 1982, p.123参照)。

【0005】

さらに、連続流動免疫置換測定技術(F. S. Liglerら、Flow Immunosensor Method and Apparatus, U.S. Pat. No. 5,183,740)は、唾液および尿中の規制薬物の迅速検出を証明した(Hao Yuら、Use of the USDT Flow Immunosensor for Quantitation of Benzolecgonie in Urine, Biosensors and Bioelectronics, 732-734(1996); Nam, D.ら、Programme and Abstracts of TIAFT 2000 at Helsinki, 2000; Liang, G.ら、Proc. of ICADTS 2000, Jun. 22-26, 2000. U.S. Pat. No. 5,183,740および上記引用文献、それらに含まれる図もすべて含めて、ここに引用してすべての記載をこの明細書の記載とする)。

【0006】

免疫測定法または免疫センサーを用いて⁹-THCを検出するために、通常、トレーサー分子が⁹-THCまたはその代謝物と競合させるために用いられる。トレーサー分子は通常、標識抗原またはリガンドであり、⁹-THCまたはその代謝物の抗体または受容体と同じ抗原またはリガンド結合部位に結合し得る。規制物質の検出において、多くの

10

20

30

40

50

免疫測定法は、一般に、試料中の分析物の存在および/または量を検出するためのトレーサーとして、標識された禁止薬物それ自体(例えば、標識⁹-THC)を用いてきた。

【0007】

⁹-THCトレーサー合成中の出発物質として非-規制物質の最近の使用もまた、テトラヒドロカンナビノイドの蛍光分極免疫測定法と題する米国特許第5,264,373号にWangらによって報告されている。この特許で、Wangは、蛍光分極免疫測定法における使用のための標識THC-類似体ベースの誘導体の使用を開示している。

【0008】

FIG. 1は、⁹-THCまたはその代謝物の検出に用いられるトレーサーの種々の合成方法を一般的に示している。方法Aは、出発物質として、規制物質、例えば、禁止薬物である⁹-カルボキシ(またはアルデヒド)-⁹-THCを用いる通常の方法の1つを示している。これらの出発物質は⁹-THCの9位の炭素の結合しているカルボキシ基に標識を結合させ、薬物-ベースのトレーサーを生成する。方法Bは、⁹-THC-類似体を用いるトレーサーの別法の合成方法を示す。

10

【0009】

連続流動置換測定法などのある種の免疫測定法において、効果的な置換を容易にするために、トレーサー分子に対する抗体の結合親和性が分析物に対する抗体の結合親和性より低いことが望ましい。⁹-THC-ベースまたは⁹-THC-類似体ベースのトレーサーの使用は、⁹-THC分析物が効果的に⁹-THC-ベースまたは⁹-THC-類似体ベースのトレーサーと置換しないために問題がある。これがこの測定法の感度の低さにつながり、

20

【0010】

従って、新規な試薬、特に、⁹-THC検出に使用するための新規なトレーサーの必要性が存在している。

【発明の開示】

【0011】

本発明は、カンナビノール-ベースのトレーサーを生成させるためにカンナビノール(6,6,9-トリメチル-3-ペンチル-6H-ジベンゾ[b,d]ピラン-1-オール)と標識との結合から製造される新規な組合せのトレーサーを提供する。本発明の一態様において、標識はカンナビノール分子の1,2,3,4,8,9,および10の位置に付加されていてもよい。

30

【0012】

本発明の別の態様において、カンナビノール-ベースのトレーサーは、カンナビノイド、例えば、⁹-THCまたはその代謝物に結合し得る認識分子と結合して用いられ得る。これらの認識分子の例には、カンナビノイドを結合し得る抗体または受容体分子が含まれる。

【0013】

本発明の好ましい態様において、カンナビノール-ベースのトレーサーが連続流動置換測定システム(continuous flow displacement assay system)に関連して用いられる。この例において、抗体または受容体分子は、試料中に存在するカンナビノイド(例えば、⁹-THCまたはその代謝物)に対する親和性より低い結合親和性でカンナビノール-ベースのトレーサーに結合するのが好ましい。

40

【0014】

好ましい具体例の詳細な記載

FIG. 2 Aは、本発明の具体例の1つによって、トレーサーの合成のための一般反応式を示す。⁹-THCまたは⁹-THC-ベースの類似体を用いる代わりに、トレーサーをカンナビノールから合成する。FIG. 2 Bは、標識がカンナビノールの9位に結合している炭素に付加されていることを示すが、標識はまた、例えば、1,2,3,4,8,9および10などのカンナビノール分子上の種々の位置に付加されていてもよい(FIG. 2 B)。種々の位置で標識されたカンナビノール-ベースのトレーサーをFIG. 3 - 7およびFIG. 10に

50

示す。

【0015】

この明細書で用いるとき、メルクインデックスそのままのカンナビノールは6,6,9-トリメチル-3-ペンチル-6H-ジベンゾ[b,d]ピラン-1-オールとして定義する。FIG. 2 Bに示すように、カンナビノールは、間にあるピラン分子Bとともにベンゼン環AおよびCを含む。この明細書で用いられるカンナビノール誘導体は、カンナビノールから誘導され、両方のベンゼン環AおよびCを保持している分子として定義される。例えば、FIG. 2 Aに示される9-カルボキシカンナビノールは、カンナビノール誘導体とみなされる。この明細書で用いるとき、カンナビノール-ベースのトレーサーは、カンナビノール分子またはカンナビノール誘導体と結合しているか付加されている標識を含むトレーサー分子である。標識は直接または間接的に(連結基を経て)、カンナビノールに結合または付加されている。

10

【0016】

FIG. 3および10は、カンナビノール分子の9位に付加された標識(*またはCy5)を伴ったカンナビノール-ベースのトレーサーを示す。FIG. 4は、カンナビノール分子の1位に付加された標識(*)を伴ったカンナビノール-ベースのトレーサーを示す。FIG. 5は、カンナビノール分子の8または10位のいずれかに付加された標識を表す一般式を示す。FIG. 6は、カンナビノール分子の2または4位のいずれかに付加された標識を表す一般式を示す。FIG. 7は、カンナビノール分子の3位、すなわち、3-ペンチル鎖の末端炭素に付加された標識を示す。標識はまた、カンナビノールの3位に付加されたペンチル鎖5

20

【0017】

これらの図において、XおよびZは、例えば、O、NH、CO、HNCSNH、CH₂、S、SO₂などの反応基であってもよい。XおよびZの他の例には、イミノ、イミノカルボニル、カルボニル、カルボニミドイル、イミノスルホニル、スルホニル、イミノカルボニミドイル、チオカルボニルジイミノ、イミノカルボニルオキシ、イミノチオカルボニルオキシ、(スルホニルイミノカルボニル)ジイミノ、トリアジニルジイミノ、エチレンジアミン(EDA)またはスクシニミジル活性エステル(OSu)基が含まれる。Rは伸長基、すなわち、標識をカンナビノール分子からさらにはなして伸ばす原子の基を表す。Rの例としては、例えば、N、O、S、Cl、Br、IまたはFなどのヘテロ原子と結合した0~約

30

【0018】

カンナビノール-ベースのトレーサーの使用は、FIG. 13とともに実施例VIIに示すように、特に、置換-ベースの免疫測定法に用いられるとき、免疫測定法の感度を増加させることができる。構造的に、カンナビノールは、カンナビノールが2つのベンゼン環AおよびB(FIG. 2 Bおよび14参照)を持っており、これに反して、⁹-THCまたは⁹-THC類似体がベンゼン環1個だけしか(FIG. 14中A')を持っていない点で⁹-THCとは異なる。それ自体カンナビノールの三次元構造は⁹-THCおよび⁹-THC-類似体と著しく異なる。FIG. 14は、カンナビノール、⁹-THCおよび⁹-THC-類似体と三次元構造を示す。

40

【0019】

カンナビノール中のピラン分子Bの両側の2つのベンゼン環AおよびCのために、その三次元構造は単一のかつ殆ど平面という特徴がある。その平面は2つのベンゼン環AおよびCおよびピラン分子Bからなる(FIG. 14参照)。これに反して、⁹-THCまたは⁹-THC-類似体の三次元構造は、環B'およびC'が典型的なイス型配座にある2つの平面を有する分子によって特徴付けられる(FIG. 14)。第一の平面はベンゼン環A'およびピラン分子(B)の一部からなる。第二の平面はシクロヘキサンまたは6員の炭素分子C'からなり、三次元で典型的なイス型配座を形成している。ピラン分子B'もまた典型的なイス型配座を形成している。カンナビノールおよび⁹-THCまたは⁹-THC類似体

50

の三次元構造の違いのために、⁹-THCに結合する抗体はカンナビノールと交叉反応するが、より低い結合親和性で交叉反応する。この低い交叉反応性が、例えば、置換ベースの免疫測定法などのある種の免疫測定法では望ましい。カンナビノール-ベースのトレーサーは⁹-THCによってよりたやすく置換され、それによって測定法により大きい感度をもたらす。

【0020】

すなわち、本発明の1つの態様は、構造的に分析分子と類似し、好ましくはより低い結合親和性で、⁹-THCまたはその代謝物に結合し得る抗体と十分な交叉反応性を保持するトレーサー分子を含む。

【0021】

本発明の好ましい具体例において、カンナビノール-ベースのトレーサーは置換測定法と関連して、カンナビノイド、例えば、⁹-THCまたはその代謝物を検出するために用いられる。この明細書で用いるとき、「検出」とは、試料中の⁹-THCまたはその代謝物(または両方)の定性または定量をいう。置換測定法において、⁹-THCまたはその代謝物の定性または定量(またはその両方)は、標識トレーサー分子が認識分子に結合し、⁹-THCまたはその代謝物が認識分子からはずれ得る、標識トレーサー分子の量によって測定される。認識分子の例には、⁹-THCまたはその代謝物を認識する抗体または受容体分子(例えば、カンナビノイド受容体)が含まれる。これらの認識分子は最初、通常の手段を用いて、固体相-マトリックスまたは固体支持体に固定化される。固体支持体または固体相-マトリックスは、樹脂、ビーズ、マイクロスフィア、カラム壁またはマイクロタイタープレートであってもよい。樹脂、ビーズまたはマイクロスフィアの例には、セファロース、セファクリル(sephacryl)、シリカ、エムフェイス(Emphase)多孔性ビーズ、ダイナル(Dynal)ビーズ、常磁性ビーズ、および他の種類の反応性樹脂またはビーズが含まれる。ひとたび固体支持体または固体相-マトリックスに固定化されると、認識分子を、トレーサー分子に暴露することができ、カラムまたはバッチ方式のいずれかで結合する。好ましくは、トレーサー分子を認識分子と高濃度でインキュベートし、トレーサー分子が認識分子のすべてのリガンド結合部位に結合し、飽和するようにする。

10

20

【0022】

その後、⁹-THCまたはその代謝物を含む疑いのある試料を、(バッチ方式)または流動通過(カラムまたは連続流動方式)で、認識分子-トレーサー複合体とインキュベートし、試料中の⁹-THCまたはその代謝物が複合体から標識トレーサーを置換するようにする。ついで、標識トレーサーの量が測定され、その量が試料中のTHCまたはその代謝物と正比例する。

30

【0023】

上記に暗示されるように、調製されたトレーサーの結合部位が、被験試料中の分析物より、選択された認識分子に対してより低い交叉反応性を有する限り、調製されたトレーサーの結合部位として標的分子または分析物(例えば、⁹-THCまたはその代謝物)それ自体は必要ない。さらに下記に詳細に記載するように、カンナビノール-ベースのトレーサーは、生物学的試料中のカンナビノイドの定性および/または定量を検出する免疫測定法に使用するのに理想的である。それらは特に、連続流動免疫置換測定法に有用である。

40

【0024】

連続流動免疫置換測定法

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非常に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、分析物は⁹-THCまたはその代謝物であってもよい。抗体は分析物を認識する、すなわち、分析物に特異的に結合し得る。分析物の存在の決定を可能にするため、標識化合物であるトレーサーは抗体との結合に関して分析物と競合させられる。

