

(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2004-123692  
(P2004-123692A)

(43) 公開日 平成16年4月22日(2004.4.22)

(51) Int. Cl. <sup>7</sup>	F I	テーマコード (参考)
<b>C07C 233/47</b>	C O 7 C 233/47	4 B O 6 4
<b>C07C 237/22</b>	C O 7 C 237/22	4 C O 6 9
<b>C07D 207/404</b>	C O 7 D 207/404	4 H O O 6
<b>C07K 14/435</b>	C O 7 K 14/435	4 H O 4 5
<b>C07K 14/76</b>	C O 7 K 14/76	
審査請求 有 請求項の数 45 O L 外国語出願 (全 85 頁) 最終頁に続く		

(21) 出願番号 特願2003-49992 (P2003-49992)  
 (22) 出願日 平成15年2月26日 (2003.2.26)  
 (31) 優先権主張番号 10/087, 612  
 (32) 優先日 平成14年3月1日 (2002.3.1)  
 (33) 優先権主張国 米国 (US)

(特許庁注：以下のものは登録商標)  
 フロッピー

(71) 出願人 591003013  
 エフ. ホフマン-ラ ロシュ アーゲー  
 F. HOFFMANN-LA ROCHE  
 E AKTIENGESELLSCHAFT  
 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

(74) 代理人 100091096  
 弁理士 平木 祐輔  
 (74) 代理人 100118773  
 弁理士 藤田 節  
 (74) 代理人 100122389  
 弁理士 新井 栄一

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 化合物、抗体、試薬キット、抗体の製造方法、ならびに検体の検出方法

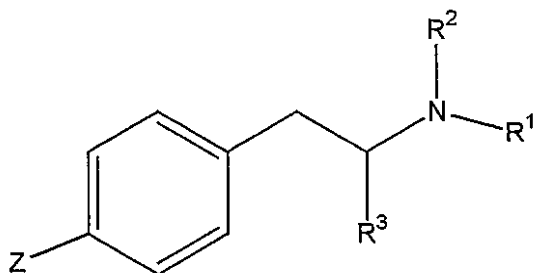
(57) 【要約】

【課題】

メチレンジオキシクラスのアンフェタミン誘導体に特異的な抗体の製造に有用なハプテン、中間体、および免疫原などの化合物に関する。メチレンジオキシクラスのアンフェタミン誘導体に特異的な抗体、メチレンジオキシクラスのアンフェタミン誘導体に特異的な抗体が入っている試薬キット、メチレンジオキシクラスのアンフェタミン誘導体に特異的な抗体の製造方法、およびメチレンジオキシクラスのアンフェタミン誘導体のメンバーを含有している検体の検出方法にも関する。

【解決手段】 構造

【化1】

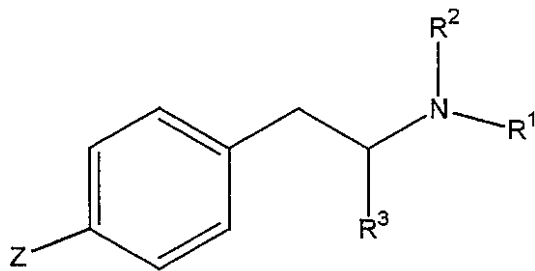


## 【特許請求の範囲】

## 【請求項 1】

構造

## 【化 1】



10

[ここで：

$R^1$  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、および保護基から構成される群から選択され；

$R^3$  は置換されていてもよいアルキル基であり；そして

$Z$  は  $-L-X-Q$  であり；

$L$  は 1 ~ 15 個の炭素原子および 0 ~ 6 個のヘテロ原子を含み；

$X$  は、 $-O-$ 、 $-CO-$ 、 $-NR^4-$ 、 $-S-$ 、 $-C(=NH)O-$ 、 $-NH(CO)$   
 $-$ 、 $-NH(CO)NH-$ 、 $-NH(CS)-$ 、 $-NH(CS)NH-$ 、 $-O(CO)N$   
 $H-$ 、 $-NH(C=NH)-$ 、およびマレイミドチオエーテルから構成される群から選択  
 され（式中  $R^4$  は、水素およびアルキル基から構成される群から選択される）；そし  
 て

20

$Q$  は、水素、ヒドロキシル、脱離基、マクロ分子キャリアー、および標識から構成され  
 る群から選択される]

を有する化合物。

## 【請求項 2】

前記マクロ分子キャリアーが、タンパク質、ポリペプチド、および多糖類から構成される  
 群から選択される、請求項 1 に記載の化合物。

## 【請求項 3】

前記タンパク質が、キーホールリンベットヘモシアニン、ウシ血清アルブミン、およびウ  
 シサイログロブリンから構成される群から選択される、請求項 2 に記載の化合物。

30

## 【請求項 4】

$R^2$  が保護基または水素である、請求項 1 に記載の化合物。

## 【請求項 5】

$L$  が 1 ~ 11 個の炭素原子を含む、請求項 4 に記載の化合物。

## 【請求項 6】

$L$  が  $-(CH_2)_j-$  であり、 $j$  が 1、2、3、4、5、または 6 である、請求  
 項 5 に記載の化合物。

## 【請求項 7】

$j$  が 3 であり、 $X$  が  $-CO-$  である、請求項 6 に記載の化合物。

40

## 【請求項 8】

$R^1$  がエチル、 $n$ -プロピル、および  $n$ -ブチルから構成される群から選択され、 $R^3$   
 がメチル、エチル、 $n$ -プロピル、および  $n$ -ブチルから構成される群から選択される  
 、請求項 7 に記載の化合物。

## 【請求項 9】

$Q$  が脱離基である、請求項 7 に記載の化合物。

## 【請求項 10】

$R^1$  がエチルであり、 $R^3$  がメチルである、請求項 7 に記載の化合物。

## 【請求項 11】

50

Q が脱離基である、請求項 10 に記載の化合物。

【請求項 12】

Q が N - オキシスクシンイミドを含む脱離基である、請求項 7 に記載の化合物。

【請求項 13】

Q が N - オキシスクシンイミドを含む脱離基である、請求項 10 に記載の化合物。

【請求項 14】

Q が、ヘモシアニン、グロブリン、アルブミン、および多糖類から構成される群から選択されるマクロ分子キャリアーである、請求項 7 に記載の化合物。

【請求項 15】

Q が、ヘモシアニン、グロブリン、アルブミン、および多糖類から構成される群から選択されるマクロ分子キャリアーである、請求項 10 に記載の化合物。 10

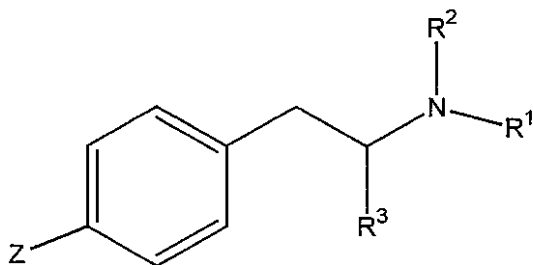
【請求項 16】

M D E A に特異的な抗体。

【請求項 17】

構造

【化 2】



20

[ここで:

$R^1$  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、および保護基から構成される群から選択され;

$R^3$  は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 であり;

L は 1 ~ 15 個の炭素原子および 0 ~ 6 個のヘテロ原子を含み;

X は、- O -、- CO -、-  $N R^4$  -、- 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から構成される群から選択され(式中  $R^4$  は、水素およびアルキル基から構成される群から選択される);そして 30

Q は、水素、ヒドロキシル、脱離基、マクロ分子キャリアー、および標識から構成される群から選択される]

を含む検体に特異的な抗体。

【請求項 18】

前記マクロ分子キャリアーが、タンパク質、ポリペプチド、および多糖類から構成される群から選択される、請求項 17 に記載の抗体。 40

【請求項 19】

前記タンパク質が、キーホールリンペットヘモシアニン、ウシ血清アルブミン、およびウシサイログロブリンから構成される群から選択される、請求項 17 に記載の抗体。

【請求項 20】

$R^2$  が保護基または水素である、請求項 17 に記載の抗体。

【請求項 21】

L が 1 ~ 11 個の炭素原子を含む、請求項 20 に記載の抗体。

【請求項 22】

L が - (CH<sub>2</sub>)<sub>j</sub> - であり、j が 1、2、3、4、5、または 6 である、請求 50

項 2 1 に記載の抗体。

【請求項 2 3】

j が 3 であり、X が -CO- である、請求項 2 2 に記載の抗体。

【請求項 2 4】

R<sup>1</sup> がエチル、n-プロピル、および n-ブチルから構成される群から選択され、R<sup>3</sup> がメチル、エチル、n-プロピル、および n-ブチルから構成される群から選択される、請求項 2 3 に記載の抗体。

【請求項 2 5】

R<sup>1</sup> がエチルであり、R<sup>3</sup> がメチルである、請求項 2 3 に記載の抗体。

【請求項 2 6】

Q が、ヘモシアニン、グロブリン、アルブミン、および多糖類から構成される群から選択されるマクロ分子キャリアーである、請求項 2 3 に記載の抗体。

10

【請求項 2 7】

Q が、ヘモシアニン、グロブリン、アルブミン、および多糖類から構成される群から選択されるマクロ分子キャリアーである、請求項 2 5 に記載の抗体。

【請求項 2 8】

請求項 1 6 に記載の抗体を含む試薬キット。

【請求項 2 9】

請求項 1 7 に記載の抗体を含む試薬キット。

【請求項 3 0】

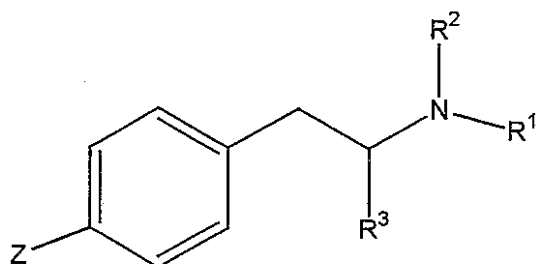
請求項 2 7 に記載の抗体を含む試薬キット。

20

【請求項 3 1】

宿主に、構造

【化 3】



30

[ここで：

R<sup>1</sup> は 2 ~ 6 個の炭素原子を含むアルキル基であり；

R<sup>2</sup> は、水素、アルキル基、および保護基から構成される群から選択され；

R<sup>3</sup> は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 であり；

L は 1 ~ 15 個の炭素原子および 0 ~ 6 個のヘテロ原子を含み；

X は、-O-、-CO-、-NR<sup>4</sup>-、-S-、-C(=NH)O-、-NH(CO)

-、-NH(CO)NH-、-NH(CS)-、-NH(CS)NH-、-O(CO)N

H-、-NH(C=NH)-、およびマレイミドチオエーテルから構成される群から選択

され(式中 R<sup>4</sup> は、水素およびアルキル基から構成される群から選択される)；そして

て

Q はマクロ分子キャリアーである]

を含む免疫原を接種する段階を有することを特徴とする抗体の製造方法。

【請求項 3 2】

R<sup>2</sup> が保護基または水素である、請求項 3 1 に記載の方法。

【請求項 3 3】

L が 1 ~ 11 個の炭素原子を含む、請求項 3 2 に記載の方法。

【請求項 3 4】

50

L が  $-(CH_2)_j-$  であり、j が 1、2、3、4、5、または 6 である、請求項 33 に記載の方法。

【請求項 35】

j が 3 であり、X が  $-CO-$  である、請求項 34 に記載の方法。

【請求項 36】

$R^1$  がエチル、n-プロピル、および n-ブチルから構成される群から選択され、 $R^3$  がメチル、エチル、n-プロピル、および n-ブチルから構成される群から選択される、請求項 35 に記載の方法。

【請求項 37】

$R^1$  がエチルであり、 $R^3$  がメチルである、請求項 35 に記載の方法。

10

【請求項 38】

Q が、ヘモシアニン、グロブリン、およびアルブミンから構成される群から選択されるマクロ分子キャリアーである、請求項 35 に記載の方法。

【請求項 39】

Q が、ヘモシアニン、グロブリン、およびアルブミンから構成される群から選択されるマクロ分子キャリアーである、請求項 37 に記載の方法。

【請求項 40】

サンプル中の検体を検出する方法であって：

サンプルを請求項 16 に記載の抗体と接触させる段階；

抗体を検体と結合させる段階；および

抗体および検体により生成された付加生成物を検出する段階、

を有することを特徴とする上記方法。

20

【請求項 41】

前記検体が、アンフェタミン、アンフェタミン誘導体、エクスタシー薬物、エクスタシー薬物誘導体、ならびにこれらの組み合わせから構成される群から選択される、請求項 40 に記載の方法。

【請求項 42】

前記エクスタシー薬物が MDEA である、請求項 41 に記載の方法。

【請求項 43】

サンプル中の検体を検出する方法であって：

サンプルを請求項 17 に記載の抗体と接触させる段階；

抗体を検体と結合させる段階；および

抗体および検体により生成された付加生成物を検出する段階、

を有することを特徴とする上記方法。

30

【請求項 44】

前記検体が、アンフェタミン、アンフェタミン誘導体、エクスタシー薬物、エクスタシー薬物誘導体、ならびにこれらの組み合わせから構成される群から選択される、請求項 43 に記載の方法。

【請求項 45】

前記エクスタシー薬物が MDEA である、請求項 44 に記載の方法。

40

【発明の詳細な説明】

【0001】

【発明の属する技術分野】

本発明は免疫学的アッセイに関し、さらに詳しくは、アンフェタミンの誘導体、特に「エクスタシー薬物」のための免疫学的アッセイに関する。

【0002】

【従来技術】

「エクスタシー薬物」と一般に知られている不法合成麻薬類の使用および乱用は近年大きく増加した。メチレンジオキシ-フェニル縮合環系を持つことで特徴づけら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

50

フェタミン) ; 「エクスタシー ( Ecstasy ) 」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 ) ; 「イブ ( Eve ) 」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 ) ; 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 ) ; および MDPA ( 3 , 4 - メチレンジオキシ - N - プロピルアンフェタミン ) が挙げられる。

【 0 0 0 3 】

これまで、エクスタシー薬物の検出方法は、元々アンフェタミンおよび/またはメトアンフェタミンの検出用に開発された免疫学的アッセイが主に関係してきた。かかるアッセイによるエクスタシー薬物の検出は、エクスタシー薬物とアンフェタミンおよび/またはメトアンフェタミン抗体との間に偶然の一致で存在するかも知れない限られた交差反応性に依存する。そのようなアッセイにより得られた肯定的な結果はなお、どの特定の物質あるいはメチレンジオキシクラスの誘導体のメンバーがサンプル中に存在するかを示さない場合がある。

10

【 0 0 0 4 】

一般に、アンフェタミンおよびメトアンフェタミン免疫学的アッセイはエクスタシー薬物に対し比較的鈍感で非特異的である。かかるアッセイは MDEA ( 「イブ」 ) 誘導体に対して特に限られた認識を示す。

【 0 0 0 5 】

【 発明が解決しようとする課題 】

本発明は、メチレンジオキシ ( MD ) クラスのエクスタシー薬物のメンバーを検出するために従来 of アンフェタミンおよび/またはメトアンフェタミンの免疫学的アッセイを用いることに関する、これらおよび他の問題を改善することに向けられている。

20

【 0 0 0 6 】

【 課題を解決するための手段 】

上記課題は本明細書の特許請求の範囲に記載の本発明により解決される。

【 0 0 0 7 】

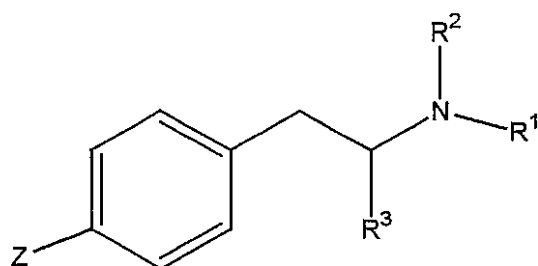
本発明の範囲は特許請求の範囲によってのみ明確にされるのであって、この「課題を解決するための手段」にある記述によっていささかも影響されるものでない。