【0025】

典型的な連続流動置換免疫測定法は、⁹-THCまたはその代謝物に対する固-相固定化抗体を含む。抗体の抗原結合部位が標識合成トレーサーに暴露され、標識合成トレーサ

50

ー - 抗体複合体が形成される。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⁹-THCを含有する疑いのある生物学的試料が連続して固-相固定化抗体-標識合成トレーサー複合体を通過して行く。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. No. 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)。

【0026】

連続流動免疫置換測定法の開発の成功は、抗体から結合トレーサーのすばやい分離速度を達成し、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基づく。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。トレーサーに対する抗体の親和性は、15-100%の交叉反応性の範囲のいずれかであってもよい。好ましいカンナビノール-ベースのトレーサーは、実施例VIIに記載するように、抗体に対して約40-80%の交叉反応性を有する。さらに、認識分子からトレーサーを置換するための条件は、好ましくは、非-平衡条件または動力学的流動反応で行う。「非-平衡条件または動力学的流動反応」とは、試料が、トレーサーおよび分析物間の安定な平衡条件に達しない速度で認識分子-トレーサー複合体を流動通過することを意味する。

10

【0027】

⁹-THCに対する抗体の多くは、また⁹-THCの重要な代謝物、例えば、⁹-THC-9-カルボキシも認識するから、カンナビノール-ベースのトレーサーはまた、抗体が⁹-THC類似体を認識し得るかぎり有用である。

20

【0028】

抗体

⁹-THCまたは⁹-THC-代謝物に対する抗体、例えば、モノクローナルまたはポリクローナル抗体は、広範囲の⁹-THCまたは⁹-THC-代謝物の同定のためのこの開示に記載された方法に採用または適用が可能である。抗体の例はFitzgerald Industries International, Inc. (Concord, Mass.) catalog #10-T43から入手できる。

【0029】

標識

カンナビノール-ベースのトレーサーを標識付けする標識は、適切には、フルオロフォア、発色団、放射性標識、ハプテン、金属コロイド、酵素または化学ルミネセンスまたは生物発光分子である。適切なフルオロフォアおよび発色団がR. P. Haugland, Molecular Probes, Handbook of Fluorescent Probes and Research Chemicals, 5Ed., Molecular Probes, Inc., Eugene, Oreg., 1992に開示されており、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ホインドシアニン染料Cy5が含まれる(Mujumdar, R. B.ら、Bioconjugate Chemistry, vol. 4, p. 105 (1992)。他の蛍光染料の例はFIG. 9および10に示されている。

30

【0030】

ハプテンの例には、ピオチン、ジゴキシゲニンまたは、抗体、ストレプトアビジンもしくは他のリガンド結合分子によって認識され得る他の適切なハプテンが挙げられる。酵素の例には、アルカリホスファターゼ、ペルオキシダーゼ、 α -ガラクトシダーゼまたは、色素、沈澱または蛍光を産生するレポーター分子を開裂し得る他の酵素が含まれる。

40

【0031】

連結基

標識は、通常、連結基によってカンナビノール-ベースのトレーサーに結合していてもよい。連結基の例はX-R-Z-* (式中、*は標識である)によって表される。

【0032】

XおよびZは、例えば、O、NH、CO、HNCSNH、CH₂、S、SO₂などの反応基であってもよい。XおよびZの他の例には、イミノ、イミノカルボニル、カルボニル、カ

50

ルボニミドイル、イミノスルホニル、スルホニル、イミノカルボニミドイル、チオカルボニルジイミノ、イミノカルボニルオキシ、イミノチオカルボニルオキシ、(スルホニルイミノカルボニル)ジイミノ、トリアジニルジイミノ、エチレンジアミン(EDA)またはスクシニミジル活性エステル(OSu)基が含まれる。Rは伸長基、すなわち、標識をカンナビノール分子からさらにはなして伸ばす原子の基を表す。Rの例としては、例えば、N、O、S、Cl、Br、IまたはFなどのヘテロ原子と結合した0~約15の炭素原子の基を含んでいてもよい。具体的なRの例には、 $-(CH_2)_n-$ および $C(O)-(CH_2)_nCO$ (式中、nは0~約15であってもよい)が含まれる。

【0033】

生物学的試料

カンナビノール-ベースのトレーサーは、これに限定されるものではないが、血液、血漿、血清、毛髪、唾液または尿を含む生物学的または水性試料中のTHCまたはその代謝物の検出のために用いられ得る。唾液は、濫用薬物の検出および測定のための有用な試験材料として証明されてきた("Saliva as a Diagnostic Fluid", Ed by D. MalamudおよびL. Tabak, Annals of the New York Academy of Sciences, 1993, V. 694.)。例えば、唾液試料中の⁹-THCは、GC/MSによって検出することができる(H. W. Peelら、Detection of Drugs in Saliva of Impaired Drivers", J. Forensic Sciences, JFSCA, V29, 185(1984)。

【0034】

下記の実施例は、生物学的試料中のTHCまたはその代謝物の検出のためのカンナビノール-ベースのトレーサーの合成および使用を説明するものである。化学的な出発物質は、リサーチ・トライアングル・インスティテュート(Research Triangle Institute (RTI), Research Triangle Park, NC)またはシグマ・ケミカルズ(Sigma Chemicals, St. Louis, MO)から入手することができる。

【0035】

実施例I

カンナビノールの2または4位が標識されたCy5標識トレーサーの製造

FIG. 15は、カンナビノールの2または4位が標識されたCy5標識トレーサーの製造方法を示す。工程1で、カンナビノール(25 mg)を、0.2N NaOH(1 mL)に溶解させ、p-カルボキシベンジルジアゾニウム塩と室温(RT)にて30 min反応させた。得られた暗黄色溶液を1N HClにてpH 3に調整し、反応性生物をEtOAcで抽出し、Na₂SO₄にて乾燥させた。残渣に存在する乾燥剤をろ取し、減圧下乾燥させた。乾燥残渣をついで、THF(0.5 mL)中に再溶解させ、シリカプレート(20×20 cm, 1000 μM)、EtOAc/ヘキサン(1:1)で展開する薄層クロマトグラフィーを用いて精製した。上記の合成方法を用いて、約11 mgの2-置換および6 mgの4-置換カンナビノール誘導体をそれぞれ得、それらの化学構造式をFIG. 15に示す。

【0036】

工程2において、得られた4-置換カンナビノール誘導体(6 mg)を、N,N'-ジスクシニミジルカルボネート(DSC, 8 mg)とピリジン(20 mg)およびアセトニトリル(2 mL)の存在下還流条件で6時間反応させた。得られたカンナビノールのスクシニミジル活性エステル(4 mg)を工程3でPBS緩衝液1 mL中(pH 9)Cy5 EDA溶液にRTにて添加した。得られた混合物をRTにて4時間攪拌し、ついで混合物を、直接C18プレート(20×20 cm, 1000 μm)にスポットし、70/30(v/v)の割合のメタノールおよび水で展開させた。生成物のバンドを切り取り、メタノールで抽出した。得られたトレーサー溶液は、4位のCy5-標識カンナビノールを含有しており、直接免疫測定法に用いることができる。

【0037】

4-置換カンナビノール誘導体のための操作と同じ操作を用いて、カンナビノールの2位が標識されたカンナビノール-ベースのトレーサーが、出発物質として2-置換カンナビノール誘導体を用いて2工程で製造できる。上記の製造方法と同様にして製造され得られた、2または4位に付加された標識をもつカンナビノール-ベースのトレーサーは、FIG.

10

20

30

40

50

5 に示す一般式を有する。

【0038】

実施例 II

FIG. 1 1 に示す好ましいトレーサー GW 2 - 2 5 の製造

好ましいトレーサー GW 2 - 2 5 は、カンナビノール分子の 9 位に付加された標識を有するトレーサーであり、下記のようにして合成された：カンナビノール - 9 - カルボキシのスクシニミジル活性エステル (1 mg) (Research Triangle Institute から) を、PBS 緩衝液 1 mL 中 (pH 9) Cy5 EDA (3 mg) 溶液に RT にて添加した。得られた混合物を RT にて 4 時間攪拌し、ついで混合物を、直接 C 18 プレート (20 × 20 cm, 1000 μm) にスポットし、70/30 (v/v) の割合のメタノールおよび水で展開させた。生成物のバンドを切り取り、メタノールで抽出した。FIG. 1 1 に GW 6 - 2 5 として示す得られたトレーサーは、直接免疫測定法に用いることができる。

10

【0039】

実施例 III

8 または 10 位が標識されたカンナビノール - ベースのトレーサーの製造

カンナビノール分子の 8 または 10 位が標識されたカンナビノール - ベースのトレーサーは、8 または 10 - 酸化カンナビノールを Cy5 OSu と反応させて合成することができ、8 または 10 - Cy5 - 標識カンナビノール - ベースのトレーサーを得た。8 または 10 - 酸化カンナビノールは、Novak, J. ら、J. Chem. Soc. Perkin. Trans. 12867 (1983) (ここに、引用してすべて明細書の記載とする) に記載の方法によって製造することができる。

20

【0040】

実施例 IV

3 位に標識を有するカンナビノール - ベースのトレーサーの製造

カンナビノール分子の 3 位の官能基化ペンチル鎖は、Singer, M ら、Synthesis, May 1994, p486 - 488 (ここに、引用してすべて明細書の記載とする) に記載の方法を用いて合成することができる。ペンチル鎖に付加された官能基は、カルボニルまたはカルボキシ基であってもよく、ペンチル鎖のいずれかの炭素原子に付加することができる。ついで、カルボニルまたはカルボキシ基を、Cy5 - EDA と、1,3 - ジシクロヘキシルカルボジイミドと反応させ、3 位が標識されたカンナビノール - ベースのトレーサーを得る。

30

【0041】

実施例 V

1 位に標識を有するカンナビノール - ベースのトレーサーの製造

1 位が標識されたカンナビノール - ベースのトレーサーを得るために、カンナビノールを BrCH_2COOH と K_2CO_3 の存在下で反応させ、カンナビノールの 1 位の炭素原子に付加された $\text{O}-\text{CH}_2\text{COOH}$ を有するカンナビノール誘導体を得る。ついで、1 位に $\text{O}-\text{CH}_2\text{COOH}$ を有するカンナビノール誘導体を、Cy5 - EDA と、1,3 - ジシクロヘキシルカルボジイミドと反応させ、1 位が標識されたカンナビノール - ベースのトレーサーを得る。

40

【0042】

実施例 VI

カンナビノール - ベースのトレーサーとの比較に用いるための従来のトレーサーの製造

反応性エステル、11 - [(N - スクシニミジル)オキシカルボキシルメトキシイミノ] - 8 - THC (4 mg) を、PBS 緩衝液 (1 mL, pH 9) 中 Cy5 EDA (6 mg) 溶液に RT にて添加した。得られた混合物を RT にて 4 時間攪拌し、ついで混合物を、直接 C 18 プレート (20 × 20 cm, 1000 μm) にスポットし、70/30 (v/v) の割合のメタノールおよび水で展開させた。生成物のバンドを切り取り、メタノールで抽出した。得られたトレーサーが、FIG. 1 3 に GW 2 - 8 2 として示すトレーサー分子である。

【0043】

実施例 VII

50

⁹ - T H C の連続流動免疫測定法の操作

a) 連続流動免疫測定装置：

連続流動免疫置換測定法を行うのに必要なポンプ、バルブ、配管、取り換え可能なカラムおよび蛍光検出器を含む流動免疫測定法装置は、Lieglerら、U.S. Pat. No. 5,183,740に開示されており、これはすでに引用して明細書の記載としている。

【 0 0 4 4 】

T H C 標準曲線は、種々の濃度の ⁹ - T H C (例えば、0 ng/mL, 25 ng/mLおよび100 ng/mL)をマリファナを吸わない人の唾液に添加して作成した。化学品および緩衝液はシグマ・アルドリッチ・カンパニー(Sigma and Aldrich, Company)から入手した。

【 0 0 4 5 】

b) 試薬の調製

唾液中の添加された ⁹ - T H C の存在の測定のために、特異的抗 - T H C モノクローナル抗体(例えば、Fritzgerald Industries, Inc., Concord, Mass.からcat.#10 - T43として入手可能)を、製造業者の標準プロトコルに従ってエンフェーズ(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、FIG. 1 0 - 1 2 に示す製造したC y 5 - 標識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 にて回転混合器を用いて回転混合させながら放置した。複合体樹脂を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5 0 m M P B S (pH 7.4)中1 5 0 m M トレハロース緩衝液に添加した。ついで、樹脂を凍結 - 乾燥させ、使用時まで保存した。

【 0 0 4 6 】

(b) 流動測定法

内直径2 mmおよび長さ1 0 mmのマイクロ - ポリスチレンカラムに製造した樹脂4 mgを充填した。充填したカラムを流動免疫測定装置の流動導管の1つに取り付けた。カラムはまたラビューソフトウェア(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、T H C を添加した唾液試料5 0 μ lを、流速1 0 0 ~ 3 0 0 μ l / 分で導管を通過させた。免疫測定像をFIG. 1 3 に示す。

【 0 0 4 7 】

FIG. 1 3 は、連続流動置換測定法におけるカンナビノール - ベースのトレーサー(G W 6 - 2 5)の感度と ⁹ - T H C - ベースのトレーサー(G W 5 - 5 1、G W 2 - 8 2 およびG W 6 - 1 0)の感度の比較の結果の例を示す。カラムからの流出を検出し得る蛍光量の増加によってわかるように、T H C 含有試料をカラムを通過させた時、G W 6 - 2 5 は効果的にカラム上の抗体からはずれる。⁹ - T H C - ベースのトレーサーと比較したとき、G W 6 - 2 5 は、25 ng/mLおよび100 ng/mLの ⁹ - T H C 濃度において、⁹ - T H C の検出に高感度を示す。カンナビノール - ベースのトレーサー、G W 6 - 2 5 を使用すると、T H C 100 ng/mLにおいて約2 ~ 約2 0 倍感度が増大し、⁹ - T H C 25 ng/mLにおいて、約1.5 ~ 約8 倍感度が増大する。

【 0 0 4 8 】

実施例VIII

具体的なトレーサーに対する抗体の結合親和性がより低いことは、試料中の分析物と比較してトレーサーに対する抗体の交叉反応性の%によって測定することができる。実施例VI I に記載の方法と同様にして、例えば、⁹ - T H C に対する固定化抗体はカンナビノール - ベースのトレーサー(FIG. 1 0 に示す)に結合した。⁹ - T H C (非標識)、⁸ - T H C (非標識)、非標識9 - カルボキシ - ⁹ - T H C (T H C A)、カンナビジオール(非標識)または非標識カンナビノールを25 ng/mLで含有する種々の試料を、抗体 - トレーサー複合体を有する種々のカラムを通過させて、交叉反応の量を測定した。ついで、置換されたトレーサーの量を種々の試料間で比較した。

【 0 0 4 9 】

結果を下記のTable 1 に示す：

10

20

30

40

50

Table 1

MAX FI (mV)	Δ^9 -THC	Δ^8 -THC	カンナビジオール	カンナビノール	THCA
0	422	422	422	422	422
25 ng/mL	1602	1488	624	1266	8700

【0050】

9 -THCを基準として用いると(すなわち、 9 -THCを交叉反応100%に設定)(1602/1602))、 9 -カルボキシ- 9 -THCは、約540%(8700/1602)の交叉反応性%であり、カンナビノールは、約79%(1266/1602)の交叉反応性%である。もし、 9 -カルボキシ- 9 -THCを基準として用いると(すなわち、 9 -カルボキシ- 9 -THCを交叉反応100%に設定(8700/8700))、カンナビノールの交叉反応性%は、約14.5%(1266/8700)である。もし、 8 -THCを基準として用いると(すなわち、 8 -THCを交叉反応100%に設定(1488/1488))、カンナビノールの交叉反応性%は、約85%(1266/1488)である。

10

【0051】

本発明を数種の好ましい具体例に関連させて上記に記載したが、当業者は、本発明の主旨および範囲内でそれらの具体例に種々の変更をなすことおよび種々の均等物が本発明の主旨または範囲から外れることなく置換され得ることが理解されるであろう。さらに、上記の実施例は説明のためだけのものであり、本発明を限定するものでない。

【図面の簡単な説明】

20

【0052】

【図1】THC免疫試験法のトレーサーの従来の製造方法を示す。方法Aは、出発物質として 9 -カルボキシ- 9 -THCを使用し、 9 -THC-ベースのトレーサーを得る。方法Bは、非-規制物質を使用し、 9 -THC類似体-ベースのトレーサーを得る。

【図2A】本発明の具体例の1つによってカンナビノール-ベースのトレーサー合成の一般的な方法を示す。

【図2B】カンナビノールの化学構造式を示す。

【図3】本発明の具体例の1つによって、標識が9位に付加されたカンナビノール-ベースのトレーサーを示す。

【図4】本発明の具体例の1つによって、標識が1位に付加されたカンナビノール-ベースのトレーサーを示す。

30

【図5】本発明の具体例の1つによって、標識がカンナビノールの8または10位に付加されたカンナビノール-ベースのトレーサーを示す。

【図6】本発明の具体例の1つによって、標識がカンナビノールの2または4位に付加されたカンナビノール-ベースのトレーサーを示す。

【図7】本発明の具体例の1つによって、標識がカンナビノールのペンチル側鎖を経て3位に付加されたカンナビノール-ベースのトレーサーを示す。

【図8】本発明のトレーサー合成に使用され得る通常の蛍光標識の例を示す。

【図9】本発明のトレーサー合成に使用され得る通常の蛍光標識の例を示す。

【図10】本発明の具体例の1つによって、標識がカンナビノールの9位に付加されたカンナビノール-ベースのトレーサーを示す。

40

【図11】従来の 9 -THC-ベースのトレーサーを示す。

【図12】従来の 9 -THC-ベースのトレーサーを示す。

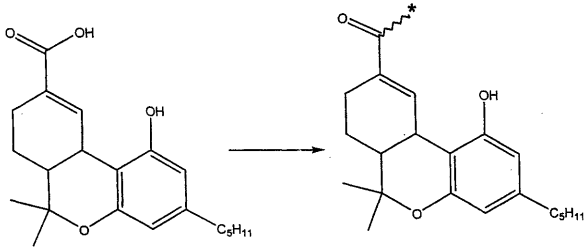
【図13】FIG. 11からの好ましいトレーサー、GW6-25、FIG. 11および12からの従来のトレーサーGW5-51、GW2-82による 9 -THCの流動免疫試験法の比較を示す。

【図14】 9 -THC、 9 -THC類似体およびカンナビノールの三次元構造を示す。

【図15】2位または4位に標識が付加されたカンナビノール-ベースの分子の製造方法を示す。

【 図 1 】

方法 A:



方法 B:

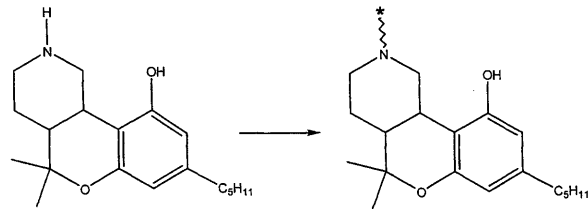


Fig. 1

【 図 1 0 】

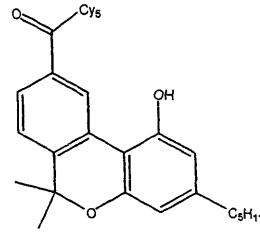


Fig. 10 トレーサー GW6-25

【 図 1 2 】

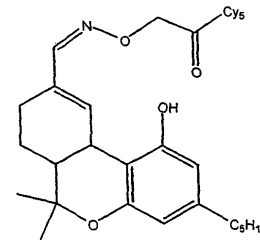


Fig. 12 トレーサー Gw2-82

【 図 1 3 】

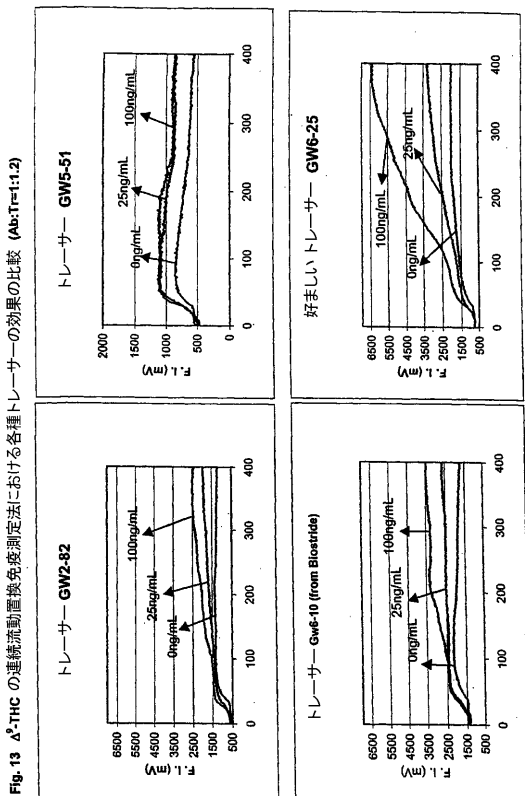


Fig. 13 Δ⁹-THC の連続流動免疫測定法における各種トレーサーの効果の比較 (Ab:T=1:1.2)

【 図 1 4 】

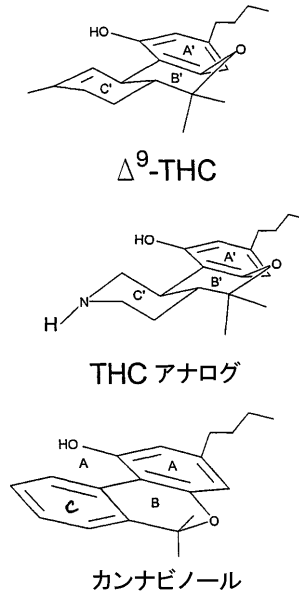


Fig. 14

【 図 1 5 】

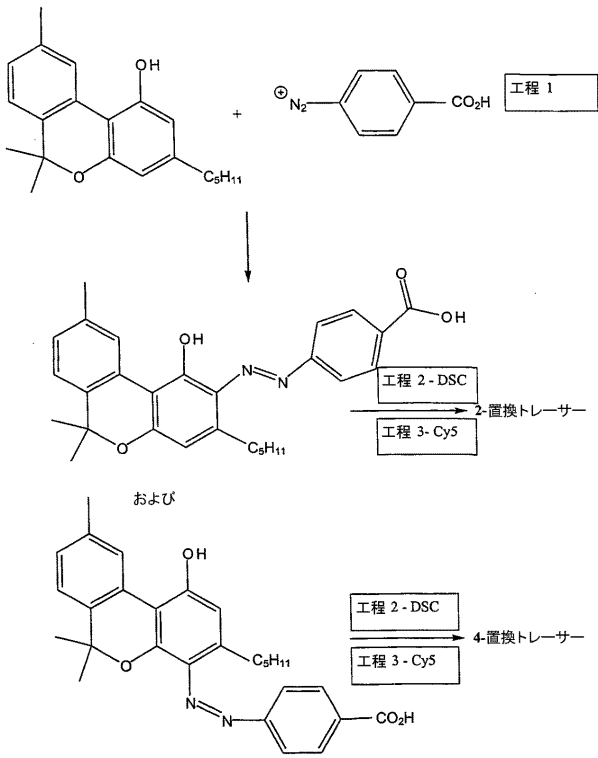


FIG. 15

【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
19 September 2002 (19.09.2002)

PCT

(10) International Publication Number
WO 02/073214 A2

(51) International Patent Classification: G01N 33/94, 33/543

(21) International Application Number: PCT/US02/06401

(22) International Filing Date: 28 February 2002 (28.02.2002)

(25) Filing Language: English

(26) Publication Language: English

(30) Priority Data: 09/805,469 12 March 2001 (12.03.2001) US

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

CHANG, Connie [US/US]; 10400 Trademark Street, Rancho Cucamonga, CA 91730 (US). LIANG, Greg [CN/US]; 10400 Trademark Street, Rancho Cucamonga, CA 91730 (US). AVILA, Albert [US/US]; 10400 Trademark Street, Rancho Cucamonga, CA 91730 (US).