【 0 0 0 8 】

簡潔に述べると、本発明の特徴を具現する化合物は構造

30

【 化 4 】



40

[ ここで  $R^1$  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、および保護基から構成される群から選択され ;  $R^3$  は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。  $R^1$  がエチル、プロピル、またはブチルであるのが好ましく、さらに好ましいのは  $R^1$  がエチルである。  $L$  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から構成される群から選択される ( 式中  $R^4$  は、水素およびアルキル基から構成される群から選択される )。  $Q$  は、水素、ヒドロキシル、脱離基、マクロ分子キャリアー、および標識から構成される群から選択され

50

る。]  
を有する。

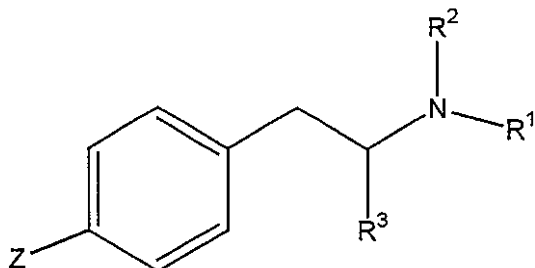
【0009】

本発明の特徴を具現する第1の抗体は M D E A に特異的である。

【0010】

本発明の特徴を具現する第2の抗体は、構造

【化5】



10

[ここで  $R^1$  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、および保護基から構成される群から選択され； $R^3$  は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。 $R^1$  がエチル、プロピル、またはブチルであるのが好ましく、さらに好ましいのは  $R^1$  がエチルである。 $L$  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から構成される群から選択される（式中  $R^4$  は、水素およびアルキル基から構成される群から選択される）。 $Q$  は、水素、ヒドロキシル、脱離基、マクロ分子キャリアー、および標識から構成される群から選択される。]

20

を有する検体に特異的である。

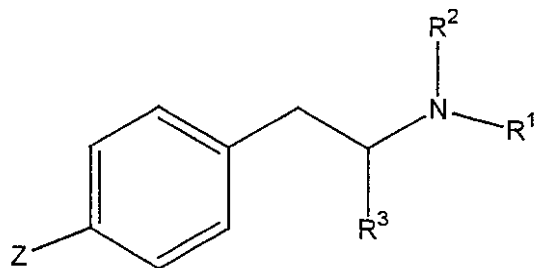
【0011】

本発明の特徴を具現する試薬キットは上記したタイプの抗体を含む。

【0012】

本発明の特徴を具現する抗体の製造方法は、宿主に、構造

【化6】



40

[ここで  $R^1$  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、および保護基から構成される群から選択され； $R^3$  は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。 $R^1$  がエチル、プロピル、またはブチルであるのが好ましく、さらに好ましいのは  $R^1$  がエチルである。 $L$  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から構成される群から選択される（式中  $R^4$  は、水素およびアルキル基から構成される群から選択される）。 $Q$  はマクロ分子

50

キャリアーである。]

を含む免疫原を接種する段階を有する。

【0013】

本発明の特徴を具現する、サンプル中の検体を検出する方法は、サンプルを上記したタイプの抗体と接触させる段階、抗体を検体と結合させる段階、および抗体および検体により生成された付加生成物を検出する段階、を有する。

【0014】

【発明の実施の形態】

MDクラスのアンフェタミン誘導体に特異的な抗体の製造に有用な化合物（例えば、ハブテン、中間体）および免疫原、MDクラスのアンフェタミン誘導体に特異的な抗体、MDクラスの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クラスのアンフェタミン誘導体に特異的な抗体の製造方法、およびMDクラスのアンフェタミン誘導体のメンバー（即ち、エクスタシー薬物）を含む検体の検出方法が発見された。以下に記載する。

10

【0015】

本発明の特許請求の範囲および発明の詳細な説明を通して、用語の定義は以下の通りとする：「免疫原」とは、生体に免疫反応を誘起させることができる物質を意味する。

【0016】

「コンジュゲート」とは、2つの部分が1つに結合することにより生成される物質を意味する。本発明の代表的なコンジュゲートとしては、小分子と大分子（例えばタンパク質）が1つに結合することにより生成されるコンジュゲートが挙げられる。「コンジュゲート」は「免疫原」を包含するものとする。

20

【0017】

「ハブテン」とは、典型的には分子量が低い免疫原の一部分を意味し、それ自身は抗体の産生を刺激しない。

【0018】

「活性ハブテン」とは、ハブテンをキャリアー、免疫原、標識、トレーサー、あるいはその他の部分構造と結合するのに用いることができる、利用可能な反応部位（例えば、反応性部分構造を持つ結合基（linking group）の付加により）が備わっているハブテンを意味する。

30

【0019】

「結合基」（または「リンカー（linker）」）とは、ハブテンをマクロ分子キャリアー、免疫原、標識、トレーサーまたはその他の部分構造と結合させるのに用いられる化学部分構造を意味する。結合基の使用は、その特定のハブテンおよびキャリアーならびに所望の抗体の特異性に応じて、有利であるかまたは必要とされることもあるし、そうでないこともある。好適なリンカーとしては、直鎖、分枝鎖、飽和、または不飽和の炭素鎖が挙げられるが、これらにはその鎖内に1以上のヘテロ原子（即ち、炭素以外の原子、例えば、酸素、窒素、硫黄など）が組み込まれていてもよいし、あるいはその末端上および/または末端で置換されていてもよい。

【0020】

「キャリアー」および「マクロ分子キャリアー」とは、ハブテンと結合して免疫原を生成することができる高分子量の物質を意味する。好適なマクロ分子キャリアーとしては、異質として認識されそれによって宿主から免疫応答を誘起させるタンパク質、糖タンパク質、ポリマー、多糖類、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。

40

【0021】

「ポリペプチド」とは、アミド結合を介する2つ以上のアミノ酸の結合により生成される化合物を意味する。代表的なポリペプチドとしては、 $\alpha$ -アミノ酸のポリマーが挙げられるが、この場合各非末端アミノ酸残基の $\alpha$ -アミノ基が線状鎖中で隣接する残基の $\beta$ -カルボキシル基に結合している。高分子量のポリペプチドは「タンパク質」とよばれる。

50

## 【0022】

「標識」とは、検体を検出するためにキャリアー物質または分子に付けることができる識別用の目印を意味する。標識は、結合性または架橋性部分構造によりそのキャリアー物質に直接または間接的に付けることができる。好適な標識としては、酵素（例えば、 $\beta$ -ガラクトシダーゼ、ペルオキシダーゼなど）、蛍光化合物（例えば、ローダミン、フルオレセインイソチオシアネートまたはFITC、他）、発光性化合物（例えば、ジオキセタン、ルシフェリンなど）、放射性同位元素（例えば、 $^{125}\text{I}$ ）、タンパク質結合性パートナー（例えば、ビオチン）、ならびに同様なものが挙げられるが、これらに限定されるものではない。

## 【0023】

「抗体」（略して「Ab」）とは、免疫原またはその一部分に結合することができる特定のタンパク質を意味する。抗体は、注射により宿主（例えば、動物またはヒト）に導入しておくこともできる免疫原に反応して産生される。一般名称「抗体」はポリクローナル抗体、モノクローナル抗体および抗体断片を包含する。

10

## 【0024】

「検体」とは、その存在または量が測定されるべき物質または物質の集団を意味する。本明細書で用いる場合、「検体」は、抗体に結合することができる化合物を意味する「抗原」を包含する。さらに、本明細書で用いる場合、「検体」とは、限定するものではないが、コンジュゲート、免疫原、薬物、薬物誘導體、ホルモン、タンパク質、ならびにこれらに類似のものを含めたあらゆる種類の化学物質を意味する。代表的なエクスタシー薬物検体としては、MDA、MDMA、MDEA、MDPA、BDB、MBDB、ならびにこれらに類似のものが挙げられる。

20

## 【0025】

「誘導體」とは、親化合物から1以上の化学反応により生成された化学化合物を意味する。

## 【0026】

「リガンド」とは、例えば競合免疫学的アッセイに用いることができるもののような、抗体に対する結合能に関し検体と同様にふるまう物質または物質の集団を意味する。代表的なリガンドとしては、薬物、薬物誘導體、これらの異性体、ホルモン、ポリペプチド、ヌクレオチド、およびこれらに類似のものが挙げられるが、これらに限定されるものではない。

30

## 【0027】

「検体を検出する」とは、通常は検体、そして特にはエクスタシー薬物を測定するための定量的、半定量的、または定性的な方法の意味する。例えば、単にサンプル中のエクスタシー薬物の存在の有無を検出する方法も、そのサンプル中の薬物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、本発明の範囲に入る。「検出する」、「測定する」、「識別する」、ならびにこれらに類似のものは、本明細書中では同意語として用いられ、すべて本発明の範囲に入る。

## 【0028】

「試薬キット」とは、アッセイを行うのに用いられる材料のアセンブリーを意味する。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または別々の容器に、また液体または凍結乾燥形態で、パックされた組み合わせとして提供され得る。キットに提供されている試薬の量および割合は、特定の用途に対し至適な結果を与えるように選択できる。本発明の特徴を具現する試薬キットはエクスタシー薬物に特異的な抗体を含んでいる。キットはさらに検体のリガンド、ならびに検量および対照材料を含みうる。本試薬は液体形態のままでもよいしあるいは凍結乾燥してもよい。

40

## 【0029】

「検量および対照材料」とは、測定すべき検体の既知量を含む標準または参照材料を意味する。検体を含んでいると疑われるサンプルおよびそれに対応する検量材料は同じような条件下でアッセイが行なわれる。検体の濃度は、未知の試料に対して得られた結果を

50

標準の試料に対して得られた結果と比較することにより算出される。これは一般には、図8に示されているような検量線を作成することにより行なわれる。

【0030】

「アルキル基」とは、直鎖、分枝、環式、非環式、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、およびこれらに類似のもの、ならびにこれらの組み合わせが挙げられるが、これらに限定されるものではない。

【0031】

「置換されていてもよい」とは、アルキル基への1以上の置換基の任意的な付加を意味する。

10

【0032】

「脱離基」とは、基質の化学部分構造であって、それと反応させる試薬で置換できるものを意味する。好適な脱離基としては、ハロゲン化物、メシラート、トシラート、アルコキシ、第四級アンモニウム塩、およびこれらに類似のものが挙げられるが、これらに限定されるものではない。現状で好ましい実施形態で用いるのに好ましい脱離基は活性エステル（例えば、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）により提供され、この場合カルボニル炭素に付いている、エステルの酸素含有部分が反応で置換される。

【0033】

「保護基」とは、反応性原子または中心につけられてその通常の反応性を変える部分構造を意味する。好適な保護基としては、専門書 *Protective Groups in Organic Synthesis, 3rd Edition by Theodora W. Greene and Peter G. M. Wuts (John Wiley & Sons, Inc., New York, 1999)* (この文献の全内容は参照により本明細書に組み入れるものとする)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く、またもし本出願と一致しない開示または定義がある場合は、本明細書にある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が当技術分野で知られているが(例えば、上記を参照されたし)、その中でもトリフルオロアセチルが、現時点で好ましいとされる窒素保護基である。

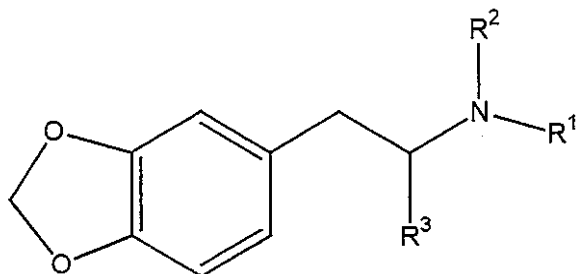
20

30

【0034】

本発明の特徴を具現する化合物は、エクスタシー薬物に特異的な抗体の製造において中間体、ハプテン、または免疫原として有用である。本発明の特徴を具現する化合物の第1のシリーズは構造 I :

【化7】



40

[ここで  $R^1$  は - J - M - T であり;  $R^2$  は、水素、アルキル基、および保護基から構成される群から選択され; そして  $R^3$  は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 - 、 - C O - 、 - N R<sup>4</sup> - 、 - S - 、 - C ( = N H ) O - 、 - N H ( C O ) - 、 - N H ( C O ) N H - 、 - N H ( C S ) - 、 - N H ( C S ) N H - 、 - O ( C O ) N H - 、 - N H ( C = N

50

H - ) -、およびマレイミドチオエーテルから構成される群から選択される（式中  $R^4$  は水素およびアルキル基から構成される群から選択される）。T は、水素、ヒドロキシル、脱離基、マクロ分子キャリアー、および標識から構成される群から選択される。 $R^2$  が水素であり且つ  $R^3$  がメチルである場合は  $R^1$  は、 $-CH_2CN$ 、 $-CH_2C=CH_2$ 、 $-CHO$ 、 $-CH_2CH_2OH$ 、 $-CH_2CH_2OCH_3$ 、または  $-CH_2CH$ ではない。] を有する。

【0035】

マクロ分子キャリアーは、タンパク質、ポリペプチド、および多糖類から構成される群から選択するのが好ましい。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（ウシサイログロブリン）が挙げられる。アルキル基は、直鎖または分枝鎖であって、1～15個の炭素原子、さらには1～11個の炭素原子、なおさらには1～9個の炭素原子を有しているのが好ましい。

10

【0036】

この第1のシリーズの好ましい実施形態では、J が  $-(CH_2)_k-$  を含み、k が1、2、3、4、5、または6、さらにはk が3であるのが好ましい。さらにM が  $-CO-$  であるのが好ましい。 $R^2$  が水素、メチル、エチル、n-プロピル、またはn-ブチルであるのが好ましく、さらには  $R^2$  が水素であるのが好ましい。 $R^3$  が水素、メチル、エチル、n-プロピル、またはn-ブチルであるのが好ましく、さらには  $R^3$  がメチルであるのが好ましい。T は、N-オキシスクシンイミド、ヘモシアニン、グロブリン、およびアルブミンから構成される群から選択するのが好ましく、さらにはT は、KLH、BSA、およびBTGから構成されるタンパク質の群から選択するのが好ましい。

20

【0037】

図1は、この第1のシリーズの好ましい実施形態の化合物および免疫原を合成するための代表的なスキームを示す。この代表的な合成スキームにおいて、出発原料、試薬、個々の合成変換反応、および反応条件は全く説明のためのものであって、限定のためのものではないことを理解すべきである。図示されているものとは全く別の出発原料に基づく合成を含めて、別の合成製法を、本特許請求の範囲の思想と範囲から逸脱することなく開発することができる。

30

【0038】

図1に示されているように、合成はエクスタシー薬物メチレンジオキシアンフェタミン（MDA）2から始める。2の第一級アミノ基と4-プロモ-酪酸エチルエステルを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適当なアミノ保護基を用いて保護する。図1に示されているように、4のアミノ基はトリフルオロアセチル化して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構造の加水分解によりカルボン酸誘導体8を得、これをN-ヒドロキシスクシンイミド（NHS）との反応でエステル化して活性エステル誘導体10を得る。活性エステル誘導体10をマクロ分子キャリアー部分構造 [ T ]（例えば、KLH、BTG、BSA）と反応させて、脱保護して、そして透析して免疫原12を得る。