(74) Agent: TIU, Samuel, N.; Lyon & Lyon LLP, Suite 4700, 633 West Fifth Street, Los Angeles, CA 90071-2066 (US).

(81) Designated States (national): AE, AG, AI, 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, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MY, NZ, OM, PH, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VN, YU, ZA, ZM, ZW.

(84) Designated States (regional): ARIPO patent (GI, GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SL, 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, SI, TR), OAPI patent

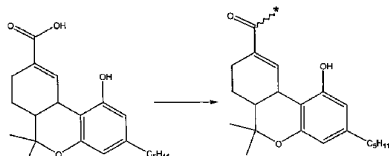
[Continued on next page]

(72) Inventors; and

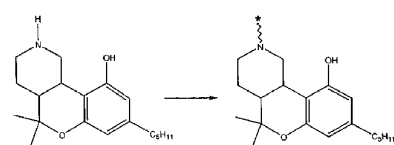
(75) Inventors/Applicants (for US only): WANG, Guohong [CN/US]; 10400 Trademark Street, Rancho Cucamonga, CA 91730 (US). FOLEY, Thomas [US/US]; 10400 Trademark Street, Rancho Cucamonga, CA 91730 (US).

(54) Title: NOVEL REAGENTS FOR DETECTING CANNABINOIDS

Method A:



Method B:



(57) Abstract: In this disclosure, novel cannabinoid-based tracers suitable for use in immunoassays that detect cannabinoids in a biological sample are disclosed. These cannabinoid-based tracers are particularly useful in a continuous flow displacement immunoassay. The disclosure also describes the processes for synthesizing the novel tracers, and the application of these tracers in fluorescence immunoassays for detecting and quantifying cannabinoids in biological samples.



WO 02/073214 A2

WO 02/073214 A2 

(BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG). *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.*

Published:

— *without international search report and to be republished upon receipt of that report*

WO 02/073214

PCT/US02/06401

1

NOVEL REAGENTS FOR DETECTING CANNABINOIDSField of the Invention

The field of the present invention relates to the detection of controlled substances. In particular, it relates to labeled tracers for use in detecting cannabinoids and tetrahydrocannabinoids (THC) in biological samples.

Background of the Invention

Marijuana, a known psychoactive drug, is derived from plants of the hemp family that produce significant amounts of cannabinoids. In particular, the most important cannabinoid is Δ^9 -tetrahydrocannabinol (Δ^9 -THC), the major physiologically active constituent of marijuana. Δ^9 -THC is a controlled substance because it has both sedative and depressant-like effects on the cardiovascular and central nervous systems, as opposed to cannabidiol, a non-psychoactive constituent of marijuana. Through smoking marijuana, Δ^9 -THC is rapidly absorbed from the lungs into the blood stream and metabolized through 11-nor- Δ^9 -THC to a series of polar metabolites with 11-nor- Δ^9 -THC-carboxylic acid as the primary metabolite.

Due to the common abuse of cannabinoids, there is a growing need for non-invasive and rapid tests to detect the presence of these controlled drugs in biological specimens. Currently, cannabinoids in biological samples can be detected by a number of techniques such as thin layer chromatography (TLC), gas chromatography/mass spectrometry (GC/MS), radioimmunoassay or enzyme immunoassay. Depending upon assay sensitivity, cannabinoid metabolites may be detected in the urine for up to 10 days in occasional smokers and 36 days in chronic smokers. See Wang et al, U.S. Patent No. 5,264,373, col 1, lines 36-37.

In recent years, there have been many reports concerning the use of saliva for drug monitoring. Saliva testing for the presence of Δ^9 -THC has been applied to pharmacokinetic studies or to the management of patients in chronic drug therapy. See Samyn, et al, *Forensic Science Review*, vol. 11, p. 1, (1999). Although saliva testing does not quantify the blood concentration of the drug, (See Gross et al, "Validated Direct Blood 9-THC Radioimmunoassay Quantitation", *J. Anal. Toxi.* Vol.2, p.98 (1978)), saliva testing is of particular interest since the presence of Δ^9 -THC in the saliva may indicate recent smoking of cannabinoids. The concentration of Δ^9 -THC in the blood may also be estimated from the concentration of Δ^9 -THC in the saliva; the blood concentration is usually much higher than the drug concentration in saliva.

WO 02/073214

PCT/US02/06401

2

Idowu, et al, "A Review of the Use of Saliva in the Forensic Detection of Drugs and Other Chemicals", J. Forensic Science Society, v22, 1982, p123.

Furthermore, the use of a continuous flow displacement immunoassay technology (F. S. Ligler, et al, Flow Immunosensor Method and Apparatus, U.S. Patent No. 5,183,740) has been demonstrated for rapid detection of controlled drugs in saliva and urine. See Hao Yu et al, Use of the USDT Flow Immunosensor for Quantitation of Benzococgonine in Urine, Biosensors and Bioelectronics, 732-734(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. U.S. Patent No. 5,183,740 and the above cited references, including any figures contained therein, are hereby incorporated by reference as if fully set forth herein.

To detect Δ^9 -THC using an immunoassay or immunosensor, a tracer molecule is usually used to compete with Δ^9 -THC or its metabolites. The tracer molecule is usually a labeled antigen or ligand, capable of binding to the same antigen or ligand binding site(s) of an antibody or receptor to Δ^9 -THC or its metabolites. In detecting controlled substances, most immunoassays have generally used the labeled illicit drugs themselves, (e.g., labeled Δ^9 -THC) as tracers to detect the presence and/or to quantify the analytes in the sample.

Recent use of non-controlled substances as starting materials in Δ^9 -THC tracers synthesis has also been reported by Wang, et al, in U.S. Patent No. 5,264,373 entitled Fluorescence Polarization Immunoassay for Tetrahydrocannabinoids. In this patent, Wang discloses the use of fluorescein to label THC-analog based derivatives for use in a fluorescence polarization immunoassay.

Figure 1 generally depicts the various methods for synthesizing tracers used in the detection of Δ^9 -THC or its metabolites. Panel A, for example, depicts one of the common methods that use controlled substances, such as the illicit drug, 9-carboxy (or aldehyde)- Δ^9 -THC, as starting materials. These starting materials are coupled with labels at the carboxyl group attached to the carbon at position 9 on Δ^9 -THC to yield a drug-based tracers. Panel B depicts an alternative method of synthesizing a tracer, which uses Δ^9 -THC-analogs.

In certain immunoassay systems such as a continuous flow displacement assay, it is desirable that the binding affinity of the antibody to the tracer molecules be lower than the binding affinity of the antibody to the analyte to facilitate effective

WO 02/073214

PCT/US02/06401

3

displacement. Using a Δ^9 -THC-based or Δ^9 -THC-analog based tracers is problematic because the Δ^9 -THC analyte does not effectively displace the Δ^9 -THC -based or Δ^9 -THC -analog based tracer. This results in a lower sensitivity of the assay.

Hence, there exists a need for novel reagents, in particular, novel tracers for use
5 in detecting Δ^9 -THC.

Summary of the Invention

The present invention provides a novel set of tracers produced from coupling cannabinol (6,6,9-trimethyl-3-pentyl-6H-dibenzo[b,d]pyran-1-ol) with a label to yield cannabinol-based tracers. In one aspect of the invention, the label can be attached at
10 positions 1, 2, 3, 4, 8, 9, and 10 of the cannabinol molecule.

In another aspect of the invention, the cannabinol-based tracer can be used in conjunction with recognition molecules that are capable of binding to cannabinoids such as Δ^9 -THC or its metabolites. Examples of these recognition molecules include antibody or receptor molecules that are capable of binding cannabinoids.

In a preferred embodiment of the invention, the cannabinol-based tracers are
15 used in conjunction with a continuous flow displacement assay system. In this embodiment, it is preferred that the antibody or receptor molecule binds to the cannabinol-based tracer at a lower binding affinity than the affinity to the cannabinoids (e.g., Δ^9 -THC or its metabolites) present in the sample.

Brief Description of the Drawings

Figure 1 depicts the conventional methods for preparing tracers for THC immunoassay. Method A involves the use of 9-carboxy- Δ^9 -THC as a starting material to yield a Δ^9 -THC-based tracer. Method B involves the use of non-controlled substances to yield a Δ^9 -THC analog-based tracer.

Figure 2A depicts a general method for synthesizing a cannabinol-based tracer according to one embodiment of the present invention. **Figure 2B** depicts the chemical formula for cannabinol.

Figure 3 depicts a cannabinol-based tracer in which a label is attached at position nine according to one embodiment of the present invention.

Figure 4 depicts a cannabinol-based tracer in which a label is attached at position one according to one embodiment of the present invention.

WO 02/073214

PCT/US02/06401

4

Figure 5 is a representation of cannabinol-based tracers in which labels are attached on the 8 or 10 position of cannabinol according to one embodiment of the present invention.

5 **Figure 6** is a representation of cannabinol-based tracers in which labels are attached on the 2 or 4 position of cannabinol according to one embodiment of the present invention.

Figure 7 depicts a cannabinol-based tracer in which a label is attached at position 3 through the pentyl side chain on cannabinol according to one embodiment of the present invention.

10 **Figures 8 and 9** depict examples of common fluorescent labels that may be used in synthesizing the tracer of the present invention.

Figure 10 depicts a cannabinol-based tracer in which a label is attached at position nine according to one embodiment of the present invention.

Figures 11 and 12 depict conventional Δ^9 -THC-based tracers.

15 **Figure 13** show the comparison of the flow immunoassay of Δ^9 -THC with the preferred tracer GW6-25 from Figure 11 and the conventional tracers GW5-51, GW2-82 from Figures 11 and 12.

Figure 14 depicts the three dimensional structures of Δ^9 -THC, Δ^9 -THC analogs, and cannabinol.

20 **Figure 15** depicts the process for preparing a cannabinol-based molecule labeled at position 2 or 4.

Detailed Description of the Preferred Embodiments

Figure 2A depicts an example of the general scheme for synthesizing tracers according to one embodiment of the present invention. Instead of using Δ^9 -THC or Δ^9 -THC-based analog, the tracers are synthesized from cannabinol. Although Figure 2B depicts the label being attached to the carbon attached to position nine of cannabinol, the label may also be attached at various positions on the cannabinol molecule such as positions 1, 2, 3, 4, 8, 9, and 10 (Figure 2B). Examples of cannabinol-based tracers labeled at various positions are shown in Figures 3-7 and in Figure 10.

WO 02/073214

PCT/US02/06401

5

As used herein, cannabinol is defined as 6,6,9-trimethyl-3-pentyl-6H-dibenzo[b,d]pyran-1-ol just as in the Merck index. As shown in Figure 2B, cannabinol includes two benzene rings A and C with a pyran molecule B in between. Cannabinol derivatives as used herein are defined as molecules that are derived from cannabinol and retain both benzene rings A and C. For example, a 9-carboxyl cannabinol as shown in Figure 2A will be considered a cannabinol derivative. As used herein, a cannabinol-based tracer is tracer molecule that comprises a label coupled or attached to a cannabinol molecule or a cannabinol derivative. The label may be directly or indirectly (through a linking group) coupled or attached to the cannabinol.

10 Figures 3 and 10 depict cannabinol-based tracers with the label (* or Cy5) attached at position 9 of the cannabinol molecule. Figure 4 depicts a cannabinol-based tracer with the label (*) attached at position 1 of the cannabinol molecule. Figure 5 depicts a general formula representing a label attached to either position 8 or 10 of the cannabinol molecule. Figure 6 depicts a general formula representing a label attached to position 2 or 4 of the cannabinol molecule. Figure 7 depicts the label attached to position 3 of the cannabinol molecule, i.e., at the end carbon of the 3-pentyl chain. The label may also be attached at position 3 via any of the five carbons on the pentyl chain attached at position 3 of cannabinol.