40

【0039】

図1の化合物6、8、10、および12では、上記の好ましい部分構造  $-(CH_2)_3-$  および  $-CO-$  はそれぞれ J および M に対応するが、この合成に示されている特定の化合物は純粋に説明のためであって、図1に描かれている合成方法を改変して実質的に異なる化学構造を有する化合物を製造できることを強調しておきたい。例えば、図1に示されているアルキル化剤 4-プロモ-酪酸エチルエステルは、脱離基（例えば、臭素）を末端官能基（例えば、そのエチルエステル）から分け隔てるもっと多くのあるいは少ない連続メチレン単位をもつ試薬と置き換えできる。同様にこれらの末端間を分け隔てる炭素鎖は、ヘテロ原子、置換、不飽和、またはこれらと同様なものを含むことが

50

できる。さらに、このアルキル化工程をとおして導入された官能基（即ち、4 - プロモ - 酪酸エチルエステルのエチルエステル部分構造）は、例えばアルコール類、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（例えば、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、およびこれらに類似のものを含めて、またこれらに限定されるものではないが、様々な代替の部分構造によって、あるいは、当技術分野で十分確立されているように、1以上の合成変換反応によりその部分構造に変換することができるこれら部分構造の官能基前駆体で置き換えることができる。

## 【0040】

図1に描かれている合成方法は、MDA2に含まれるアミノ基のアルキル化をとおして - J - M - T 部分構造を導入するが、既に窒素を含んでいるメチレンジオキシ - フェニル環系を反応させていくこの方法は純粋に説明のためであり、そして数多くの別の方法をこれに代えて用いることができることを強調しておきたい。例えば、MDA2のアミノ基の代わりに脱離基を含むメチレンジオキシ - フェニル環系をアミノ含有求核試薬と、あるいはアミノ基の前駆体（例えば、アジド、シアニドなど）を含んでいる求核試薬と反応させることができる。事実、アミノ基の代わりに脱離基を含んでいるMDA2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と、即ち  $\text{NH}_2 - (\text{CH}_2)_3 - \text{CO}_2\text{Et}$  と、反応させると、これもまた、異なるルートで化合物6を生成すると考えられる。例えば、限定するものではないが、Comprehensive Organic Transformations, 2<sup>nd</sup> Edition by Richard C. Larock (Wiley-VCH, New York, 1999) および March's Advanced Organic Chemistry, 5<sup>th</sup> Edition by Michael B. Smith and Jerry March (John Wiley & Sons, Inc., 2001)、およびこれらの中で引用されている文献、のような論文に記載されているものを含めて、当技術分野で知られている全ての化学変換反応の方法は、本好ましい実施形態で用いることができると考えられる。

## 【0041】

図1に示されている代表的な合成反応を変更するのに有用となると思われる変換反応としては、決して限定するものではないが、Fischer エステル化反応、その他の活性エステルの調製（例えば、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マー、およびこれらに類似のものを用いて）、酸化反応（例えば、アルコール類、アミン類、チオール類、チオエーテル類の、あるいはバイヤー - ビリガー酸化 (Baeyer-Villiger oxidation) など）、還元反応（例えば、ニトロ基の還元、カルボニル基の環元、水素化など）、アミノ基の保護（例えば、カルバメートアミド類、N - アルキルアミン類、N - アリールアミン類、イミン類、エナミン類、N - ヘテロ原子誘導体、およびこれらに類似のもの）および対応する脱保護、縮合反応（例えば、アルドール、クライゼン (Claisen)、クネベナーゲル (Knoevenagel) など）、1, 4 - 付加反応（例えば、マイケル (Michael) 反応、コーリー - ホワイトサイド - ハウス有機銅酸化物結合 (Corey-Whitesides-House organocuprate coupling) など）、1, 2 - 付加反応（例えば、グリニャール (Grignard) 反応、カルボニル還元など）、ニトリルの還元、アルコールの脱保護、カルボン酸の脱保護、ケトンの脱保護、アルデヒドの脱保護、アジドの還元、イミンの還元、ならびにこれらに類似のもの、が挙げられる。

## 【0042】

本発明の特徴を具現する化合物の第2のシリーズは構造 II :

## 【化8】

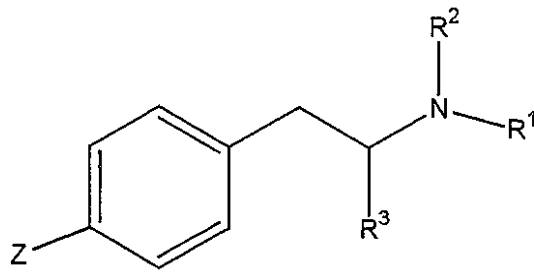
10

20

30

40

50



II

[ここで：R<sup>1</sup> は 2～6 個の炭素原子を含むアルキル基であり；R<sup>2</sup> は、水素、アルキル基、および保護基から構成される群から選択され；R<sup>3</sup> は、置換されていて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<sup>4</sup>-、-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から構成される群から選択される（式中 R<sup>4</sup> は、水素およびアルキル基から構成される群から選択される）。Q は、水素、ヒドロキシル、脱離基、マクロ分子キャリアー、および標識から構成される群から選択される。]

を有する。

## 【0043】

マクロ分子キャリアーは、タンパク質、ポリペプチド、および多糖類から構成される群から選択するのが好ましい。好適な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（ウシサイログロブリン）が挙げられる。前記アルキル基は、直鎖または分枝鎖であり、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 個の炭素原子を有するのが好ましい。

## 【0044】

この第2のシリーズの好ましい実施形態では、L を構成する炭素原子および任意のヘテロ原子は制限されるものではなく、直鎖、分枝、環式、および非環式系を含み得る。L は、-(CH<sub>2</sub>)<sub>j</sub>-（式中 j は、1、2、3、4、5、または 6 であるのが、さらに好ましくは j は 3 であるのが好ましい）を含んでなるのが好ましい。さらに、X は -CO- であるのが好ましい。R<sup>1</sup> は、エチル、n-プロピル、または n-ブチルであるのが好ましく、また R<sup>1</sup> がエチルであるのがもっと好ましい。R<sup>2</sup> は、水素または保護基であるのが好ましく、そして R<sup>2</sup> が、トリフルオロアセチル基のような保護基であるのがもっと好ましい。R<sup>3</sup> は、水素、メチル、エチル、n-プロピル、または n-ブチルであるのが好ましく、そして R<sup>3</sup> はメチルであるのがもっと好ましい。Q は、ヒドロキシ、N-オキシスクシンイミド、ヘモシアニン、グロブリン、およびアルブミンから構成される群から選択するのが好ましく、そして Q は KLH、BSA、および BTG から構成されるタンパク質の群から選択するのがもっと好ましい。

## 【0045】

図2は、この第2のシリーズの好ましい実施形態の化合物および免疫原を合成するための代表的なスキームを示す。この代表的な合成スキームにおいて、出発原料、試薬、個々の合成変換反応、および反応条件は全く説明のためのものであって、限定のためのものではないことを理解すべきである。図示されているものとは全く別の出発原料に基づく合成を含めて、別の合成製法を、本特許請求の範囲の思想と範囲から逸脱することなく開発することができる。

## 【0046】

図2に示されているように、合成は 1-メチル-2-フェニル-エチルアミン14で始

10

20

30

40

50

まる。14のアミノ基を臭化エチルでアルキル化して N - エチルアミン誘導体 16 を得る。16のアミノ基を適当なアミノ保護基を用いて保護する。図2に示されているように、16のアミノ基をトリフルオロ無水酢酸 ( T F A A ) でトリフルオロアセチル化する。トリフルオロアセチル化誘導体 18 をフリーデル - クラフツ ( F r i e d e l - C r a f t s ) 型反応で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の還元により還元生成物 22 を得、これを N - ヒドロキシスクシンイミド ( N H S ) との反応によりエステル化して活性エステル誘導体 24 を得る。活性エステル誘導体 24 をマクロ分子キャリアー部分構造 [ Q ] ( 例えば、K L H、B S A、B T G ) と反応させ、窒素を塩基性条件下で脱保護し、そして透析して免疫原 26 を得る。あるいは、図3に示すように、活性エステル誘導体 24 を、例えば 4 - アミノメチル安息香酸との反応によりさらに反応させて安息香酸誘導体 32 を得る。安息香酸誘導体 32、および 32 から N - ヒドロキシスクシンイミドとの反応により得られる活性エステル誘導体 34 は、本発明の各種コンジュゲート、標識、およびこれらに類似のものの合成に有用な中間体である。図3に示されている合成方法 ( 即ち、アミノ安息香酸の導入 ) は、図1に示されているタイプのメチレンジオキシ化合物にも容易に用いることができる ( 例えば、活性エステル誘導体 10 を 4 - アミノメチル - 安息香酸と反応させることにより ) 。

10

#### 【0047】

図2の化合物 22、24、および 26 では、上記の好ましい部分構造  $- ( C H _ 2 ) _ 3 -$  および  $- C O -$  はそれぞれ L および X に対応するが、この合成に示されている特定の化合物は純粋に説明のためであって、図2に描かれている合成方法を改変して実質的に異なる化学構造を有する化合物を製造できることを強調しておきたい。例えば、図2に示されている無水コハク酸は、もっと多くあるいはもっと少ない環炭素原子および/または環ヘテロ原子 ( これら自身、置換されていてもよいし、不飽和を含むことができる ) を有する環式無水物、あるいはそれに類似のもので置き換えることができる。さらに、フリーデル - クラフツアシル化剤としては環式無水物を用いる必要もない。非環式試薬 ( 例えば、ハロゲン化アシル、カルボン酸、ケテンなど ) を用いることもできる。さらに、図2に示されているフェニル環の構造を反応させていくのに、フリーデル - クラフツアシル化反応を用いる必要もない。限定するものではないが、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、およびこれらに類似のものを含めて、多数の代替の求電子的芳香族置換を用いることもできる。同様に、フリーデル - クラフツアシル化工程を通して導入された官能基 ( 即ち、化合物 20 および 22 に示されている末端カルボン酸部分構造 ) は、例えば、限定するものではないが、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 ( 例えば、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、およびこれらに類似のものを含めて様々な代替の部分構造で置き換えることができる、またはそれらに変換することができる、あるいは、当技術分野で十分確立されているように、1以上の合成変換反応によりその部分構造に変換することができるこれら部分構造の官能基前駆体で置き換えることができる。

20

30

40

#### 【0048】

図2に描かれている合成方法は、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通して  $- L - X - Q$  部分構造を導入するものであるが、求電子的置換により既に存在しているフェニル環をさらに反応させていくこの方法は純粋に説明のためであって、これに代えているいろいろな代替の方法を用いることができると考えられることを強調しておきたい。例えば、アミノ含有側鎖に対しパラの位置でハロゲン ( 例えば、C l、B r、I ) で置換されたフェニル環は、当技術分野で周知の方法を用いて、有機金属試薬 ( 例えば、グリニャール、有機リチウム、有機スタナン、有機ボラン、有機銅酸化物 ( o r g a n o c u p r a t e )、またはこれらに類似のもの ) に変換し、そのあと求電子的試薬と反応させて炭素 - 炭素結合を形成させることができる。あるいは、アミノ含有側鎖に対しパ

50

ラの位置で適当な脱離基（例えば、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方法を用いて、求核芳香族置換反応をさせることができる。さらには、フェニル環の置換パターンは、完全飽和のまたは部分不飽和のシクロヘキサン環系（またはその前駆体）上に生成させることも考えられ、そしてこれは、例えば、限定するものではないが水素化触媒（例えば、Pt、Pd、Niなど）、S および Se、キニーネ、ならびにこれらに類似のものなどの、当技術分野で周知の試薬を用いて芳香族化される。

【0049】

図1に示されている合成スキームに関連して上記したように、当技術分野で知られている全ての化学変換反応の方法は本好ましい実施形態で用いることができると考えられる。図2に示されている代表的な合成の変更になるとと思われる変換反応としては、決して限定するものではないが、図1の合成スキームに関連して上記で明らかにされたもの、ならびにウォルフ-キシナー（Wolff-Kishner）還元、クレメンゼン（Clemmensen）還元、ヒドラゾンの還元（例えば、LiAlH<sub>4</sub>、NaBH<sub>4</sub>、NaBH<sub>3</sub>CN、またはこれらに類似のもの）、およびこれらに類似のものが挙げられる。

10

【0050】

本発明の特徴を具現する第1の抗体はエクスタシー薬物に対して特異的である。エクスタシー薬物は、MDA、MDMA、MDEA、MDPA、BDB、MBDB、ならびにこれらの組み合わせから構成される群から選択するのが好ましい。

【0051】

本発明の特徴を具現する第2の抗体は MDEA に対し特異的である。

20

【0052】

本発明の特徴を具現する第3の抗体は、上記で示されまた説明された構造 I または II を含んでなる検体（即ち、免疫原、コンジュゲート、またはその他の化学物質）に対し特異的である。

【0053】

上述の好ましい実施形態の第1のシリーズからの免疫原、即ち、メチレンジオキシ-フェニル縮合環系（例えば、図1）を含んでなる化合物のシリーズは、例えば、限定するものではないが、MDA、MDMA、MDEA、MDPA、BDB、MBDB、ならびにこれらを組み合わせたものなどのエクスタシー薬物に対して特異的な抗体を製造するのに有用である。図4に示されている表1は、エクスタシー薬物、特に融合番号3からの、そして特に Ab 2.1.1（これは、図1の免疫原12に応答して産生された抗体であり、この場合 T は K L H である）に対して特異的ないくつかの抗体の交差反応データを示している。当技術分野で十分確立されているタイプの古典的免疫化プロトコルを用いてこのデータを得た。表1において、略記号 dAM は d-アンフェタミンを表わし、略記号 dMA は d-メトアンフェタミンを表わし、略記号 IAM は I-アンフェタミンを表わし、略記号 IMA は I-メトアンフェタミンを表わし、略記号 Ses はセサミンを表わし、略記号 Phen はフェンテルミンを表わし、略記号 Tyr はチラミンを表わし、略記号 Pseu はプソイドエフェドリンを表わし、略記号 Eph はエフェドリンを表わし、略記号 PPA はフェニルプロパノールアミンを表わし、略記号 nEpn はノルフェドリンを表わし、略記号 Adr はアドレナリンを表わし、略記号 Ran はラニチジン（Glaxo Wellcome より商品名 ZANTAC で発売されており、Warner-Lambert Consumer Healthcare, Morris Plains, NJ から販売されている）を表わす。

30

40

【0054】

図5の競合阻害プロットに示されているように、免疫原12（例えば、T が K L H であるもの）によって誘導された抗体はエクスタシー薬物に対し良好な応答と特異性を示している。さらに、図6の競合阻害プロットに示されているように、これらの抗体は関連薬物には殆どあるいは全く交差反応性を示さない。図6において、略記号 dAMP

50

は d - アンフェタミンを表わし、略記号 I A M P は I - アンフェタミンを表わし、略記号 S m i n はセサミンを表わすが、略記号 I M A、d M A、および P h e n は上記の表 1 で記載したのと同じ意味を有する。

【 0 0 5 5 】

表 2 は、T が K L H である図 1 の免疫原 1 2 に応答して産生された抗体 M D M A - 2 . 1 . 1 に対する交差反応性データを示している。標準であるメトアンフェタミンの結合に 5 0 % の低下をもたらす薬物の濃度 ( E D 5 0 ) を決定し、その E D 5 0 でそれぞれのその他の薬物の E D 5 0 を割り、そしてその結果を 1 0 0 で乗ずることにより、表 2 に示されている交差反応性のパーセントを計算することができる。このデータを得るのに用いた抗体は、当技術分野で十分確立されているタイプの古典的免疫法