20 In these figures, X and Z may represent reactive groups such as O, NH, CO, HNCSNH, CH₂, S, and SO₂. Other examples of X and Z include an imino, an iminocarbonyl, a carbonyl, a carbonimidoyl, an iminosulfonyl, a sulfonyl, an iminocarbonimidoyl, a thiocarbonyldiimino, an iminocarbonyloxy, an iminothiocarbonyloxy, a (sulfonyliminocarbonyl)diimino, a triazinyl diimino, ethylene diamine (EDA) or a succinimidyl active ester (OSu) group. R may represent an extending group, i.e., a group of atoms that further extend the label (*) away from the cannabinol molecule. Examples of R may include a group of about zero to about 15 carbon atoms bonded with heteroatoms such as N, O, S, Cl, Br, I, or F. Specific examples of R include -(CH₂)_n- and C(O)-(CH₂)_nCO; wherein n maybe from about zero to about 15.

30 The use of cannabinol-based tracers may increase the sensitivity of an immunoassay, in particular, when used in a displacement-based immunoassay as will be demonstrated in Example VII, in conjunction with Figure 13. Structurally, cannabinol differs from Δ^9 -THC in that cannabinol has two benzene rings A and B (see Figures 2B and 14) in contrast with Δ^9 -THC or Δ^9 -THC analog that has only one benzene ring (A' in Figure 14). As such, the three dimensional structure of cannabinol

35

WO 02/073214

PCT/US02/06401

6

is significantly different than Δ^9 -THC or Δ^8 -THC analogs. Figure 14 provides a representation of the three-dimensional structures of cannabinalol, Δ^9 -THC, and Δ^8 -THC analogs.

Because of the two benzene rings A and C on both sides of the pyran molecule B in cannabinalol, its three-dimensional structure may be characterized as a single and almost flat plane. The plane consists of the two benzene rings A and C and the pyran molecule B. (See Figure 14). In contrast, the three-dimensional structure of Δ^9 -THC or Δ^8 -THC analogs may be characterized by a molecule having two planes, wherein the rings B' and C' are in a typical chair conformation. (Figure 14). The first plane consists of the benzene ring A' and part of the pyran molecule (B). The second plane consists of the cyclohexene or six membered carbon molecule C', which forms a typical chair configuration in three dimension. The pyran molecule B' also forms a typical chair configuration in three dimensions. Because of the difference in the three-dimensional structure of cannabinalol and Δ^9 -THC or Δ^8 -THC analogs, antibody that binds to Δ^9 -THC cross-reacts with cannabinalol but at a lower binding affinity. This lower binding affinity is especially desirable because in certain immunoassay such as a displacement based immunoassay, the cannabinalol-based tracers are easier to displace by Δ^9 -THC, thereby resulting in greater sensitivity of the assay.

Thus, one embodiment of the present invention contemplates a tracer molecule that is structurally dissimilar to the analyte molecule and retains sufficient cross-reactivity to an antibody that is capable of binding to Δ^9 -THC or its metabolites, but preferably at a lower binding affinity.

In a preferred embodiment of the invention, the cannabinalol-based tracers are used in conjunction with a displacement assay to detect cannabinoids such as Δ^9 -THC or its metabolites. As used herein, "detect," means to determine the presence or to quantify the amount (or both) of Δ^9 -THC or its metabolites (or both) in a sample. In a displacement immunoassay, the presence or amount of Δ^9 -THC or its metabolites may be determined by the amount of labeled tracer molecules that is bound to a recognition molecule and that the Δ^9 -THC or its metabolites may displace from the recognition molecule. Examples of recognition molecules include antibodies or receptor molecules (such as the cannabinoid receptors) that recognize Δ^9 -THC or its metabolites. These recognition molecules may be first immobilized in a solid phase-matrix or a solid support using conventional means. The solid support or solid-phase matrix may be a resin, a bead, a microsphere, wall of a column, or a microtiter plate. Examples of the resin, bead, or microsphere include sepharose, sephacryl, silica, Emphase porous beads,

WO 02/073214

PCT/US02/06401

7

Dynal beads, paramagnetic beads and any other types of reactive resin or beads. Once immobilized to the solid support or solid-phase matrix, the recognition molecules can be exposed to the tracer molecules for binding either in a column or batch format. Preferably, the tracer molecules are incubated with the recognition molecules at high concentrations such that the tracer molecules bind and saturate all of the ligand binding sites on the recognition molecule.

Afterwards, a sample suspected of having Δ^9 -THC or its metabolites may be incubated with (batch format) or flowed past (column or continuous flow format) the recognition molecule-tracer complex such that the Δ^9 -THC or its metabolites in the sample displaces the labeled tracer from the complex. The amount of labeled tracer may then be measured and, the amount of which is directly proportional to the THC or its metabolites in the sample.

As alluded above, it is not necessary to have the target molecule or analyte (e.g. Δ^9 -THC or its metabolites) itself as the binding site of the prepared tracer as long as the binding site in the prepared tracer has a lower cross-reactivity for the selected recognition molecule than the analyte in the test sample. As will be described in further detail below, cannabinol-based tracers are ideal for use in immunoassays that detect the presence and/or quantify cannabinoids in biological samples. They are also particularly useful in a continuous flow displacement immunoassay.

20 Continuous Flow Displacement Immunoassay

In a continuous flow displacement immunoassay, 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, the analyte can be Δ^9 -THC or its metabolites. The antibody recognizes or is capable of specifically binding to the analyte. To allow for determination of the presence of the analyte, a tracer, which is a labeled compound, is allowed to compete with the analyte for binding to the antibody.

A typical continuous flow displacement immunoassay involves a solid-phase immobilized antibody to Δ^9 -THC or its metabolites. The antigen binding site of the antibody may be exposed to a synthetic labeled tracer to form a labeled synthetic tracer-antibody complex. The antibody may be 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, Δ^9 -THC, may be continuously flowed past the solid-phase immobilized antibody-labeled synthetic tracer complex. If the analyte is present in the sample, the analyte may bind to the antibody and displace

WO 02/073214

PCT/US02/06401

8

the labeled synthetic tracer. Detection of the labeled tracer downstream from the binding point may thus show 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 by reference as if fully set forth herein.

5 The success of developing a continuous flow displacement immunoassay 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. The
10 affinity of the antibody for the tracer may be anywhere between 15-100% cross-reactivity. A preferred cannabinol-based tracer has about 40-80% cross-reactivity for the antibody as will be described in Example VII. In addition, the condition for displacing a tracer from the recognition molecule is preferably carried out in non-equilibrium condition or kinetic flow reaction. By "non-equilibrium condition or
15 kinetic flow reaction," it is meant that the sample flows past the recognition molecule-tracer complex at a rate where a stable equilibrium state between the recognition molecule, tracer, and analyte has not been achieved.

Since most antibodies to Δ^9 -THC also recognize the important metabolites of Δ^9 -THC such as Δ^9 -THC-9-carboxy, the cannabinol-based tracers are also useful so
20 long as the antibodies are capable of recognizing the Δ^9 -THC analogs.

Antibodies

Any antibodies, such as monoclonal or polyclonal antibodies, directed toward Δ^9 -THC or Δ^9 -THC -metabolites may be employed or adapted to the methods described in this disclosure for identifying a wide range of Δ^9 -THC or Δ^9 -THC -metabolites. An
25 example of the antibody can be obtained from Fitzgerald Industries International, Inc. (Concord, MA) catalog # 10-T43.

Label

The label for labeling the cannabinol-based tracer may suitably be a fluorophore, a chromophore, a radiolabel, a hapten, a metal colloid, an enzyme, or a
30 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

WO 02/073214

PCT/US02/06401

9

fluorophores include fluorescein, rhodamine, and sulfoindocyanine dye Cy5 (Mujumdar, R.B., et al., *Bioconjugate Chemistry*, vol. 4, p. 105 (1992)). Other examples of a fluorescent dye are provided in Figures 9 and 10.

5 Examples of a hapten may include biotin, digoxigenin, or any other suitable hapten that may be recognized by an antibody, streptavidin, or any other ligand binding molecule. Examples of enzymes may include alkaline phosphatase, peroxidase, β -galactosidase, or any other enzyme capable of cleaving a reporter molecule to produce color, precipitation, or luminescence.

Linking Group

10 The label may be coupled to the cannabinol-based tracers usually by means of a linking group. An example of a linking group is illustrated by X-R-Z-* wherein * is the label.

X and Z may represent reactive groups such as O, NH, CO, HNC(S)NH, CH₂, S, and SO₂. Other examples of X and Z include an imino, an iminocarbonyl, a carbonyl, a carbonimidoyl, an iminosulfonyl, a sulfonyl, an iminocarbonimidoyl, a thiocarbonyldiimino, an iminocarbonyloxy, an iminothiocarbonyloxy, a (sulfonyliminocarbonyl)diimino, a triazinyl diimino, ethylene diamine (EDA) or a succinimidyl active ester (OSu) group. R may represent an extending group, i.e., a group of atoms that further extend the label (*) away from the cannabinol molecule.

20 Examples of R may include a group of about zero to about 15 carbon atoms bonded with heteroatoms such as N, O, S, Cl, Br, I, or F. Specific examples of R include -(CH₂)_n- and C(O)-(CH₂)_nCO; wherein n may be from about zero to about 15.

Biological Samples

25 The cannabinol-based tracers may be used to detect THC or its metabolites in biological or aqueous samples, including but not limited to blood, plasma, serum, hair, saliva 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, Δ^9 -THC in saliva samples can be detected by GC/MS (H. W. Peel et al, 30 *Detection of Drugs in Saliva of Impaired Drivers*", *J. Forensic Sciences*, JFSCA, V29, 185(1984).

The following examples illustrate the synthesis and use of cannabinol-based tracers for detecting THC or its metabolites in a biological sample. The chemical

WO 02/073214

PCT/US02/06401

10

starting materials may be purchased from Research Triangle Institute (RTI) (Research Triangle Park, NC) or from Sigma Chemicals (St. Louis, MO).

Example I. Preparation of Cy5 labeled tracers labeled at position 2 or 4 of cannabinol.

5 Figure 15 depicts the process of preparing Cy5 labeled tracers at position 2 or 4 of cannabinol. In step one, cannabinol (25mg) was dissolved in 0.2N NaOH (1mL) and reacted with p-carboxybenzylidiazonium salt at room temperature (RT) for 30 min. The resulting dark yellow solution was adjusted with 1N HCl to pH 3, and the reaction product was extracted with EtOAc and dried over Na₂SO₄. The drying agent present in
10 the residue was filtered off and dried under decreased pressure. The dried residue was then redissolved in THF (0.5 mL) and purified using thin layer chromatography with a silica plate (20 x 20 cm, 1000µM) developed with EtOAc/Hexane (1:1). Using the above synthesis method, about 11 mg of 2-substituted and 6 mg of 4-substituted cannabinol derivatives were obtained, respectively, the chemical structures of which are
15 depicted in Figure 15.

In step two, the resulting 4-substituted cannabinol derivative (6 mg) was reacted with N, N'-disuccinimidyl carbonate (DSC, 8mg) in the presence of pyridine (20mg) and acetonitrile (2mL) at refluxing conditions for 6 hour. The resulting succinimidyl active ester of cannabinol (4mg) was the added in step three to Cy5EDA solution in 1
20 mL of PBS buffer (pH 9) at RT. The resulting mixture was stirred at RT for 4 hours, and then the mixture was directly spotted on a C18 plate (20 x 20 cm, 1000µm), and developed with methanol and water in a ratio of 70/30(v/v). The product band was cut and extracted with methanol. The resulting tracer solution, containing a Cy5-labeled cannabinol at position 4, can be directly used in an immunoassay.

25 Using the same procedure for the 4-substituted cannabinol derivative, cannabinol-based tracer labeled at position 2 of cannabinol may also be achieved using the 2-substituted cannabinol derivative as starting material in step two. The resulting cannabinol-based tracer with a label attached to position 2 or 4 as produced by the above preparation method may have a general formula as shown in Figure 5.

30 Example II. Preparation of preferred tracer GW2-25 as shown in Figure 11.

Preferred tracer GW2-25, which is a tracer having a label attached to position 9 of the cannabinol molecule was synthesized as follows: The succinimidyl active ester

WO 02/073214

PCT/US02/06401

11

of cannabinol-9-carboxy (1mg) (from Research Triangle Institute) was added to a solution of Cy5EDA (3 mg) in 1 mL of PBS buffer (pH=9) at room temperature (RT). The resulting mixture was stirred at RT for 4 hours, and then the mixture was directly spotted on a C18 plate (20 x 20 cm, 1000µm), and developed with methanol and water in a ratio of 70/30(v/v). The product band was cut and extracted with methanol. The resulting tracer, as shown in Figure 11 as GW6-25, may be directly used in an immunoassay.