10

【 0 0 5 6 】

表 2 : 各種薬物に対する M D M A - 2 . 1 . 1 の交差反応性

薬物	交差反応性 %
d - M D M A	1 0 0
M D E A	2 0 4
M D A	6 0 . 6
M B D B	2 6 . 1
B D B	2 0 . 5
M D P A	3 6 5
d - A M P	0
d - M A M P	0 . 6 5
I - A M P	0
I - M A M P	0
セサミン	0
フェンテルミン	0
チラミン	0
ブ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
ノルピネフリン	0
アドレナリン	0
ラニチジン ( Z A N T A C )	0

20

30

【 0 0 5 7 】

上記した好ましい実施形態の第 2 のシリーズからの免疫原、即ち、縮合メチレンジオキシ - フェニル環系のない化合物のシリーズは、限定するものではないが、M D A、M D M A、M D E A、M D P A、B D B、M B D B、ならびにこれらを組み合わせたものなどのエクスタシー薬物に特異的な抗体を製造するのに有用である。この第 2 のシリーズの N - エチル置換免疫原 ( 即ち、構造 I I の R <sup>1</sup> がエチルである ) に応答して産生される抗体は、従来のアンフェタミンおよびメトアンフェタミンの免疫学的アッセイでは通常十分に検出できなかったエクスタシー薬物 M D E A ( 「イブ」 ) に対し特に高い認識を示す。このようにして産生された抗体は、既存のアンフェタミンまたはメトアンフェタミンアッセイにおいて検出を向上させるための追加抗体として、あるいは M D クラスの薬物の免疫学的アッセイにおける M D E A に対する別の抗体として用いることができる。

40

【 0 0 5 8 】

表 3 は、Q が K L H である図 2 の免疫原 2 6 に応答して産生させられた抗体 N E A M P - 1 . 3 に対する交差反応性データを示している。上述した手順により、表 3 に示されている交差反応パーセントは算出できる。このデータを得るのに用いた抗体は古典的免疫プロトコルを用いて製造することができる。

50

## 【0059】

表3：各種薬物に対する NEAMP-1.3 の交差反応性  
薬物 交差反応パーセント

d - メトアンフェタミン	100
I - メトアンフェタミン	検出せず
d - アンフェタミン	32.5
I - アンフェタミン	33.5
MDMA	114
MDEA	507
MBDB	20
フェンジメトラジン	0.6
ブソイドエフェドリン	2.0
I - エフェドリン	6.7
ラニチジン (ZANTAC)	0.2

10

## 【0060】

N - エチル置換免疫原26 (例えば、Q が K L H である場合) により誘導された抗体は、図7の競合阻害プロットにより示されているように、一般にエクスタシー薬物に対して、そして特に MDEA に対して良好な応答および特異性を示す。図7では、略記号 d Meth は d - メトアンフェタミンを表わし、そして略記号 I meth は I - メトアンフェタミンを表わす。

20

## 【0061】

本発明の特徴を具現する試薬キットは、本発明の特徴を具現する抗体を含んでなる。代表的な試薬キットは、エクスタシー薬物に特異的な抗体および、エクスタシー薬物のリガンドを含む複合体または標識部分構造に結合されたその誘導体を含んでなり得、また、エクスタシー薬物または関連標準の既知量を含む1以上の検量物質も任意に含んでなり得る。

## 【0062】

本発明の特徴を具現する抗体は、その利用方法の説明書と一緒に、キット、容器、パック、またはディスペンサーの中に入れておくことができる。抗体をキットに入れて提供する場合、免疫学的アッセイの異なる成分は別々の容器にパックし、使用する前に混ぜるということでよい。このように各成分を別々にパックすると、活性成分の機能を実質的に減少させることなく長期の貯蔵を可能にし得る。さらに、試薬を不活性環境下 (例えば、窒素ガス、アルゴンガス、またはこれらに類似のものの正圧下) にパックすることもでき、これは空気および/または水分に敏感な試薬に対しては特に好ましい。

30

## 【0063】

本発明の特徴を具現するキットに含まれる試薬は、その異なる成分の各活性が実質的に維持され、同時に各成分がそれ自身容器の材質により実質的に吸収または変質されないならば、あらゆる種類の容器に入れて提供することができる。好適な容器としては、限定するものではないが、アンプル、ボトル、試験管、バイアル、フラスコ、シリンジ、封筒 (例えば、ホイルで裏張りされた)、およびこれらに類似のものが挙げられる。容器は、限定するものではないが、ガラス、有機ポリマー (例えば、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 (例えば、アルミニウム)、金属合金 (例えば、鋼)、コルク、およびこれらに類似のものなどの適切な材料から構成される。加えて、容器には、セプタムにより提供され得るもののような、1個以上の滅菌アクセスポート (例えば、ニードルを介してのアクセス用に) がついていてもよい。セプタム用の好ましい材料としては、ゴムおよび、DuPont (Wilmington, DE) により商品名 T E F L O N で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。さらに、容器は、取り除くことで各成分の混合を起こさすことができるパーティションまたはメンブレンにより仕切られている2以上のコンパートメントを有し得る。

40

## 【0064】

50

本発明の特徴を具現する試薬キットには説明用資料をつけてもよい。説明書は印刷（例えば、紙面上に）されていてもよいし、また／あるいは電子的に読み取り可能な媒体（例えば、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）に入れて提供されてもよい。あるいは、ユーザーをインターネットウェブサイトにも、また／あるいは電子メールを通じて案内することで、説明書を提供してもよい。

【0065】

先述したように、本発明の特徴を具現する試薬キットは、測定すべき検体の既知量を含んでいる検量用または対照用材料を含んでいてもよい。検体の濃度は、サンプルに対して得られた結果を、標準に対して得られた結果と比べることにより算出することができる。検量曲線を作成し、これを用いることで結果の一式を相関させることができ、そしてサンプル中の検体の濃度を決定することができる。図8は、改変ロッシュオンラインフォーマット(modified Roche ONLINE formats)および試薬およびAb MDMA 2.1.1(即ち、TがKLHである免疫原12から誘導された抗体)を用いた場合のヒタチアナライザー(HITACHI Analyzer)における曲線を示す。

10

【0066】

本発明の特徴を具現する検体検出方法は、サンプルを本発明の特徴を具現する抗体と接触させる段階、抗体を検体に結合させる段階、および抗体と検体とにより生成された付加生成物を検出する段階を有してなる。

20

【0067】

検体含有しているのではないかと疑われるサンプルを、本好ましい実施形態の方法により分析することができる。望ましいならサンプルを予備加熱することができるし、またアッセイに干渉しないいかなる都合のよい媒体中においても調製することができる。サンプルは、例えば宿主からの体液のような水性媒体からなるのが好ましい。代表的な体液としては、限定するものではないが、尿、全血、血漿、血清、唾液、精液、便、痰、脳脊髄液、涙液、粘液、およびこれらに類似のもの、ならびにこれらの組み合わせが挙げられる。体液は、血漿、血清、または尿からなるのが好ましい。

【0068】

抗体が固相に結合されているアッセイおよび抗体が液体媒体中にあるアッセイを含めて、抗体を用いるあらゆる種類の免疫学的アッセイを本好ましい実施形態において用いることが考えられることは理解すべきである。本発明の特徴を具現する抗体を用いて、検体を検出するのに用いることができる免疫学的アッセイの方法としては、限定するものではないが、以下が挙げられる：サンプル中の標識検体と検体が抗体に対して競合する競合(試薬限定的)アッセイ；抗体が標識化されている単一部位免疫定量アッセイ(single-site immunometric assay)；捕捉抗体(capture antibody)(即ち、固相に付着している抗体)が抗原の最初のエピトープに結合し、そして検出抗体(detecting antibody)(即ち、標識抗体)がこの抗原-捕捉抗体複合体に結合する二部位免疫定量(試薬過剰)アッセイ(two-site immunometric assay)；およびこれらに類似のもの。

30

40

【0069】

各種の免疫学的アッセイを行う方法は当技術分野では十分確立されており、例えばThe Immunnoassay Handbook, 2<sup>nd</sup> Edition edited by David Wild(Nature Publishing Group, 2000)(これの全内容を参照により本明細書に組み入れるものとする)などの多数の論文および刊行物に述べられている。但し、本出願と一致しない開示あるいは定義がある場合は、本明細書中の開示あるいは定義が優先するものとする。

【0070】

本発明の特徴を具現する抗体の製造方法は、宿主に、本発明の特徴を具現する免疫原を接種する段階を有してなる。好適な宿主としては、限定するものではないが、マウス、ラッ

50

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、ならびに成熟免疫応答を見せることができる種が挙げられる。用いる免疫化方法は当技術分野で十分確立されており、例えば上記で引用した *The Immunoassay Handbook, 2<sup>nd</sup> Edition* などの多数の論文および刊行物、ならびにそれらの中で引用されている文献に述べられている。

#### 【0071】

本発明の特徴を具現する免疫原は、アジュバント（免疫強化剤）と組み合わせて宿主被験体（例えば、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、限定するものではないが、フロイントアジュバント（*Freund adjuvant*）、粉末水酸化アルミニウム（ミョウバン）、ボルデテラ属百日咳菌と一緒にし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。

10

#### 【0072】

ポリクローナル抗体は、アジュバントと一緒に任意追加的に投与され得る免疫原の1以上の注射により、哺乳動物宿主中で生じ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み合わせ）が哺乳動物宿主に1回または複数回の皮下または腹腔内注射により注入される。この免疫プログラムは少なくとも1週間に亘って、そしてより好ましくは2週間以上に亘って行うのが好ましい。このようにして産生されたポリクローナル抗体は単離され、当技術分野で周知の方法を用いて精製される。

#### 【0073】

モノクローナル抗体は、十分確立されているケーラーとミルシュタイン（*Koehler and Milstein*）のハイブリドーマ法（例えば、*Nature*, 1975, 256, pp. 495 - 497）により製造することができる。ハイブリドーマ法は典型的には以下の段階を有する：（1）宿主または宿主からのリンパ球を免疫化する段階；（2）モノクローナル抗体を分泌する（または分泌する能力を有する）リンパ球を回収する段階；（3）このリンパ球を不朽化された（*immortalized*）細胞に融合する段階；および（4）所望のモノクローナル抗体を分泌する細胞を選択する段階。

20

#### 【0074】

宿主を免疫化して免疫原に対し特異的な抗体を産生するまたは産生する能力を有するリンパ球を誘導することもできる。あるいは、リンパ球はインビトロで免疫化することができる。もしヒト細胞が求められているのであれば、他の哺乳動物源からの脾臓細胞またはリンパ球が好ましいけれども、末梢血リンパ球（*PBL*）を用いることができる。

30

#### 【0075】

リンパ球を不朽化細胞株と融合させてハイブリドーマ細胞を形成させることができるが、この工程は融合助剤（例えば、ポリエチレングリコール）を用いることにより促進することができる。具体例として、形質転換により不朽化された変異齧歯動物、ウシ、またはヒトの骨髓腫細胞を用いることができる。融合されていない不朽化細胞（*unfused immortalized cells*）とは対照的に、ハイブリドーマ細胞の実質的に純粋な個体群が好ましい。従って、例えば、酵素ヒポキサンチンゲアニンホスホシルトランスフェラーゼ（*HGPRT* または *HPRT*）を欠く変異骨髓腫細胞を用いて、融合のあと、融合していない不朽化細胞の増殖または生存を阻害する適当な培地中で、これらの細胞を増殖することができる。このような例においては、ヒポキサンチン、アミノプテリンおよびチミジンをその培地に加えることで（*HAT* 培地）、*HGPRT* - 欠陥細胞の増殖を妨げる一方で、ハイブリドーマを増殖させることができる。

40

#### 【0076】

不朽化細胞は、効率的に融合し、*HAT* のような培地中における淘汰により雑多の個体群から単離することができ、そして融合のあと安定且つ高レベルの抗体の発現を維持するものが好ましい。好ましい不朽化細胞株としては、*American Type Culture Collection*（*Manassas, VA*）から入手可能な骨髓腫細胞株が挙げられる。

50

## 【0077】

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、その培養培地を、MDクラスのアンフェタミン誘導体に特異的なモノクローナル抗体の存在に関してアッセイすることができる。免疫沈降またはインビトロ結合アッセイ〔例えば、ラジオイミュノアッセイ(RIA)または酵素結合免疫吸着測定(ELISA: enzyme-linked immunosorbent assay)]を用いることで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。

## 【0078】

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法で単クローンとして単離し、そして継代培養することができる。好適な培養培地としては、限定するものではないが、Dulbecco社のModified Eagle's Medium、RPMI-1640、およびポリペプチド不含有もしくはポリペプチド低減型または無血清培地〔例えば、Biowhitaker(Walkersville, MD)から入手可能なUltra-DOMA PFまたはHL-1)が挙げられる。あるいは、ハイブリドーマ細胞を腹水としてインビボで増殖させることもできる。

10

## 【0079】

モノクローナル抗体は在来のIg精製法、例えば、限定するものではないが、ポリペプチドA-セファローズ、ヒドロキシルアパタイトクロマトグラフィー；ゲル電気浸透；透析；硫酸アンモニウム沈降；およびアフィニティークロマトグラフィーなどにより、培養培地または腹水液から単離および/または精製することができる。

20

## 【0080】

また、例えば米国特許第4,166,452号に記載されているもののような遺伝子組換え法によりモノクローナル抗体を製造することもできる。在来の方法を用いて(例えば、ネズミ重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、エクスタシー薬物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株から単離されたDNAを調べることで、モノクローナル抗体をコードするDNAを単離し、配列決定することができる。この単離されたDNA断片を、発現ベクターにサブクローニングしその後宿主細胞(例えば、さもなければ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、または骨髄腫細胞)の中にトランスフェクトしてモノクローナル抗体を発現

30

## 【0081】

## 【実施例】

以下の、本発明の特徴を具現する免疫原の代表的な調製方法およびエクスタシー薬物に対するハイブリドーマの製造方法は、説明のためだけに提供するものであって、特許請求の範囲またはそれと均等なもの限定を意図するものではない。

40

## 【0082】

実施例共通事項

特に断らない限り、試薬はAldrich Chemical Co.(Milwaukee, WI, USA)から入手した。また特に断らない限り、溶剤は、JT BakerまたはFisher Scientificから入手し、ACSまたはHPLCグレードまたはそれ以上であった。塩化メチレン( $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ )は、水素化カルシウムを用いた蒸留により脱水させた。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た蒸留により脱水させた。脱水ジメチルホルムアミド(

50

DMF)を、密封 SURESEAL ボトルの形で 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 のフラッシュグレード (flash-grade) のシリカゲル (カタログ番号 9385-9; Silica gel 60; 230-400 mesh 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 (カタログ番号 5715-7; 厚み 0.025 cm) を用いて行った。「KPi」は、リン酸カルシウム緩衝液を意味する。混合溶媒は、容量パーセントとして容量で表わされる (例えば、10% MeOH-CHCl<sub>3</sub> または CHCl<sub>3</sub> 中 10% MeOHとは、メタノールを 10容量% 含有するクロロホルムである)。

10

【0083】

代表的合成方法

MDA 誘導体 4 の合成

a) 塩化メチレン (CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>) 中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 700 mg を、炭酸水素ナトリウム (NaHCO<sub>3</sub>) 飽和水溶液 (略して sat. aq.) と一緒にして十分振盪した。得られた層を分離し、水性層を追加の CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> で、抽出される有機物質が無視できる程度となるまで繰り返し抽出した。合わせた有機層を減圧下で乾燥するまで蒸発させ (ロータリーエバポレータ - ; 略して rotovap)、その後さらに高真空下でしばらく乾燥させて、メチレンジオキシアンフェタミンの遊離塩基 408 mg を油状物として得た。