Example III Preparation of cannabinol-based tracers labeled at position 8 or 10.

Cannabinol-based tracers with label attached to position 8 or 10 of the cannabinol molecule may be synthesized by reacting 8 or 10-oxygenated cannabinol with Cy5OSu to obtain 8 or 10-Cy5-labeled cannabinol-based tracers. 8 or 10-oxygenated cannabinol may be synthesized according to the methods described in Novak, J. et al., J. Chem. Soc. Perkin. Trans. 12867 (1983), which is hereby incorporated by reference as if fully set forth herein.

Example IV Preparation of cannabinol based tracers with label at position 3

Functionalized pentyl chain at position 3 of the cannabinol molecule may be synthesized using the methods described in Singer, M et al, Synthesis, May 1994, p486-488, which is hereby incorporated by reference as if fully set forth herein. The functional group attached to the pentyl chain may be a carbonyl or carboxyl group and may be attached at any carbon atoms on the pentyl chain. The carbonyl or carboxyl group may then be reacted with Cy5-EDA in the presence of 1,3-dicyclohexylcarbodiimide to yield a cannabinol-based tracer labeled at position 3.

Example V Preparation of cannabinol based tracers with label at position 1

To obtain a cannabinol-based tracer labeled at position 1, cannabinol may be reacted with BrCH₂COOH in the presence of K₂CO₃ to obtain a cannabinol derivative with O-CH₂COOH attached to the carbon atom at position 1 of cannabinol. The cannabinol derivative having O-CH₂COOH at position 1 may then be reacted with Cy5-EDA in the presence of 1,3-dicyclohexylcarbodiimide to yield a cannabinol-based tracer labeled at position 1.

WO 02/073214

PCT/US02/06401

12

Example VI Preparation of conventional tracers for
used in comparing with the cannabinol-based tracers.

5 The reactive ester, 11-[N-succinimidyl]oxycarbonylmethoxyimino]-delta-8-THC (4mg), was added to a solution of Cy5EDA (6mg) in PBS buffer (1mL, pH=9) at room temperature (RT). The resulting mixture was stirred at RT for 4 hours, and then the mixture was directly spotted on a C18 plate (20 x 20 cm, 1000 μ m) and developed with methanol and water in a ratio of 70/30(v/v). The product band was cut and extracted with methanol. The resulting tracer is the tracer molecule, GW2-82 shown in Figure 13.

10 Example VII Procedure of continuous flow
immunoassay of Δ^9 -THC

a) Continuous flow immunoassay instrument:

15 A flow immunoassay instrument which contains the necessary pumps, valves, tubing, exchangeable columns and fluorescence detector for performing a continuous flow displacement immunoassay has been disclosed in Liegler et. al., U.S. Patent No. 5,183,740, which has already been incorporated herein by reference.

20 THC standards were prepared by adding Δ^9 -THC at different concentrations (e.g., 0ng/mL, 25ng/mL and 100ng/mL) into the saliva from a person who has not smoke marijuana. Chemicals and buffers were obtained from Sigma and Aldrich, Company.

b) Preparation of Reagents

25 To determine the presence of the added Δ^9 -THC in saliva, a specific anti-THC monoclonal antibody (available from Fitzgerald Industries, Inc., Concord, MA, cat.# 10-T43) 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 tracers as shown in Figures 10-12. The resulting tracer-antibody-resin complex mixture was left overnight at 4°C with continuous mixing using a roller mixer. 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 150 mM trehalose buffer in 50mM PBS (pH 7.4). The resin was then freeze-dried and stored until ready to use.

30

c) Flow Assay

A micro-polystyrene column with an inner diameter of 2 mm and a length of 10 mm was filled with 4mg of the prepared resin. The filled column was installed into one of the flow channels of the flow immunoassay instrument. The column was also pre-washed with an appropriate buffer controlled by an automatic system supported by Labview software (National Instruments, Inc.). Afterwards, 50 μ l of the saliva sample spiked with THC was passed through the channel at a flow rate of 100 to 300 μ l/minute. The immunoassay profiles are shown in Figure 13.

Figure 13 provides an example of the results in comparing the sensitivity of a cannabinol-based tracer (GW6-25) to Δ^9 -THC-based tracer (GW5-51, GW2-82, and GW6-10) in a continuous flow displacement assay. When THC containing sample is passed through the column, GW6-25 is effectively displaced from the antibody on the column as seen by the increasing amount of fluorescence that can be detected flowing out of the column. As compared with the Δ^9 -THC-based tracers, GW6-25 provides the highest sensitivity in detecting Δ^9 -THC at Δ^9 -THC concentrations of 25 ng/mL, and 100 ng/mL. Using the cannabinol-based tracer GW6-25 results in about 2 to about 20 fold increase in sensitivity at 100ng/mL of THC and about 1.5 to about 8 fold increase in sensitivity at 25 ng/mL of Δ^9 -THC.

Example VIII

The lower binding affinity of an antibody to a particular tracer may be measured by the percent cross-reactivity of the antibody to the tracer as compared to the analyte in a sample. For example, immobilized antibodies against Δ^9 -THC were bound with the cannabinol-based tracer (shown in Figure 10) similar to the methods as described in Example VII. Different samples containing 25ng/mL of Δ^9 -THC (unlabeled), Δ^8 -THC (unlabeled), unlabeled 9-carboxy- Δ^9 -THC (THCA), cannabidiol (unlabeled), or unlabeled cannabinol were flowed through different columns having the antibody-tracer complex to determine the amount of cross-reactivity. The amount of tracer displaced was then compared between the different samples.

The results are summarized in Table 1 below:

WO 02/073214

PCT/US02/06401

14

Table I

MAX FI (mV)	Δ^9 -THC	Δ^8 -THC	Cannabidiol	Cannabinol	THCA
0	422	422	422	422	422
25ng/mL	1602	1488	624	1266	8700

5

Using Δ^9 -THC as the standard (i.e., Δ^9 -THC set at 100% cross-reactivity) (1602/1602), 9-carboxy- Δ^9 -THC has a percent cross-reactivity of about 540% (8700/1602), and cannabinol has a percent cross-reactivity of about 79% (1266/1602). If 9-carboxy- Δ^9 -THC were used as the standard (i.e., 9-carboxy- Δ^9 -THC set at 100% cross-reactivity (8700/8700)), then the percent cross-reactivity for cannabinol would be about 14.5% (1266/8700). If Δ^8 -THC were used as a standard (i.e., Δ^8 -THC set at 100% cross-reactivity (1488/1488)), then the present cross-reactivity for cannabinol would be about 85% (1266/1488).

Although the present invention has been described above in the context of certain preferred embodiments, one skilled in the art would understand that various modifications may be made to those embodiments and various equivalents may be substituted without departing from the spirit or scope of the invention. In addition, the above examples are provided for illustration purposes only and are not intended to limit the invention.

20

WO 02/073214

PCT/US02/06401

15

We Claim:

1. A synthetic tracer comprising:
a cannabinol molecule or its derivative;
a label attached to the cannabinol molecule or its derivative.
- 5 2. The synthetic tracer of claim 1, wherein the label is attached to the cannabinol molecule or its derivative at positions selected from the group consisting of positions 1, 2, 3, 4, 8, 9, and 10.
3. The synthetic tracer of claim 2, wherein the label is selected from
10 a group consisting of: a fluorophore, a chromophore, a hapten, a radiolabel, a metal colloid, an enzyme, a chemiluminescent molecule, and a bioluminescent molecule.
4. The synthetic tracer of claim 3, wherein the fluorophore is a
fluorescent dye as shown in Figure 8 wherein:
 - (a) m is a number selected from the group consisting of 0, 1, 2,
3, and 4;
 - 15 (b) Y is a compound selected from the group consisting of a succinimidyl active ester (OSu) and an ethylene diamine (EDA).
5. The synthetic tracer of claim 3, wherein the fluorophore is a
fluorescent dye as shown in Figure 9 wherein Y is a compound selected from the group
consisting of a succinimidyl active ester (OSu) and an ethylene diamine (EDA).
- 20 6. The synthetic tracer of claim 2, wherein the label is attached to the cannabinol molecule or its derivative through one or more linking groups.

WO 02/073214

PCT/US02/06401

16

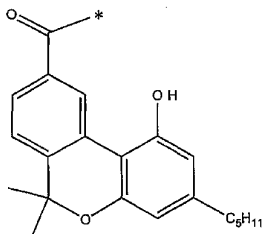
7. The synthetic tracer of claim 2, wherein the tracer has a general formula selected from a group consisting of the general formula as shown in Figures 3, 4, 5, 6, and 7 wherein

- (a) R is an extending group;
- 5 (b) X and Z are reactive groups; and
- (c) * is the label.

8. The synthetic tracer of claim 7, wherein R is selected from a group consisting of $-(CH_2)_n-$ and $C(O)-(CH_2)_nCO$ and wherein n represents a number from zero to about 15.

- 10 9. The synthetic tracer of claim 7, wherein X or Z, or both, are selected from a group consisting of O, NH, CO, HNC(SNH), CH₂, S, SO₂, an imino, an iminocarbonyl, a carbonyl, a carbonimidoyl, an iminosulfonyl, a sulfonyl, an iminocarbonimidoyl, a thiocarbonyldiimino, an iminocarbonyloxy, an iminothiocarbonyloxy, a (sulfonyliminocarbonyl)diimino, a triazinyl diimino, a
- 15 succinimidyl active ester (OSu) and an ethylene diamine (EDA).

10. The synthetic tracer of claim 2, wherein the label is attached at position 9 of the cannabinol molecule or its derivatives and the tracer has the general formula:



- 20 and wherein * is the label.

11. The synthetic tracer of claim 10, wherein the label is EDA-Cy5.

WO 02/073214

PCT/US02/06401

17

12. The use of the synthetic tracer of any of claims 1-11 in detecting cannabinoids and its metabolites in a sample.
13. The use in claim 12, wherein the synthetic tracer is used in conjunction with an antibody that is capable of binding to Δ^9 -THC or its metabolites.
- 5 14. An assay system for detecting cannabinoids or cannabinoid metabolites in a sample, the system comprising:
- (a) the synthetic tracer of any of claims 1-11; and
 - (b) a recognition molecule that is capable of binding to the tracer and to the cannabinoids or to the cannabinoid metabolites.
- 10 15. The assay system of claim 14, wherein the assay system is configured such that the cannabinoids or cannabinoid metabolites in the sample compete with the tracer for binding to the recognition molecule.
16. The assay system of claim 14, wherein the recognition molecule is selected from a group consisting of an antibody, a receptor for cannabinoids, a
15 receptor for cannabinoid metabolites, a receptor for Δ^9 -THC, and a receptor for Δ^9 -THC metabolites.
17. The assay system of claim 15, wherein the recognition molecule is bound to the tracer and wherein the cannabinoids or cannabinoid metabolites compete with the tracer for binding to the recognition molecule.
- 20 18. The assay system of claim 15, wherein the immunoassay is configured as a kinetic displacement assay.
19. The assay system of claim 15, wherein the antibody is immobilized on a solid support.
20. The assay system of claim 19, wherein the solid support is
25 selected from a group consisting of a resin, a bead, and a wall of the column.
21. The assay system of 16, wherein the antibody is capable of binding to Δ^9 -THC and its metabolites.
22. The assay system of claim 16, wherein the antibody has a lower binding affinity to the tracer than to the cannabinoids or to the cannabinoid metabolites.

WO 02/073214

PCT/US02/06401

18

23. The assay system of claim 22, wherein the tracer has about 14% to about 85% cross-reactivity to the antibody as compared to the cannabinoids or cannabinoid metabolites.
24. The assay system of any of claims 14-23, further comprising a
5 sensor for detecting the label.
25. A method for detecting cannabinoids and/or cannabinoid metabolites in a sample, the method comprising the steps of:
- (a) exposing a recognition molecule to the synthetic tracer of any of claims 1-11 to form a recognition molecule-tracer complex;
- 10 (b) contacting a sample suspected of containing cannabinoids or cannabinoid metabolites with the recognition molecule-complex; and
- (c) detecting the tracer that is displaced from the recognition molecule.
26. The method of claim 25, wherein the recognition molecule is
15 immobilized on a solid support.
27. The method of claim 25, wherein the step of contacting the sample with the recognition molecule-tracer complex further comprises the step of continuously flowing the sample past the recognition molecule-tracer complex under non-equilibrium conditions.
- 20 28. The method of claim 25, wherein the step of exposing the recognition molecule to the tracer results in substantially saturating binding sites on the recognition molecules with the tracer.
29. The method of claim 25, wherein the amount of displaced tracer
25 is directly proportional to the concentration of Δ^9 -THC and its metabolites in the sample.
30. The method of any of claims 25-29, wherein the sample is a biological sample.
31. The method of claim 30, wherein the biological sample is selected from the group consisting of saliva, whole blood, serum, plasma, hair, or urine.

WO 02/073214

PCT/US02/06401

19

32. The method of any of claims 25-29, wherein the sample is an aqueous sample.

33. The method of any of claims 25-29, wherein the recognition molecule is selected from a group consisting of an antibody, a receptor that binds cannabinoids, a receptor that binds cannabinoid metabolites, a receptor that binds Δ^9 -THC, and a receptor that binds to Δ^9 -THC metabolites.

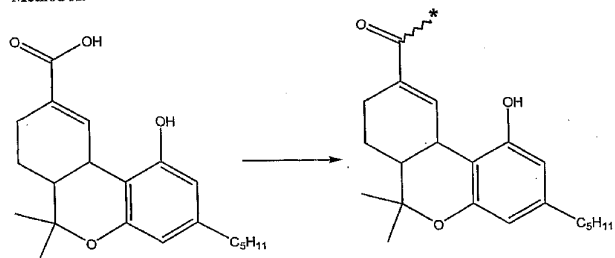
34. A column comprising:
a solid support;
an antibody immobilized to the solid support;
the synthetic tracer of any of claims 1-11 bound to the antibody.

35. The column in claim 34, wherein the solid support is selected from a group consisting of a resin, a bead, and a wall of the column.

36. The column in claim 34, wherein the antibody is capable of binding to Δ^9 -THC or its metabolites.

15

Method A:



Method B:

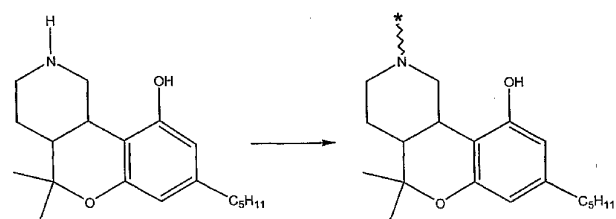


Fig. 1

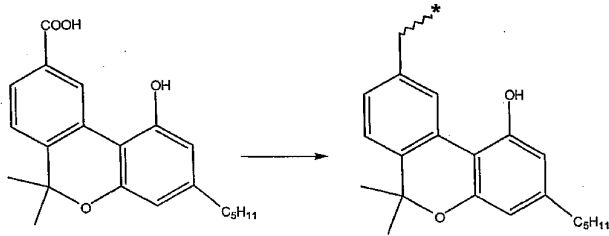


Fig. 2A

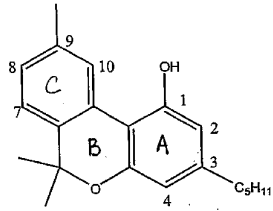


Fig. 2B

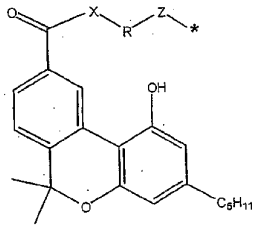


Fig. 3

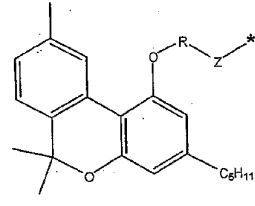


Fig. 4

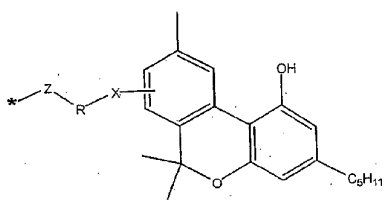


Fig. 5

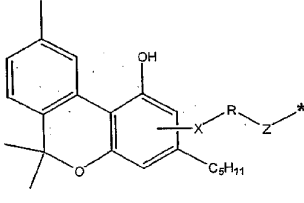


Fig. 6

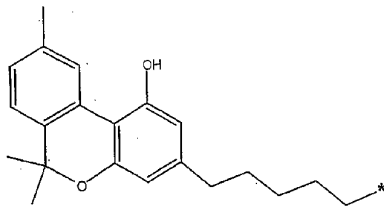


Fig. 7

WO 02/073214

4/8

PCT/US02/06401

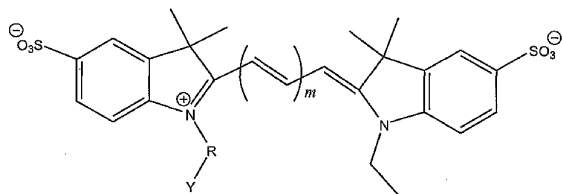


Fig. 8

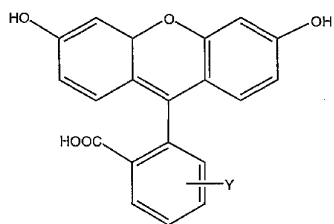


Fig. 9

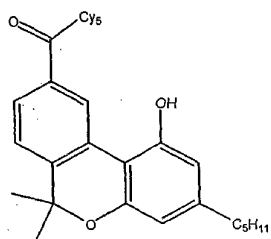


Fig. 10 Tracer GW6-25

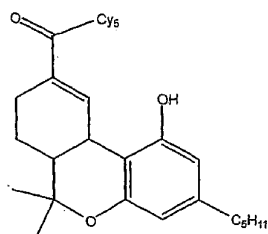


Fig. 11, GW5-51

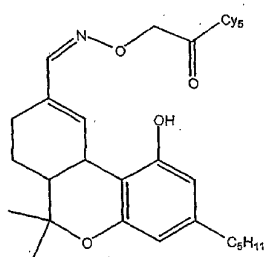
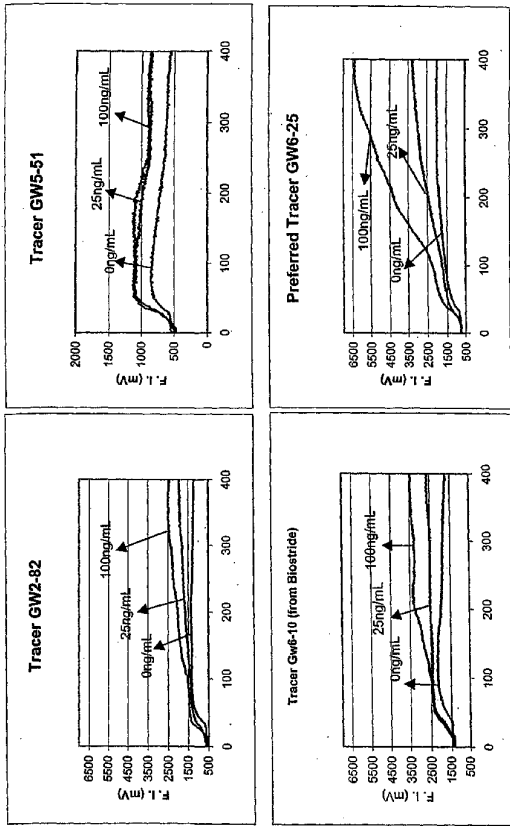


Fig. 12 Tracer Gw2-82

Fig. 13 Comparison of the Effect of Varied Tracers on Continuous Flow Displacement Immunoassay of Δ^9 -THC (Ab:T=1:1.2)



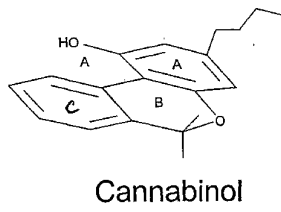
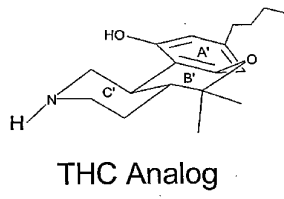
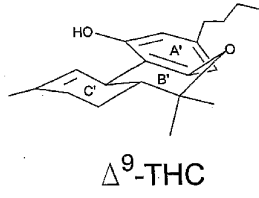


Fig. 14

WO 02/073214

8/8

PCT/US02/06401

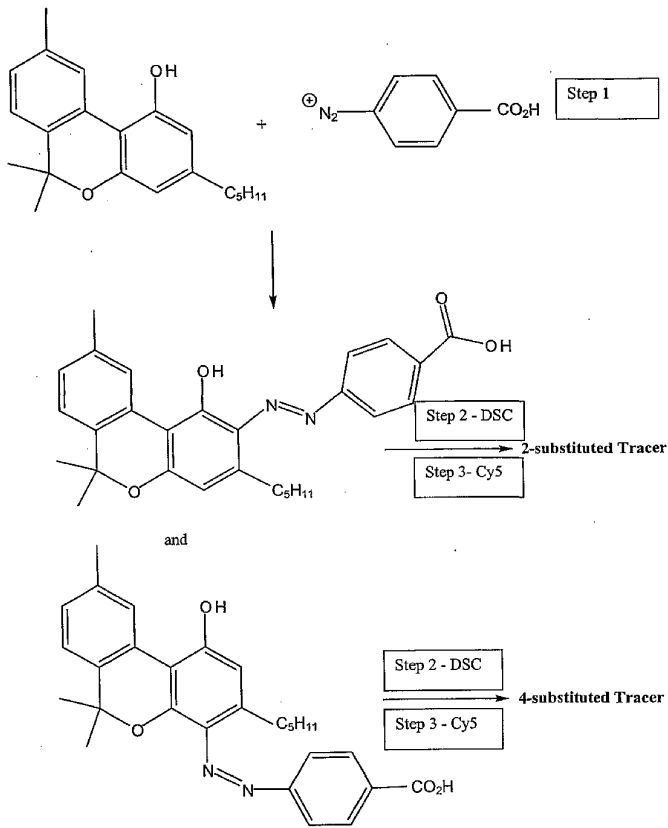


FIG. 15

【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
19 September 2002 (19.09.2002)

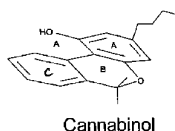
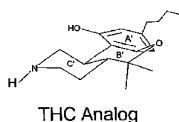
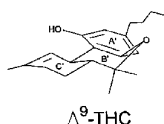
PCT

(10) International Publication Number
WO 02/073214 A3

- (51) International Patent Classification: **G01N 33/94**, 33/543 [CN/US]; 10400 Trademark Street, Rancho Cucamonga, CA 91730 (US). **FOLEY, Thomas** [IE/US]; 10400 Trademark Street, Rancho Cucamonga, CA 91730 (US).
- (21) International Application Number: PCT/US02/06401
- (22) International Filing Date: 28 February 2002 (28.02.2002)
- (25) Filing Language: English
- (26) Publication Language: English
- (30) Priority Data: 09/805,469 12 March 2001 (12.03.2001) 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**
- (81) Designated States (national): 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, GR, GU, 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, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG,
- (74) Agent: **TU, Samuel, N.**, Lyon & Lyon LLP, Suite 4700, 633 West Fifth Street, Los Angeles, CA 90071-2066 (US).

[Continued on next page]

(54) Title: NOVEL REAGENTS FOR DETECTING CANNABINOIDS



(57) Abstract: In this disclosure, novel cannabinol-based tracers suitable for use in immunoassays that detect cannabinoids in a biological sample are disclosed. These cannabinol-based tracers are particularly useful in a continuous flow displacement immunoassay. The disclosure also describes the processes for synthesizing the novel tracers, and the application of these tracers in fluorescence immunoassays for detecting and quantifying cannabinoids in biological samples. The cannabinol-based tracer has lower affinity for antibodies to Δ^9 -THC and is more effectively displaced when a THC containing sample is applied. This results in higher sensitivity.