20

【0084】

b) 脱水ジメチルホルムアミド (DMF) 5 mL 中遊離塩基 2 400 mg の溶液に、4-プロモブチル酸エチルエステル (Fluka Chemical Co.) 387 μL (1.2 モル当量) を加え、反応をアルゴン下、室温 (略して RT) で、一晚 (略して O.N.) 攪拌した。反応混合物を CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> 20 mL で希釈し、NaHCO<sub>3</sub> 飽和水溶液 25 mL と一緒に攪拌し、各層を分離し、水性層を CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> 50 mL、次いで酢酸エチル (EtOAc) 50 mL で抽出し、有機抽出物を合わせ、硫酸ナトリウム (Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>) 上で脱水させ、減圧下 (rotovap) で蒸発させ、そして残渣を高真空 (マニホールド) 下で乾燥させて生成物 4 520 mg (<sup>1</sup>H-NMR により約 90% の純度であることが示された) を得た。この物質をこれ以上精製することなく次の工程で用いた。

30

【0085】

水性クエンチ後の同様な反応の抽出から得られる物質から、<sup>1</sup>H-NMR により、生成物 4 が少量の二置換生成物と一緒に HBr 塩として存在していることが示された。シリカゲルクロマトグラフィー精製 [第1カラム: クロロホルム (CHCl<sub>3</sub>) 中 20% メタノール (MeOH) を溶離液として; 第2カラム: EtOAc-MeOH-アセトン-水 (6:1:1:1) を溶離液として] により純粋な生成物 4 を得た。マススペク: M-H、292。

【0086】

6 の合成

アルゴン下で且つ ~ 0 (アイスバス) に冷却された、脱水 CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> 中粗生成物 4 500 mg およびトリエチルアミン 950 μL (4 モル当量) の溶液に、トリフルオロ無水酢酸 (TFAA) 289 μL (1.2 モル当量) を加えた。反応を、一晚攪拌しながら RT まで昇温させた。反応を CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> で容量 50 mL に希釈し、水 (2 x 50 mL)、sat. aq. NaHCO<sub>3</sub> (2 x 50 mL)、sat. aq. 塩化ナトリウム (NaCl) (1 x 50 mL) で洗浄し、Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 上で脱水させ、蒸発させ (rotovap)、そして高真空下で乾燥させて粗生成物 ~ 730 mg を得た。この物質を、シリカゲル上のクロマトグラフィーにかけ、ヘキサン中 30% EtOAc で溶出して生成物 6 449 mg を薄青色の液体として得た。マススペク (M+H): 実測値、389.1449; 計算値、389.1450。

40

50

## 【0087】

## 8の合成

THF 2 mL および 3 規定 (3N) 過塩素酸 2 mL 中 6 445 mg の溶液を、アルゴン下 50 (オイルバス) で、4.5 時間攪拌した。反応物を水 75 mL 中に流し込み、この混合物を EtOAc (2 x 50 mL) で抽出を行い、この有機抽出物を水で洗浄し、脱水 (Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>) させ、そして蒸発 (rotovap) させて粗生成物 416 mg を得た。この物質をシリカゲル上のクロマトグラフィーにかけ、CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> 中 5% MeOH で溶出させ、生成物を含有する分画を合わせ、蒸発 (rotovap) させ、そして高真空下で乾燥させて生成物 8 320 mg を崩壊性泡状物として得た。低分解能質量分析 (Low Resolution Mass spec): (M+H): 実測値、362.1。高分解能質量分析: (M+N a): 実測値、384.1024; 計算値、384.1035。 10

## 【0088】

## 10の合成

アルゴン下にある脱水 CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> 20 mL 中 8 310 mg の溶液を、N-ヒドロキシスクシンイミド 296 mg (3 モル当量) で、続いて 1-エチル-3-(3-ジメチルアミノプロピル)カルボジイミド ヒドロクロリド (EDC·HCl) (Sigma Chemical Co.) 329 mg (2 モル当量) で処理し、その後 RT で O.N. 攪拌した。反応物を水 (1 x 20 mL)、sat. aq. NaHCO<sub>3</sub> (2 x 20 mL)、sat. aq. NaCl (1 x 20 mL) で洗浄し、脱水 (Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>) させ、そして蒸発 (rotovap) させた。残渣をシリカゲル上のクロマトグラフィーにかけ、ヘキサン中 30% EtOAc で溶出を行い、生成物分画を合わせ、そして蒸発 (rotovap) を行った。残渣を脱水 CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> 中に再溶解させ且つ再蒸発 (x6) させ、次いで高真空下で乾燥させて NHS エステル誘導体 10280 mg を白色~無色崩壊性泡状物として得た。High Res Mass Spec: (M+H): 実測値、459.1381; 計算値、459.1379。 20

## 【0089】

## MDMA 免疫原 12 (T = KLH; 12a) の合成

アイス-ウォーターバス中で冷却されている pH 7.5 の 50 mM KPi 13 mL 中 キーホールリンペットヘモシアニン (KLH) 220 mg の攪拌溶液に、ジメチルスルホキシド (DMSO) 4.33 mL を滴下で加えて、25% DMSO-KPi 中の KLH 溶液を得た。1.58 mL (タンパク質 ~ 20 mg に相当) を、対照として使用するために採取した。残りのものに、DMSO 合計 1.5 mL 中に溶解された 10 26 mg (KLH 中のリシン当たり ~ 0.6 当量) の溶液を加え、~ 31% DMSO-KPi 中の 10 と KLH との反応を起こさせた。アイスバスを取り外し、反応物 (ストッパー付きフラスコ) を一晩攪拌した。乳白灰色の反応物を透析チュービング (カットオフ MW 15,000; Spectra Por 7) に移し、30% DMSO-KPi / RT (3 x 1.1 L)、15% DMSO-KPi / RT、その後 KPi (1 x 2.2 L / RT -> ~ 4 ; 5 x 2.2 L / ~ 4 ) に対して透析を順次行った (全ての KPi は pH 7.5 の 50 mM KPi であった)。対照用 KLH もまた透析チュービング (カットオフ MW 15,000; Spectra Por 7) に移し、別個に 30% DMSO-KPi に対して透析を行い、その後 15% DMSO-KPi に下げる時に免疫原と共に同じ透析容器中に入れた。不透析液 (retentate) 1 mL をリシン改変の程度を決定するために取り出した。残りのものを、50 mM K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> (4 x 2.2 L / RT / 2 日) に対して、その後 KPi (4 x 2.2 L / ~ 4 ) に対して透析を行った。アミンの脱保護を、pH 13 の緩衝液 (KOH で pH 13 に塩基性化された 50 mM K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>) に対して RT で ~ 7 日間再透析を行い、その後 pH 7.5 の KPi 50 mM (3 回 30

交換)中に逆透析を行うことにより完了して MDMA 免疫原 12 (T = KLH ; 12a) をほとんど無色の透明な溶液として得た。クーマシーブルー (Coomassie Blue) タンパク質アッセイ (改変ブラッドフォードアッセイ (modified Bradford assay)) (Biorad Laboratories (Hercules, CA, USA)) によりタンパク質 1.9 mg/mL を得た。脱保護されていない免疫原 (上記参照) に関するトリニトロベンゼンスルホン酸 (TNBS) アッセイ (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% が改変されていたという結果を得た。

#### 【0090】

##### MDMA コンジュゲート 12 (T = BSA ; 12b) の合成

アイスウォーターバス中で冷却されている pH 7.5 の 50 mM KPi 1 mL 中ウシ血清アルブミン (BSA) (Pentex Fraction V ; Miles Inc., Kankakee, IL, USA) 0.55 g の攪拌溶液に DMSO 4.0 mL を滴下で加えた。必要な場合対照として用いるために、得られた ~27% DMSO-KPi 中の BSA 溶液から 1.36 mL (BSA ~0.05 g を含有している) を抜き出した。残った溶液に、合計 0.6 mL の DMSO に溶解されている 108.2 mg (~2.4 モル当量) を加え、30% DMSO-KPi 中の 10 と BSA の混合物を得た。アイスウォーターバスを取り外し、反応物をストッパー付きのフラスコ中で一晩攪拌した。この透明な反応物を透析チュービング (カットオフ MW 15,000 ; SpectraPor 7) に移し、そして 30% DMSO-KPi / RT (1.1 L)、15% DMSO-KPi / RT (1.1 L)、KPi / RT (1x1.1)、次いで 50 mM K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> (4x1.1 L / RT / 2 日) に対してそのあと KPi (4x2.2 L / ~4) (全ての KPi は pH 7.5 で 50 mM であった) に対して順次透析を行った。対照用 KLH もまた透析チュービング (カットオフ MW 15,000 ; SpectraPor 7) に移し、そして別個に 30% DMSO-KPi に対して透析を行い、そのあと 15% DMSO-KPi に下げるときに免疫原と共に同じ透析容器に入れ、そして平行して進めた。ここにおける不透析液 (retentate) の一部の分析を行ったところ、タンパク質濃度が 18.9 mg/mL (クーマシーブルータンパク質アッセイ) であり、ハプテンによる置換が ~1.6 (対照 BSA に対する、Difference UV) であった。アミンの脱保護を、pH 13 の緩衝液 (KOH で pH 13 に塩基性化された 50 mM K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>) に対して RT で ~4 日間再透析を行い、そのあと pH 7.5 の 50 mM KPi (4 回交換) 中に逆透析を行うことで完了し、MDMA コンジュゲート 12 (T = BSA ; 12b) を無色透明な溶液として得た。タンパク質濃度を UV (コンジュゲートの OD<sub>280</sub> は、親 BSA の OD<sub>280</sub> [= 1 mg/mL で 0.6] と略同じとした) により測定したところ、約 1.9 mg/mL のタンパク質であった。

#### 【0091】

##### N-エチルアンフェタミン 16 の合成

d-アンフェタミンサルフェート (Sigma Chemical Co., St. Louis, MO, USA) 5.0 g を、CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> 100 mL および 1N NaOH 30 mL で処理し、そして 15 分間激しく攪拌した。各層を分離し、水性部分を CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> 25 mL で抽出を行った。有機部分を合わせ、無水 Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 上で脱水させ、そして減圧下で濃縮して d-アンフェタミン不含有塩基 14 3.66 g を透明な油状物として得た。これを無水 DMF 30 mL 中に溶解し、臭化エチル 2.9 g で処理し、そして室温で 3 日間攪拌した。この混合物を減圧下で濃縮して 6.6 g を得、次の工程の原料とした。この生成物は、カラムクロマトグラフィーでは精製するのが困難であるいくつかの出発原料およびジエチル化された副生成物を含んでいる。

## 【0092】

## 18の合成

無水  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  75 mL 中粗 N-エチルアンフェタミン 6.6 g の溶液をトリエチルアミン 10 mL で処理した。この混合物をアイスバスで冷却し、無水トリフルオロ酢酸 4.3 mL で処理し、そしてアルゴン下室温で一晩撹拌を加えた。この混合物を減圧下で濃縮した。その残渣を EtOAc 75 mL に溶解し、そして飽和  $\text{NaHCO}_3$  3 x 25 mL、 $\text{H}_2\text{O}$  25 mL、飽和ブライン 25 mL で洗浄を行い、無水  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  上で脱水を行い、そして減圧下で濃縮を行った。この残渣を、溶離液として 30% EtOAc - ヘキサンを用いてシリカゲル 300 g 上のクロマトグラフィーにかけ、透明な油状物 4.0 g を得た（これは、前の工程からのジエチル化された副生成物をなおいくらか含んでいた）。これを、溶離液として 5% EtOAc - ヘキサンを用いてシリカゲル 250 g 上のクロマトグラフィーにかけ、18 2.6 g を透明な油状物として得た。 10

## 【0093】

## 20の合成

アルゴン下の無水  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  50 mL 中18 2.0 g の溶液を、無水コハク酸 1.2 g で処理した。この混合物をアイスバスで冷やし、そのあと  $\text{AlCl}_3$  4.0 g を少しずつ加えることで処理した。反応物を 0 で2 時間撹拌し、そのあと室温にて一晩撹拌した。この混合物を、3N  $\text{HCl}$  18 mL を最初はゆっくり加え、そのあと 30 分間激しく撹拌することで処理した。各層を分け、有機層を  $\text{H}_2\text{O}$  25 mL および飽和ブライン 25 mL で洗浄し、 $\text{Na}_2\text{SO}_4$  上で脱水し、そして減圧下で濃縮してアンバー色の油状物とした。これを、溶離液として 3%  $\text{MeOH} - \text{CH}_2\text{Cl}_2$  を用いてシリカゲル 150 g 上のクロマトグラフィーにかけることにより20 2.6 g をアンバー色の油状物として得た。 20

## 【0094】

## 22の合成

500 mL のパー (Parr) ボトルに 10%  $\text{Pd/C}$  115 mg を入れ、続いて酢酸 30 mL 中20 600 mg の溶液を入れ、そして 50 PSI で 17 時間水素化を行った。Celite Corporationから商品名 CELITE で販売されている濾過材 (Aldrich Chemical Company, Inc. (Milwaukee, WI) から入手可能) を通すことで触媒を濾過分離し、濾液を減圧下で濃縮した。残留酢酸は、トルエン 25 mL を用いて 5 回蒸発を行うことにより追い出した。このトルエンを  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  を用いた 5 回の蒸発により追い出して22 576 mg をアンバー色の油状物として得た。 30

## 【0095】

## 24の合成

アルゴン下の無水  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  25 mL 中22 576 mg の溶液を、N-ヒドロキシスクシンイミド 260 mg で処理し、続いて 1-エチル-3-(3-ジメチルアミノプロピル)カルボジイミド  $\text{HCl}$  435 mg で処理し、そして室温で一晩撹拌を加えた。この混合物を 0.1N  $\text{HCl}$  25 mL、 $\text{H}_2\text{O}$  25 mL、飽和  $\text{NaHCO}_3$  2 x 25 mL、飽和ブライン 25 mL で洗浄し、 $\text{Na}_2\text{SO}_4$  上で脱水し、そして減圧下で濃縮して24 735 mg をアンバー色の油状物として得た。 40

## 【0096】

## 32の合成

$\text{H}_2\text{O}$  5 mL 中 4-(アミノメチル)安息香酸 108 mg と蒸留 THF 10 mL との混合物を、蒸留 THF 10 mL 中24 315 mg の溶液で、続いて 1N  $\text{NaOH}$  1.2 mL で処理し、そして室温にて1時間撹拌を加えた。反応物の pH は9であった。THF を減圧下で除去し、水性残渣を  $\text{H}_2\text{O}$  5 mL で希釈し、そして 6N  $\text{HCl}$  を用いて pH 6 に酸性化した。 50

これを、EtOAc 2 × 15 mL で抽出を行った。この EtOAc 抽出物を合わせて、無水 Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 上で脱水し、そして真空下で濃縮して 32 290 mg を白色無定形固体として得た。

【0097】

#### 3.4 の合成

アルゴン下の無水 CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> 10 mL 中 32 270 mg の溶液を、N-ヒドロキシスクシンイミド 85 mg で、続いて 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 140 mg で処理し、そして室温で一晩攪拌を加えた。この混合物を CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> 10 mL で希釈し、0.1 N HCl 10 mL、飽和ブライン 10 mL、飽和 NaHCO<sub>3</sub> 2 × 10 mL、飽和ブライン 10 mL で洗浄し、Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 上で脱水し、そして減圧下で濃縮して白色無定形固体とした。これを、溶離液として EtOAc を用いてシリカゲル 80 g 上のクロマトグラフィーを行い 34 190 mg を白色無定形固体として得た。

【0098】

#### N-エチルアンフェタミン免疫原 26 (Q = KLH 26a) の合成

pH 7.5 の 50 mM KPi 10 mL 中精製 KLH 342 mg の溶液をアイスバスで冷やし、DMSO 4 mL を滴下で加えることで処理した。1.7 mL を採りだし、これを参照として用いた。これにより KLH 300 mg が溶液に残った。このあとこれを DMSO 1.0 mL 中 24 50 mg の溶液を滴下で加えることで処理した。この反応物を室温で一晩攪拌した。この反応物と前記参照サンプルを別々の 10,000 MW カットオフ透析チュービング (SpectraPor 7) の中に入れ、室温にある pH 7.5 の 33% DMSO-50 mM KPi 1 リットル中で、3 回交換 (3 changes)、少なくともそれぞれ 3 時間、最後の 1 つは一晩の透析を行った。このあとこれを、20% DMSO 1 リットル、10% DMSO 1 リットル、100% KPi 1 リットル中の降下勾配を用いて、室温 pH 7.5 でそれぞれ少なくとも 3 時間透析を行った。バッグをこのあと 50 mM K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> (pH 11.4) 1 リットル中に入れ、40 で 4 日間 (2 日目に 1 度交換を行った) 透析を行った。これをこのあと 50 mM KPi 1 リットル中、4 pH 7.5 で、各回それぞれ少なくとも 6 時間の 6 回交換で透析した。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 8.16 mg/mL の結果を得る。保護サンプルに関する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% が改変されていたという結果を得る。

【0099】

#### 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

pH 7.5 の 50 mM KPi 8 mL 中ウシ血清アルブミン (BSA) (Cohn Fraction V 改質粉末 (modified powder); Intergen Company, Purchase, NY, USA) 500 mL の溶液をアイスバスで冷やし、DMSO 11 mL をゆっくり滴下で加えることで処理した。これをこのあと DMSO 1 mL 中 24 6.7 mg の溶液を滴下で加えることにより処理し、そして室温で一晩攪拌した。この混合物を 10,000 MW カットオフ透析チュービング (SpectraPor 7) の中に入れ、室温で pH 7.5 の 60% DMSO-50 mM KPi 1 リットル中で、各回それぞれ少なくとも 3 時間の 3 回交換で且つ最後の 1 回は 1 晩、透析を行った。これをこのあと、室温で pH 7.5 にある 40% DMSO 1 リットル、20% DMSO 1 リットル、10% DMSO 1 リットルおよび 100% 50 mM KPi 1 リットル中の降下勾配を用いて、それぞれ少なくとも 3 時間透析した。これを次に 50 mM K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> 1 リットル (KOH で pH 13 に調整されている) 中で 4 日間、緩衝液の交換 4 回で透析した。これをこの

あと 4 で pH 7.5 にある 50 mM KPi 1 リットル中で、各回それぞれ少なくとも 6 時間の 6 回交換で透析した。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 12.2 mg/mL の結果を得た。

【0100】

M D M A 免疫原を用いた、エクスタシー薬物に対するハイブリドーマの開発  
免疫化

18 ~ 24 週齢の BALB/c 雌のマウスを 12 (T = KLH; 12a) で免疫化した。免疫原はフロイントのアジュバント ( Freund ' s Adjuvant ) 中に乳化し、腹腔内 ( IP ) 注射により投与した。注射は 21 日以上の間隔で行い、典型的には、生理食塩水が 50 % 、アジュバント乳濁液が 50 % で構成される 100  $\mu$ L 中に当該コンジュゲート 50  $\mu$ g を含む。完全フロイントアジュバント ( Complete Freund ' s Adjuvant ) を 1 次免疫に用い、不完全フロイントアジュバント ( Incomplete Freund ' s Adjuvant ) をそのあと用いた。融合の 4 日前に、同じ乳濁液中のブースター免疫 50  $\mu$ g を IP 投与した。

10

【0101】

融合：

融合を行うその日にマウスを頸椎脱臼により絶命させ、血液サンプルを採取した。脾臓および膝窩、鼠径、鎖骨下ならびに深鎖骨下リンパ節を回収、貯留した。これらを 2 枚の滅菌スライドガラスの間ですり潰しリンパ球をリリースさせた。得られたリンパ球の半分は F0 骨髄腫細胞株と融合させるのに使い、残りの半分は P3 骨髄腫細胞と融合させた (両骨髄腫細胞とも ATCC から入手)。

20

【0102】

融合は、骨髄腫細胞の添加 (リンパ球の数の 1/5)、遠心沈殿法による洗浄、無血清加温アイスコブ変法ダルベッコ培地 ( Iscove ' s Modified Dulbecco ' s Media ) 中への再懸濁、および再遠心分離により行った。得られたペレットが入っている遠心分離管を軽く叩いて細胞を解し、そのあと加温した PEG/DM SO 溶液 ( Sigma Chemical Co. ) 1 mL を穏やかにかき混ぜながらゆっくりと加えた。これらの細胞を加温条件下に 1.5 分間保持し、そしてこのあと予備加温された無血清 IMDM を以下：1 mL/min、2 mL/min、4 mL/min、10 mL/min、の速度で加え、そして遠心分離管を 50 mL まで満たし、密封し、そして 15 分間インキュベートした。この細胞懸濁液を遠心分離し、上澄みを静かに別の容器に移し、10% ウシ胎仔血清を含んでいる IMDM を加えた。これらの細胞をもう一度遠心分離にかけ、そして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, USA )、4 mM グルタミン、50  $\mu$ M 2-メルカプトエタノール、40  $\mu$ M エタノールアミン、および pen/strep 抗生物質から構成される。細胞を密度  $4 \times 10^5$  リンパ球/mL で懸濁させ、100  $\mu$ L/ウェルを滅菌 96-ウェル無菌マイクロ培養プレート中に分注し、5% 二酸化炭素中 37 で 24 時間インキュベートした。次の日、HMT 選択培地 ( Sigma Chemical Co. から入手のクローニング培地 + 1:25 HMT サプリメント ) 100  $\mu$ L を加えた。インキュベーションの 6 日目の日、低真空源に連結した滅菌 8 分岐マニホールドを用いてそれぞれのウェルから培地約 150  $\mu$ L を採取した。HT 培地 150  $\mu$ L をそのあと加えた。これはクローニング培地 ( Cloning Medium ) + 1:50 HT サプリメントからなる ( Sigma Chemicals )。プレートをインキュベーターに戻し、増殖の兆候について毎日検査した。増殖が十分であると判断されたとき、ウェルを ELISA により抗体産生に関しスクリーニングした。

30

40

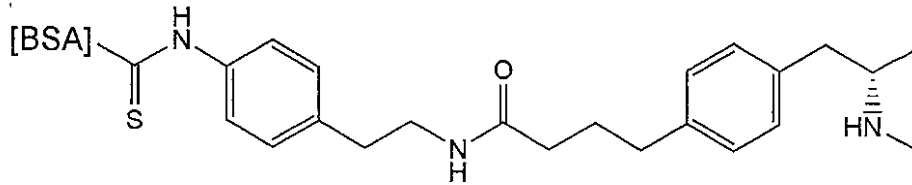
【0103】

50

E L I S A スクリーニング :

マイクロプレート濃度 1 mg/mL でメチレンジオキシメトアンフェタミン - BSA  
A コンジュゲート 12 ( T = BSA ; 12 b ) 100 μL でコーティングし、  
別のプレート濃度 1 mg/mL でメトアンフェタミン - BSA ( MAMP - BSA ) 28

【化 9】

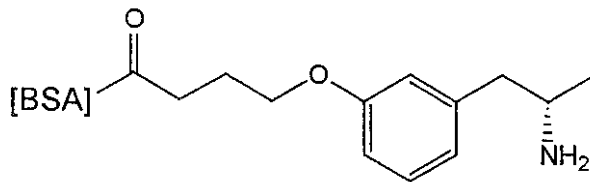


28

10

100 μL、または濃度 1 mg/mL でアンフェタミン - BSA ( AMP - BSA ) 30

【化 10】



30

20

100 μL でコーティングした。全ての希釈は pH 9.5 の 0.1 M 炭酸塩緩衝液中に行った。

【0104】

プレートをカバーしたまま 37 (加湿されている) で 1 時間インキュベートした。その後プレートを空にし、Tris 緩衝液、1%ゼラチン水解物、2%スクロース、および 0.17% Tween-20 (全ての試薬は Sigma Chemical Co. から入手) からなるポストコーティング溶液 (post-coat solution) で満たした。プレートをさらに 1 時間 37 (加湿されている) でカバーしたままインキュベートし、その後 0.1% Tween 20 を含有するリン酸緩衝生理食塩水 (Phosphate-buffered Saline) で洗浄した。その後プレートを pH 7.2~7.4 にある 0.15M Tris 中 2% スクロース溶液で一時的に満たし、次いで空にし、そして室温で空気乾燥させた。乾いたあと、プレートをいくつかの乾燥剤ピロー (pillows) が入っているジップロックバッグ (zip-lock bag) の中にパックし、密封し、そして使用の時まで 4 で保存した。

30

40

【0105】

一次融合スクリーニング

融合プレートからの増殖中のクローンの一次スクリーニングには、MDMA - BSA ( 12 ; T = BSA , 12 b ) でコーティングされたプレートのみを使用した。PBS 50 マイクロリットルを各ウェルに加えたあと、融合プレート上のウェルからの培地のサンプル 50 μL を加え、PBS 中に 1 : 10 に希釈した。プレートを 37 で 1 時間カバーしたままインキュベートし、その後 PBS - Tween (0.1%) で洗浄した。次いでウェルを、PBS - Tween 中に希釈されたヤギ抗マウス IgG - HRP コンジュゲート (Zymed Labs) 100 μL で満たし、プレートを 1 時間再度インキュベートした。プレートをこのあと再度洗浄し、

50

K - B l u e 基質 ( N e o g e n C o r p ) 1 0 0  $\mu$  L を加えた。これを 5 ~ 1 5 分間成長させ、反応を 1 N H C l 1 0 0  $\mu$  L を加えることにより停止させた。色を 4 5 0 n m のマイクロプレート読み取り機により読み取り、コンピューターによりデータ収集して分析した。M D M A - B S A ( 1 2 ; T = B S A , 1 2 b ) に結合している抗体の存在を示したウェルを選択しその次の処理を行う。細胞に限界希釈サブクロニングを行い、増殖が出現した時点で、二次スクリーニングにより検定を行った。

【 0 1 0 6 】

#### 二次スクリーニング

M D M A - B S A コンジュゲート ( 1 2 ; T = B S A , 1 2 b ) でコーティングされた4枚のプレートに、1枚のプレートのウェルに 5 0  $\mu$  L のリン酸緩衝生理食塩水 ( P B S ) 、2枚目のプレートに遊離 M D M A の溶液 ( 8 0 0 n g / m L ) 5 0  $\mu$  L 、3枚目のプレートに M D E A の溶液 ( 8 0 0 n g / m L ) 5 0  $\mu$  L 、4枚目のプレートにブソイドエフェドリンの溶液 ( 8  $\mu$  g / m L ) 5 0  $\mu$  L を加えて準備した。全ての薬物は P B S 中に溶解した。M A M P - B S A ( 2 8 ) および A M P - B S A ( 3 0 ) でコーティングされたプレートのウェルに P B S 5 0  $\mu$  L を加える。

【 0 1 0 7 】

増殖段階にあるサブクローンが検定可能と判断された時点で、ウェルから上澄み 2 5  $\mu$  L を採取し、96-ウェルフレキシブルプレートに移した。それぞれのウェルに培養液を加えて培養サンプルの 1 : 1 0 の希釈とした。この希釈サンプルの 5 0  $\mu$  L を上記のコーティングされたプレートのそれぞれに移した。以降の処理は1次スクリーニングの場合と全く同じであった。選択の基準は、M D M A - B S A ( メチレンジオキシメトアンフェタミン - B S A ) コンジュゲート ( 1 2 ; T = B S A , 1 2 b ) との結合、および遊離の M D M A および / または M D E A による阻害の徴候、およびブソイドエフェドリンによる阻害がほとんどないしは全くないことであった。A M P - B S A ( 3 0 ) および M A M P - B S A コンジュゲート ( 2 8 ) との結合は参考のためだけであった。

【 0 1 0 8 】

選択されたクローンを直ちにサブクロニングし、そして可能となった時点で、二次スクリーニング手順により再検定した。安定サブクローンを増殖させ、凍結させ、費やした培地を使って交差反応性アッセイにより特異性を測定した。サブクローンは、親クローンの名称の後にサフィックス「 . 」を加えることにより識別されており、また数字は選択の順番を表わす。

【 0 1 0 9 】

表 4 はこのスクリーニング結果の一部を示す。

【 0 1 1 0 】

【 表 1 】

表4

	MDMA-BSA (1 2 b)				(3 0)	(2 8)
	プレート				プレート	プレート
クローン	+PBS	+ MDMA	+MDEA	+Pseu		
MDMA-2	3.169	-	-	-	-	-
MDMA-2.1	3.771	0.796	0.370	3.806	0.139	0.153
MDMA-2.1.1	4.200	0.857	0.754	3.910	1.679	0.089
MDMA-14	4.131	-	-	-	-	-
MDMA-14.1	3.898	0.724	0.454	3.802	0.241	0.145

10

## 【0111】

交差反応性アッセイ

上澄みを順次希釈していき、上記のELISAスクリーニングで再検定した。最大ODから約50%の低下を与える希釈を選択して交差反応性試験に進めた。これは、先のアッセイを、選択された希釈にある抗体を用いてまた各種濃度の薬物の存在下で繰り返すことで行った。図5および図6に示されているチャートはこのような測定の結果を表わしている。

20

## 【0112】

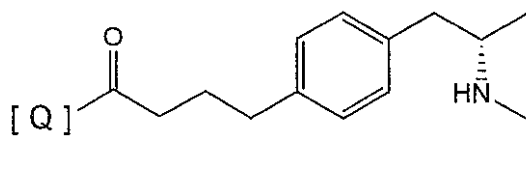
N-エチルアンフェタミン免疫原を用いた、エクスタシー薬物に対するハイブリドーマの開発

免疫化

週齢18~24のSJL雌マウスを改変RIMMS法(modified RIMMS method)(Kilpatrick et al., Hybridoma, 1997, 16:4, pp. 381-389)により免疫化した。簡潔に述べると、免疫原26(Q = KLH, 26a)

30

## 【化11】



26

40

[ここでQはKLHである]を不完全フロイントアジュバント中に乳化し、皮下注射により首の頂部、および左右の脛脛(calf)と鼠径(groin)に分布する6部位に投与した。注射は0、3、6および11の日に行った。それぞれの投与した量は：全部で50 μg、25 μg、12 μg、および6 μgであった。

## 【0113】

融合

13の日に全採血により2匹のマウスを絶命させた。膝窩、鼠径、鎖骨下および深鼠径のリンパ節を回収し、貯留した。これらのリンパ節を2枚のスライドガラスに挟んですり潰してリンパ球をリリースした。得られたリンパ球懸濁液の半分を使ってF0骨髓腫