WO 02/073214 A3

WO 02/073214 A3 

SI, SK, SL, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ,
VN, YU, ZA, ZM, ZW.

Published:
— with international search report

(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 (BF, BJ, CI, CG, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NI, SN, TD, TG).

(88) Date of publication of the international search report:
21 August 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.

【 國際調查報告 】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT		International Application No. PCT/US 02/06401
A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER IPC 7 G01N33/94 G01N33/543		
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) IPC 7 G01N C07D		
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 practical, search terms used)		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	US 5 264 373 A (WANG NAI-YI ET AL) 23 November 1993 (1993-11-23) cited in the application the whole document	1-3, 5-10, 12-22, 24-36
X	EP 0 027 567 A (HOFFMANN LA ROCHE) 29 April 1981 (1981-04-29) the whole document	1-3, 6, 7, 12-22, 24-36
X	US 5 183 740 A (KUSTERBECK ANNE W ET AL) 2 February 1993 (1993-02-02) cited in the application claims	1-3, 12-22, 24-36
<input type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of box C. <input checked="" type="checkbox"/> Patent family members are listed in annex.		
* Special categories of cited documents: *A* document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance *E* earlier document but 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 claimed *T* later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention *X* document of particular relevance, the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone *Y* 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. *Z* document member of the same patent family		
Date of the actual completion of the international search 6 December 2002		Date of mailing of the international search report 01.08.03
Name and mailing address of the ISA European Patent Office, P.B. 5618 Patentlaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel: (+31-70) 340-2200; Tx. 31 651 epo nl; Fax: (+31-70) 340-3016		Authorized officer Döpfer, K-P

INTERNATIONAL SEARCH REPORT	International application No. PCT/US 02/06401
Box I Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 1 of first sheet)	
This International Search Report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:	
1. <input type="checkbox"/>	Claims Nos.: because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:
2. <input checked="" type="checkbox"/>	Claims Nos.: 11 because they relate to parts of the International Application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful International Search can be carried out, specifically: see FURTHER INFORMATION sheet PCT/ISA/210
3. <input type="checkbox"/>	Claims Nos.: because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).
Box II Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 2 of first sheet)	
This International Searching Authority found multiple inventions in this International application, as follows:	
1. <input type="checkbox"/>	As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this International Search Report covers all searchable claims.
2. <input type="checkbox"/>	As all searchable claims could be searched without effort justifying an additional fee, this Authority did not invite payment of any additional fee.
3. <input type="checkbox"/>	As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this International Search Report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:
4. <input checked="" type="checkbox"/>	No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this International Search Report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.: 1-3, 6-9, 12-36 (all partially), 4, 5 (complete)
Remark on Protest	<input type="checkbox"/> The additional search fees were accompanied by the applicant's protest. <input type="checkbox"/> No protest accompanied the payment of additional search fees.

International Application No. PCT/US 02 06401

FURTHER INFORMATION CONTINUED FROM PCT/ISA/ 210

1. Claims: 1-3, 6-9, 12-36 (all partially), 4, 5 (complete)

Synthetic tracer comprising a cannabinol molecule or its derivative labelled with a fluorophore, assay systems for detecting cannabinoids, methods for detecting cannabinoids, columns comprising said tracers.

2. Claims: 1-3, 6-9, 12-36 (all partially)

Synthetic tracer comprising a cannabinol molecule or its derivative labelled with a chromophore, assay systems for detecting cannabinoids, methods for detecting cannabinoids, columns comprising said tracers.

3. Claims: 1-3, 6-9, 12-36 (all partially)

Synthetic tracer comprising a cannabinol molecule or its derivative labelled with a hapten, assay systems for detecting cannabinoids, methods for detecting cannabinoids, columns comprising said tracers.

4. Claims: 1-3, 6-9, 12-36 (all partially)

Synthetic tracer comprising a cannabinol molecule or its derivative labelled with a radiolabel, assay systems for detecting cannabinoids, methods for detecting cannabinoids, columns comprising said tracers.

5. Claims: 1-3, 6-9, 12-36 (all partially)

Synthetic tracer comprising a cannabinol molecule or its derivative labelled with a metal colloid, assay systems for detecting cannabinoids, methods for detecting cannabinoids, columns comprising said tracers.

6. Claims: 1-3, 6-9, 12-36 (all partially)

Synthetic tracer comprising a cannabinol molecule or its derivative labelled with an enzyme, assay systems for detecting cannabinoids, methods for detecting cannabinoids, columns comprising said tracers.

7. Claims: 1-3, 6-9, 12-36 (all partially)

Synthetic tracer comprising a cannabinol molecule or its derivative labelled with a chemiluminescent molecule, assay systems for detecting cannabinoids, methods for detecting cannabinoids, columns comprising said tracers.

International Application No. PCT/US 02 06401

FURTHER INFORMATION CONTINUED FROM PCT/ISA/ 210

8. Claims: 1-3, 6-9, 12-36 (all partially)

Synthetic tracer comprising a cannabinol molecule or its derivative labelled with a bioluminescent molecule, assay systems for detecting cannabinoids, methods for detecting cannabinoids, columns comprising said tracers.

International Application No. PCT/JS 02 06401

FURTHER INFORMATION CONTINUED FROM PCT/ISA/ 210

Continuation of Box I.2

Claims Nos.: 11

Claim 11 addresses a tracer with the label Cy5. This label is not disclosed in the application and the term "Cy5" has no defined meaning in the art, i.e. the subject-matter of claim 11 lacks disclosure and support in the sense of Articles 5 and 6 PCT. Thus, a meaningful search for this claim is not possible.

Present claims 1-3, 6, 7 relate to an extremely large number of possible compounds. Support within the meaning of Article 6 PCT and/or disclosure within the meaning of Article 5 PCT is to be found, however, for only a very small proportion of the compounds claimed. In the present case, the claims so lack support, and the application so lacks disclosure, that a meaningful search over the whole of the claimed scope is impossible. Consequently, the search has been carried out for those parts of the claims which appear to be supported and disclosed, namely those parts relating to the compounds addressed in the examples and figures as well as in claims 4, 5 and 10 (with the proviso of lack of unity).

Furthermore, present claims 3 and 7 relate to an extremely large number of possible compounds. In fact, the claims contain so many options that a lack of clarity within the meaning of Article 6 PCT arises to such an extent as to render a meaningful search of the claims impossible. Consequently, the search has been carried out for those parts of the application which do appear to be clear, namely those parts relating to the compounds addressed in the examples and figures as well as in claims 4, 5 and 10 (with the proviso of lack of unity).

Present claims 23 relate to a product defined by reference to a desirable characteristic or property, namely a cross-reactivity of about 14% to about 85% towards the antibody as compared to the cannabinoids or their metabolites.

The claim covers all products/compounds having this characteristic or property, whereas the application provides no support within the meaning of Article 6 PCT and/or disclosure within the meaning of Article 5 PCT. In the present case, the claims so lack support, and the application so lacks disclosure, that a meaningful search over the whole of the claimed scope is impossible. Independent of the above reasoning, the claims also lack clarity (Article 6 PCT). An attempt is made to define the product/compound by reference to a result to be achieved. Again, this lack of clarity in the present case is such as to render a meaningful search over the whole of the claimed scope impossible.

The applicant's attention is drawn to the fact that claims, or parts of claims, relating to inventions in respect of which no international search report has been established need not be the subject of an international preliminary examination (Rule 66.1(e) PCT). The applicant is advised that the EPO policy when acting as an International Preliminary Examining Authority is normally not to carry out a preliminary examination on matter which has not been searched. This is the case irrespective of whether or not the claims are amended following

International Application No. PCT/US 02 06401

FURTHER INFORMATION CONTINUED FROM PCT/ISA/ 210

receipt of the search report or during any Chapter II procedure.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT
Information on patent family members

International Application No
PCT/US 02/06401

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
US 5264373 A	23-11-1993	US 5144030 A	01-09-1992
		US 5463027 A	31-10-1995
		CA 1333904 A	10-01-1995
		DE 3855490 D	02-10-1996
		EP 0279308 A	24-08-1988
		ES 2093601 T	01-01-1997
		JP 2812945 B	22-10-1998
		JP 63216880 A	09-09-1988
		CA 2018712 A	12-12-1990
		EP 0402846 A	19-12-1990
		JP 3056475 A	12-03-1991
EP 0027567 A	29-04-1981	CA 1182828 A	19-02-1985
		DE 3062976 D	09-06-1983
		JP 56051471 A	09-05-1981
		US 4438207 A	20-03-1984
US 5183740 A	02-02-1993	CA 2076748 A	24-08-1991
		DE 69131274 D	01-07-1999
		DE 69131274 T	16-12-1999
		DK 517757 T	15-11-1999
		EP 0517757 A	16-12-1992
		JP 3149947 B	26-03-2001
		JP 5504625 T	15-07-1993
		KR 171392 B	15-05-1999
		WO 9113354 A	05-09-1991
		US 6245296 B	12-06-2001

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 0 1 N 33/543	G 0 1 N 33/543	5 7 5
G 0 1 N 33/545	G 0 1 N 33/545	A

(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, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VN, YU, ZA, ZM, ZW

(72) 発明者 トーマス・フォーリー
 アメリカ合衆国 カリフォルニア州 9 1 7 3 0 ランチョウ キュカモンガ トレイドマーク
 ストリート 1 0 4 0 0

(72) 発明者 コニー・チャン
 アメリカ合衆国 カリフォルニア州 9 1 7 3 0 ランチョウ キュカモンガ トレイドマーク
 ストリート 1 0 4 0 0

(72) 発明者 リアン・グレッグ
 アメリカ合衆国 カリフォルニア州 9 1 7 3 0 ランチョウ キュカモンガ トレイドマーク
 ストリート 1 0 4 0 0

(72) 発明者 アルバート・アピラ
 アメリカ合衆国 カリフォルニア州 9 1 7 3 0 ランチョウ キュカモンガ トレイドマーク
 ストリート 1 0 4 0 0

F ターム(参考) 2G045 AA37 BB14 BB51 CB07 DA72 FA11 FB03 FB06 FB07 FB12
 GC15 JA07
 2G054 AA06 AB07 BB04 BB08 CA30 CE02 EA03 FA27 FA50 GA04
 4C062 HH12

专利名称(译)	用于检测新大麻素的试剂		
公开(公告)号	JP2005506520A	公开(公告)日	2005-03-03
申请号	JP2002572424	申请日	2002-02-28
[标]申请(专利权)人(译)	点生命值公司		
申请(专利权)人(译)	点生命值公司		
[标]发明人	ワングオホン トーマスフォーリー コニーチャン リアングレグ アルバートアピラ		
发明人	ワン・グオホン トーマス・フォーリー コニー・チャン リアン・グレグ アルバート・アピラ		
IPC分类号	G01N33/53 C07D311/80 G01N21/78 G01N27/447 G01N33/50 G01N33/533 G01N33/543 G01N33/545 G01N33/94		
CPC分类号	G01N33/54306 G01N27/44726 G01N33/948 Y10S436/815		
FI分类号	G01N33/53.G C07D311/80 G01N21/78.C G01N33/50.G G01N33/533 G01N33/543.575 G01N33/545.A		
F-TERM分类号	2G045/AA37 2G045/BB14 2G045/BB51 2G045/CB07 2G045/DA72 2G045/FA11 2G045/FB03 2G045/FB06 2G045/FB07 2G045/FB12 2G045/GC15 2G045/JA07 2G054/AA06 2G054/AB07 2G054/BB04 2G054/BB08 2G054/CA30 2G054/CE02 2G054/EA03 2G054/FA27 2G054/FA50 2G054/GA04 4C062 /HH12		
代理人(译)	品川EiSatoshi		
优先权	09/805469 2001-03-12 US		
外部链接	Espacenet		

摘要(译)

在本公开中，公开了适用于检测生物样品中的大麻素的免疫测定的新型基于cannabinol的示踪剂。这些基于大麻酚的示踪剂在连续流动置换免疫测定中特别有用。本公开还描述了合成新型示踪剂的方法，以及这些示踪剂在荧光免疫测定中的应用，用于检测和定量生物样品中的大麻素。