50

細胞株と融合させた。残りの半分を P3 骨髄腫細胞（両骨髄腫細胞は ATCC から入手した）と融合させた。

【0114】

融合は、骨髄腫細胞の添加（リンパ球数の1/5）、遠心分離による洗浄、無血清加温アイスコブ変法ダルベッコ培地中への再懸濁、および再遠心分離により行った。得られたペレットが入っている遠心分離管を軽く叩いて細胞を解し、そのあと加温した PEG/DMSO 溶液（Sigma Chemical Co.）1 mL を穏やかにかき混ぜながらゆっくりと加えた。細胞を加温条件下に 1.5 分間保持し、そしてこのあと予備加温された無血清 IMDM を以下：1 mL/min、2 mL/min、4 mL/min、および 10 mL/min、の速度で加えた。そして遠心分離管を 50 mL まで満たし、密封し、そして 15 分間インキュベートした。この細胞懸濁液を遠心分離し、上澄みを静かに別の容器に移し、10% ウシ胎仔血清を含んでいる IMDM を加えた。細胞をもう一度遠心分離にかけ、そして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, USA）、4 mM グルタミン、50  $\mu$ M 2-メルカプトエタノール、40  $\mu$ M エタノールアミン、および pen/strep 抗生物質から構成される。細胞を密度  $4 \times 10^5$  リンパ球/mL で懸濁させ、100  $\mu$ L/ウェルを滅菌 96-ウェル無菌マイクロ培養プレート中に分注し、5% CO<sub>2</sub> 中 37 で 24 時間インキュベートした。次の日、HMT 選択培地（Sigma Chemical から入手のクローニング培地 + 1:25 HMT サプリメント）100  $\mu$ L を加えた。インキュベーションの 6 日目の日、低真空源に連結した滅菌 8 分岐マニホールドを用いてそれぞれのウェルから培地約 150  $\mu$ L を採取した。HT 培地 150  $\mu$ L をそのあと加えた。これは クローニング培地（Cloning Medium）+ 1:50 HT サプリメントからなる（Sigma Chemicals）。プレートをインキュベーターに戻し、増殖の兆候について毎日検査した。増殖が十分であると判断されたとき、ウェルを ELISA により抗体産生に関しスクリーニングした。

【0115】

ELISA スクリーニング：

37（加湿されている）で 1 時間かけて、pH 9.5 の 0.1 M 炭酸塩緩衝液中濃度 1  $\mu$ g/mL にあるメトアンフェタミン-BSA コンジュゲート 28 100  $\mu$ L でマイクロプレートを、また同じく N-エチルアンフェタミン-BSA 26（Q = BSA、26b）100  $\mu$ L で別のプレートをコーティングした。その後プレートを空にし、そして Tris 緩衝液、1% ゼラチン水解物、2% スクロース、および 0.17% Tween-20（全ての試薬は Sigma Chemical Co. から入手）からなるポストコーティング溶液（post-coat solution）で満たした。プレートをさらに 1 時間 37（加湿されている）でインキュベートし、そのあと 0.1% Tween 20 を含有するリン酸緩衝生理食塩水（Phosphate-buffered Saline）で洗浄した。そのあとプレートを pH 7.2~7.4 にある 0.15 M Tris 中 2% スクロース溶液で一時的に満たし、次いで空にし、そして室温で空気乾燥させた。乾いたあと、プレートをいくつかの乾燥剤ピロー（pillows）が入っているジップロックバッグの中にパックし、密封し、そして使用の時まで 4 で保存した。

【0116】

増殖段階にあるクローンが検定可能と判断された時点で、ウェルから上澄み 25  $\mu$ L を採取し、96-ウェルフレキシブルプレートに移した。それぞれのウェルに培地を加えて培養サンプルの 1:10 の希釈とした。この希釈サンプルの 100  $\mu$ L を上記のコーティングされたプレートのそれぞれに移した。プレートを 37 で 1 時間カバーしたままインキュベートし、そのあと PBS-Tween で洗浄した。次いでウェルを、PBS-Tween 中に希釈されたヤギ抗マウス IgG-HRP コ

ンジュゲート ( Z y m e d L a b s ) 1 0 0 μ L で満たし、プレートを 1 時間再インキュベートした。プレートをこのあと再度洗浄し、K - B l u e 基質 ( N e o g e n C o r p ) 1 0 0 μ L を加えた。これを 5 ~ 1 5 分間成長させ、反応を 1 N H C l 1 0 0 μ L を加えることにより停止させた。色を 4 5 0 n m でマイクロプレート読み取り機により読み取り、コンピューターによりデータ収集して分析した。選択の基準はメトアンフェタミン - B S A コンジュゲート 2 8 との結合であった。表 5 は、メト - B S A 2 8 および N E A M P - B S A 2 6 ( Q = B S A , 2 6 b ) でコーティングされたプレートのスクリーニングの一部に対する結合データを示している。

【 0 1 1 7 】

【表 2】

表 5

クローン	メト-BSA 28	NEAMP-BSA 26b
Neamp-1	0.539	0.356
Neamp-2	0.350	1.146
Neamp-4	1.079	1.617

選択したクローンを直ちにサブクローニングし、そして可能となった時点で、再検定した。安定サブクローンを分裂させ、凍結させそして残った培地を使って交差反応性アッセイにより特異性を測定した。

【 0 1 1 8 】

#### 交差反応性アッセイ

上澄みを順次希釈していき、上記の E L I S A スクリーニングで再検定した。最大 O D から約 5 0 % の低下を与える希釈を選択して次の交差反応性試験に進んだ。これは、先のアッセイを、選択された希釈にある抗体を用いてまた各種濃度の薬物の存在下で繰り返すことで行った。図 7 に示されているチャートはこのような測定の結果を表わし、表 3 ( 上記参照 ) は測定された交差反応性のパーセントを示す。

【 0 1 1 9 】

ここまでの詳細な説明および実施例は説明と例示のために提供したものであり、特許請求の範囲を限定することを意図するものではない。当業者には、本明細書中で例示された本発明の好ましい実施形態の多くの変形が明らかであり、そしてそれらは本特許請求の範囲およびそれに相当するものの中に入る。

【図面の簡単な説明】

【図 1】

本発明の特徴を具現する化合物および免疫原を合成するための第 1 の代表的なスキームを示す図である。

【図 2】

本発明の特徴を具現する化合物および免疫原を合成するための第 2 の代表的なスキームを示す図である。

【図 3】

本発明の特徴を具現する化合物を合成するための第 3 の代表的なスキームを示す図である。

【図 4】

本発明の特徴を具現する抗体の交差反応性データの表を示す図である。

【図 5】 M D クラスの薬物のメンバーによる、本発明の特徴を具現する抗体の競合阻害の E L I S A プロットを示す図である。

10

20

30

40

50

## 【図6】

関連薬物誘導体による、本発明の特徴を具現する抗体の競合阻害のELISAプロットを示す図である。

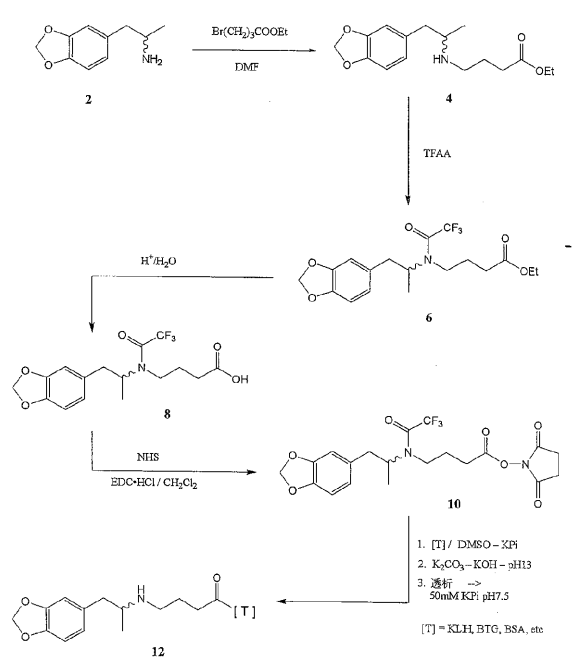
## 【図7】

各種薬物による、本発明の特徴を具現する抗体の競合阻害のELISAプロットを示す図である。

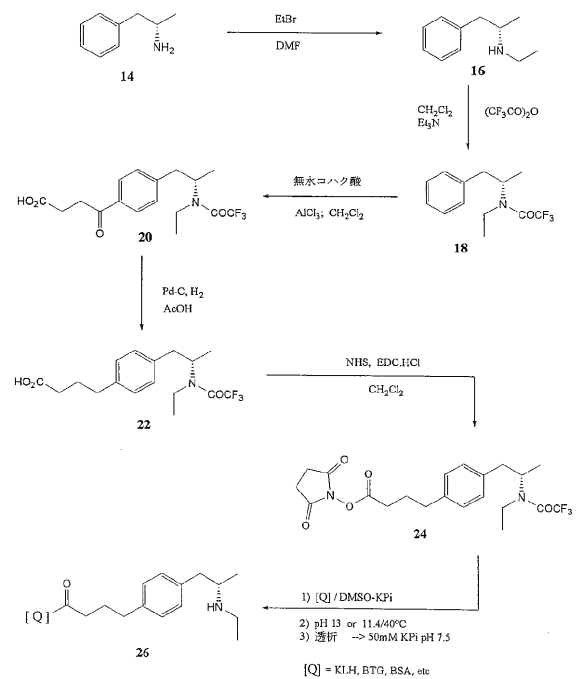
## 【図8】

本発明の特徴を具現するコンジュゲートおよび抗体を用いて得られた曲線のデータを示す図である。

## 【図1】



## 【図2】





【 図 8 】

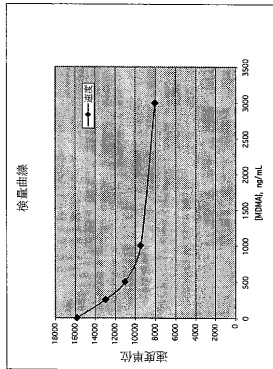
改変ロジックオンラインフォーマットにおける MDMA 2.1.1 の交差反応性

検量物質 MDMA

SI	MDMA ng/mL	速度
S1	0	15842
S2	250	12977
S3	500	10996
S4	1000	9434
S5	3000	8043

スパンデータ

S1-S2	2866	36.74%
S2-S3	1981	25.40%
S3-S4	1562	20.02%
S4-S5	1381	17.84%
合計	7799	



薬物	薬量加えた量 (ng/mL)	機器応答値	CR %
H-MAMP	625	0	0
H-MAP	625	0	0
MMA	625	714	114.2
MEA	625	1864	298.2
BB	5000	195	3.9
BBP	5000	695	12.5
PPA	20000	0	0
PPA'	20000	0	0
PPA''	20000	0	0
PPA'''	20000	0	0
PPA''''	20000	0	0
PPA'''''	20000	0	0
PPA''''''	20000	0	0
H-MAMP	20000	0	0
H-MAP	20000	0	0
H-MAMP	20000	170	0.09

## フロントページの続き

(51) Int.Cl. <sup>7</sup>	F I	テーマコード(参考)
C 0 7 K 14/795	C 0 7 K 14/795	
C 0 7 K 16/44	C 0 7 K 16/44	
C 1 2 P 21/08	C 1 2 P 21/08	
G 0 1 N 33/53	G 0 1 N 33/53	G

(72)発明者 レイモンド エー．ファイ  
 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，カンクスホーム 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 ウッド 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，ノーブルスビル，パークシャイア レーン 2 0  
 9

F ターム(参考) 4B064 AG27 CA20 CC24  
 4C069 AC30 BC06 BC12  
 4H006 AA01 AA03 AB20 BJ50 BM10 BM71 BS10 BV22  
 4H045 AA10 AA11 BA72 CA40 DA86 EA20 FA50

## 【要約の続き】

[ ここで各記号は明細書で定義されている ] を有する化合物。

【選択図】 なし

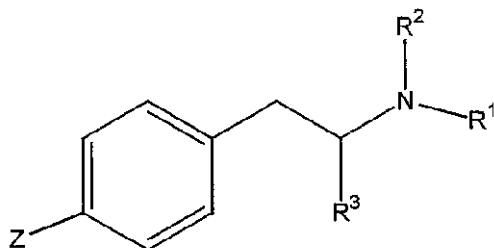
【外国語明細書】

## 1 Title of Invention

COMPOUNDS, ANTIBODIES, REAGENT KITS, METHODS OF  
PRODUCING ANTIBODIES, AND METHODS OF DETECTING  
ANALYTES

## 2 Claims

1. A compound having a structure



wherein:

R<sup>1</sup> is an alkyl group comprising 2-6 carbon atoms;R<sup>2</sup> is selected from the group consisting of hydrogen, an alkyl group, and a protecting group;R<sup>3</sup> is an optionally substituted alkyl group; and

Z is -L-X-Q; wherein

L comprises 1-15 carbon atoms and 0-6 heteroatoms;

X is selected from the group consisting of -O-, -CO-, -NR<sup>4</sup>-, -S-, -C(=NH)O-, -NH(CO)-, -NH(CO)NH-, -NH(CS)-, -NH(CS)NH-, -O(CO)NH-, -NH(C=NH)-, and maleimidothioether, wherein R<sup>4</sup> is selected from the group consisting of hydrogen and an alkyl group; and

Q is selected from the group consisting of hydrogen, a hydroxyl, a leaving group, a macromolecular carrier, and a label.

2. The compound of claim 1 wherein the macromolecular carrier is selected from the group consisting of a protein, a polypeptide, and a polysaccharide.

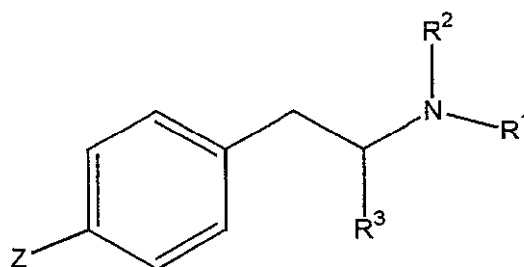
3. The compound of claim 2 wherein the protein is selected from the group consisting of keyhole limpet hemocyanin, bovine serum albumin, and bovine thyroglobulin.
4. The compound of claim 1 wherein  $R^2$  is a protecting group or hydrogen.
5. The compound of claim 4 wherein L comprises 1-11 carbon atoms.
6. The compound of claim 5 wherein L is  $-(CH_2)_j-$  and j is 1, 2, 3, 4, 5, or 6.
7. The compound of claim 6 wherein j is 3 and X is  $-CO-$ .
8. The compound of claim 7 wherein  $R^1$  is selected from the group consisting of ethyl, n-propyl, and n-butyl, and  $R^3$  is selected from the group consisting of methyl, ethyl, n-propyl, and n-butyl.
9. The compound of claim 7 wherein Q is a leaving group
10. The compound of claim 7 wherein  $R^1$  is ethyl and  $R^3$  is methyl.
11. The compound of claim 10 wherein Q is a leaving group.
12. The compound of claim 7 wherein Q is a leaving group comprising N-oxysuccinimide.
13. The compound of claim 10 wherein Q is a leaving group comprising N-oxysuccinimide.

14. The compound of claim 7 wherein Q is a macromolecular carrier selected from the group consisting of a hemocyanin, a globulin, an albumin, and a polysaccharide.

15. The compound of claim 10 wherein Q is a macromolecular carrier selected from the group consisting of a hemocyanin, a globulin, an albumin, and a polysaccharide.

16. An antibody specific for MDEA.

17. An antibody specific for an analyte wherein the analyte comprises a structure



wherein:

R<sup>1</sup> is an alkyl group comprising 2-6 carbon atoms;

R<sup>2</sup> is selected from the group consisting of hydrogen, an alkyl group, and a protecting group;

R<sup>3</sup> is an optionally substituted alkyl group; and

Z is -L-X-Q; wherein

L comprises 1-15 carbon atoms and 0-6 heteroatoms;

X is selected from the group consisting of -O-, -CO-, -NR<sup>4</sup>-, -S-, -C(=NH)O-, -NH(CO)-, -NH(CO)NH-, -NH(CS)-, -NH(CS)NH-, -O(CO)NH-, -NH(C=NH)-, and maleimidothioether, wherein R<sup>4</sup> is selected from the group consisting of hydrogen and an alkyl group; and

Q is selected from the group consisting of hydrogen, a hydroxyl, a leaving group, a macromolecular carrier, and a label.

18. The antibody of claim 17 wherein the macromolecular carrier is selected from the group consisting of a protein, a polypeptide, and a polysaccharide.

19. The antibody of claim 17 wherein the protein is selected from the group consisting of keyhole limpet hemocyanin, bovine serum albumin, and bovine thyroglobulin.

20. The antibody of claim 17 wherein  $R^2$  is a protecting group or hydrogen.

21. The antibody of claim 20 wherein L comprises 1-11 carbon atoms.

22. The antibody of claim 21 wherein L is  $-(CH_2)_j-$  and j is 1, 2, 3, 4, 5, or 6.

23. The antibody of claim 22 wherein j is 3 and X is  $-CO-$ .

24. The antibody of claim 23 wherein  $R^1$  is selected from the group consisting of ethyl, n-propyl, and n-butyl, and  $R^3$  is selected from the group consisting of methyl, ethyl, n-propyl, and n-butyl.

25. The antibody of claim 23 wherein  $R^1$  is ethyl and  $R^3$  is methyl.

26. The antibody of claim 23 wherein Q is a macromolecular carrier selected from the group consisting of a hemocyanin, a globulin, an albumin, and a polysaccharide.

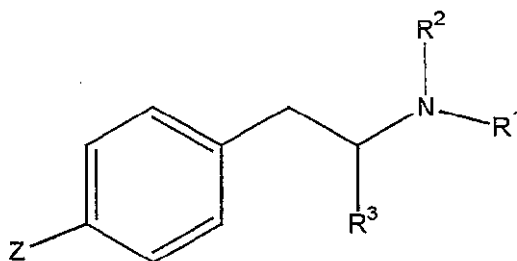
27. The antibody of claim 25 wherein Q is a macromolecular carrier selected from the group consisting of a hemocyanin, a globulin, an albumin, and a polysaccharide.

28. A reagent kit comprising the antibody of claim 16.

29. A reagent kit comprising the antibody of claim 17.

30. A reagent kit comprising the antibody of claim 27.

31. A method of producing an antibody comprising inoculating a host with an immunogen comprising a structure



wherein:

R<sup>1</sup> is an alkyl group comprising 2-6 carbon atoms;

R<sup>2</sup> is selected from the group consisting of hydrogen, an alkyl group, and a protecting group;

R<sup>3</sup> is an optionally substituted alkyl group; and

Z is -L-X-Q; wherein

L comprises 1-15 carbon atoms and 0-6 heteroatoms;

X is selected from the group consisting of -O-, -CO-, -NR<sup>4</sup>-, -S-, -C(=NH)O-, -NH(CO)-, -NH(CO)NH-, -NH(CS)-, -NH(CS)NH-, -O(CO)NH-, -NH(C=NH)-, and maleimidothioether, wherein R<sup>4</sup> is

selected from the group consisting of hydrogen and an alkyl group; and

Q is a macromolecular carrier.

32. The method of claim 31 wherein  $R^2$  is a protecting group or hydrogen.
33. The method of claim 32 wherein L comprises 1-11 carbon atoms.
34. The method of claim 33 wherein L is  $-(CH_2)_j-$  and j is 1, 2, 3, 4, 5, or 6.
35. The method of claim 34 wherein j is 3 and X is  $-CO-$ .
36. The method of claim 35 wherein  $R^1$  is selected from the group consisting of ethyl, n-propyl, and n-butyl, and  $R^3$  is selected from the group consisting of methyl, ethyl, n-propyl, and n-butyl.
37. The method of claim 35 wherein  $R^1$  is ethyl and  $R^3$  is methyl.
38. The method of claim 35 wherein Q is a macromolecular carrier selected from the group consisting of a hemocyanin, a globulin, and an albumin.
39. The method of claim 37 wherein Q is a macromolecular carrier selected from the group consisting of a hemocyanin, a globulin, and an albumin.
40. A method of detecting an analyte in a sample comprising:  
contacting the sample with the antibody of claim 16;  
binding the antibody to the analyte; and

detecting an adduct formed by the antibody and the analyte.

41. The method of claim 40 wherein the analyte is selected from the group consisting of an amphetamine, an amphetamine derivative, an ecstasy drug, an ecstasy drug derivative, and combinations thereof.

42. The method of claim 41 wherein the ecstasy drug is MDEA.

43. A method of detecting an analyte in a sample comprising:  
contacting the sample with the antibody of claim 17;  
binding the antibody to the analyte; and  
detecting an adduct formed by the antibody and the analyte.

44. The method of claim 43 wherein the analyte is selected from the group consisting of an amphetamine, an amphetamine derivative, an ecstasy drug, an ecstasy drug derivative, and combinations thereof.

45. The method of claim 44 wherein the ecstasy drug is MDEA.

### 3 Detailed Description of Invention

The present invention relates to immunoassays, more particularly, to immunoassays for derivatives of amphetamine, and especially to "ecstasy drugs."

The use and abuse of a class of illicit designer drugs known commonly as "ecstasy drugs" have increased significantly in recent years. These compounds, which are derivatives of amphetamine distinguished by having a fused methylenedioxy-phenyl ring system, include: MDA (3,4-methylenedioxyamphetamine); MDMA also known as "Ecstasy" (3,4-methylenedioxy-N-methylamphetamine); MDEA also known as "Eve" (3,4-methylenedioxy-N-ethylamphetamine); BDB (3,4-methylenedioxyphenyl-2-butanamine); MBDB (3,4-methylenedioxyphenyl-N-methylbutanamine); and MDPA (3,4-methylenedioxy-N-propylamphetamine).

Heretofore, methods for the detection of ecstasy drugs have primarily involved immunoassays originally developed for the detection of amphetamine and/or methamphetamine. The detection of an ecstasy drug by such assays relies on the limited cross-reactivities that may coincidentally exist between the ecstasy drug and the amphetamine and/or methamphetamine antibodies. A positive result obtained by such an assay may still not indicate which particular substance or member of the methylenedioxy class of derivatives is present in a sample.

In general, amphetamine and methamphetamine immunoassays are relatively insensitive to and non-specific for ecstasy drugs. Such assays show particularly limited recognition for the MDEA ("Eve") derivative.

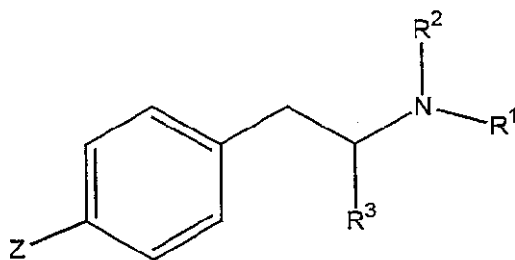
The present invention is directed to remedying these and other problems relating to the use of conventional amphetamine and/or

methamphetamine immunoassays for the detection of members of the methylenedioxy (MD) class of ecstasy drugs.

## SUMMARY

The scope of the present invention is defined solely by the appended claims, and is not affected to any degree by the statements within this summary.

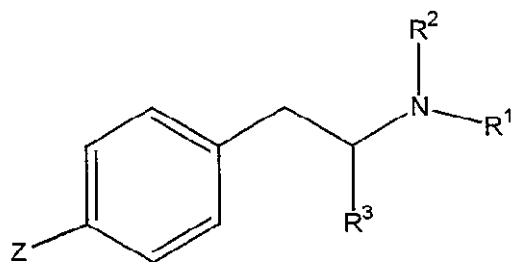
Briefly stated, a compound embodying features of the present invention has a structure



wherein  $R^1$  is an alkyl group comprising 2-6 carbon atoms;  $R^2$  is selected from the group consisting of hydrogen, an alkyl group, and a protecting group;  $R^3$  is an optionally substituted alkyl group; and Z is  $-L-X-Q$ . Preferably  $R^1$  is ethyl, propyl, or butyl, and more preferably  $R^1$  is ethyl. L comprises 1-15 carbon atoms and 0-6 heteroatoms. X is selected from the group consisting of  $-O-$ ,  $-CO-$ ,  $-NR^4-$ ,  $-S-$ ,  $-C(=NH)O-$ ,  $-NH(CO)-$ ,  $-NH(CO)NH-$ ,  $-NH(CS)-$ ,  $-NH(CS)NH-$ ,  $-O(CO)NH-$ ,  $-NH(C=NH)-$ , and maleimidothioether, wherein  $R^4$  is selected from the group consisting of hydrogen and an alkyl group. Q is selected from the group consisting of hydrogen, a hydroxyl, a leaving group, a macromolecular carrier, and a label.

A first antibody embodying features of the present invention is specific for MDEA.

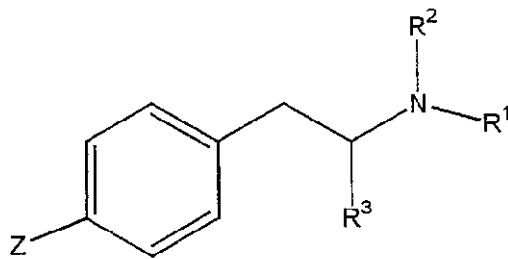
A second antibody embodying features of the present invention is specific for an analyte having a structure



wherein  $R^1$  is an alkyl group comprising 2-6 carbon atoms;  $R^2$  is selected from the group consisting of hydrogen, an alkyl group, and a protecting group;  $R^3$  is an optionally substituted alkyl group; and Z is  $-L-X-Q$ . Preferably  $R^1$  is ethyl, propyl, or butyl, and more preferably  $R^1$  is ethyl. L comprises 1-15 carbon atoms and 0-6 heteroatoms. X is selected from the group consisting of  $-O-$ ,  $-CO-$ ,  $-NR^4-$ ,  $-S-$ ,  $-C(=NH)O-$ ,  $-NH(CO)-$ ,  $-NH(CO)NH-$ ,  $-NH(CS)-$ ,  $-NH(CS)NH-$ ,  $-O(CO)NH-$ ,  $-NH(C=NH)-$ , and maleimidothioether, wherein  $R^4$  is selected from the group consisting of hydrogen and an alkyl group. Q is selected from the group consisting of hydrogen, a hydroxyl, a leaving group, a macromolecular carrier, and a label.

A reagent kit embodying features of the present invention includes an antibody of a type described above.

A method of producing an antibody embodying features of the present invention includes inoculating a host with an immunogen comprising a structure



wherein  $R^1$  is an alkyl group comprising 2-6 carbon atoms;  $R^2$  is selected from the group consisting of hydrogen, an alkyl group, and a protecting group;  $R^3$  is an optionally substituted alkyl group; and Z is  $-L-X-Q$ . Preferably  $R^1$  is ethyl, propyl, or butyl, and more preferably  $R^1$  is ethyl. L comprises 1-15 carbon atoms and 0-6 heteroatoms. X is selected from the group consisting of  $-O-$ ,  $-CO-$ ,  $-NR^4-$ ,  $-S-$ ,  $-C(=NH)O-$ ,  $-NH(CO)-$ ,  $-NH(CO)NH-$ ,  $-NH(CS)-$ ,  $-$

NH(CS)NH-, -O(CO)NH-, -NH(C=NH)-, and maleimidothioether, wherein R<sup>4</sup> is selected from the group consisting of hydrogen and an alkyl group. Q is a macromolecular carrier.

A method for detecting an analyte in a sample that embodies features of the present invention includes contacting the sample with an antibody of a type described above, binding the antibody to the analyte, and detecting an adduct formed by the antibody and the analyte.

#### DETAILED DESCRIPTION OF THE PRESENTLY PREFERRED EMBODIMENTS

Compounds (e.g., haptens, intermediates) and immunogens useful in the production of antibodies specific for the MD class of amphetamine derivatives, antibodies specific for the MD class of amphetamine derivatives, reagent kits containing antibodies specific for the MD class of amphetamine

derivatives, methods of producing antibodies specific for the MD class of amphetamine derivatives, and methods of detecting analytes including members of the MD class of amphetamine derivatives (i.e., ecstasy drugs) have been discovered and are described hereinbelow.

Throughout this description and in the appended claims, the following definitions are to be understood: The term "immunogen" refers to any substance capable of eliciting an immune response in an organism.

The term "conjugate" refers to any substance formed from the joining together of two parts. Representative conjugates in accordance with the present invention include those formed by the joining together of a small molecule and a large molecule, such as a protein. The term "conjugate" subsumes the term "immunogen."

The term "hapten" refers to a portion of an immunogen that is typically low in molecular weight, which does not by itself stimulate antibody development.

The phrase "activated hapten" refers to a hapten that has been provided with an available reaction site — for example, by the attachment of a linking group carrying a reactive moiety — that can be used to connect the hapten to a carrier, immunogen, label, tracer, or other moiety.

The term "linking group" (or "linker") refers to a chemical moiety that is used to connect a hapten to a macromolecular carrier, immunogen, label, tracer or other moiety. The use of a linking group may or may not be advantageous or needed, depending on the specific hapten and carrier and desired specificity of antibody. Suitable linkers include straight, branched, saturated or unsaturated carbon chains, which may incorporate one or more heteroatoms—that is, atoms other than carbon (e.g., oxygen, nitrogen, sulfur, etc.)—within the chain or substituted onto and/or at a terminus thereof.

The phrases "carrier" and "macromolecular carrier" refer to high molecular weight substances that can be coupled to haptens to form immunogens. Suitable macromolecular carriers include but are not limited to proteins, glycoproteins, polymers, polysaccharides, polypeptides, and nucleic

acids that are recognized as foreign and thereby elicit an immunologic response from a host.

The term "polypeptide" refers to any compound formed by the linkage of two or more amino acids via an amide bond. Representative polypeptides include polymers of  $\alpha$ -amino acids in which the  $\alpha$ -amino group of each non-terminal amino acid residue is linked to the  $\alpha$ -carboxyl group of an adjacent residue in a linear chain. High molecular weight polypeptides are referred to as "proteins."

The term "label" refers to an identifying tag that can be attached to a carrier substance or molecule to detect an analyte. A label may be attached to its carrier substance directly or indirectly by means of a linking or bridging moiety. Suitable labels include but are not limited to enzymes (e.g.,  $\beta$ -galactosidase, peroxidase, etc.), fluorescent compounds (e.g., rhodamine, fluorescein isothiocyanate or FITC, etc.), luminescent compounds (e.g., dioxetanes, luciferin, etc.), radioactive isotopes (e.g.,  $^{125}\text{I}$ ), protein-binding partners (e.g., biotin), and the like.

The term "antibody" (abbreviated "Ab") refers to a specific protein capable of binding an immunogen or portion thereof. An antibody is produced in response to an immunogen, which may have been introduced into a host (e.g., an animal or a human) by injection. The generic term "antibody" subsumes polyclonal antibodies, monoclonal antibodies and antibody fragments.

The term "analyte" refers to any substance, or group of substances, the presence or amount of which is to be determined. As used herein, the term "analyte" subsumes the term "antigen," which refers to any compound that can bind to an antibody. Furthermore, as used herein, the term "analyte" refers to all manner of chemical substances including but not limited to: conjugates; immunogens; drugs; drug derivatives; hormones; proteins; antigens; oligonucleotides; and the like. Representative ecstasy drug analytes include but are not limited to MDA, MDMA, MDEA, MDPA, BDB, MBDB, and the like.

The term "derivative" refers to a chemical compound made from a parent compound by one or more chemical reactions.

The term "ligand" refers to any substance or group of substances, such as may be employed in a competitive immunoassay, which behaves similarly to an analyte with respect to binding affinity to an antibody. Representative ligands include but are not limited to drugs, drug derivatives, isomers thereof, hormones, polypeptides, nucleotides, and the like.

The phrase "detecting an analyte" refers to any quantitative, semi-quantitative, or qualitative method, as well as to all other methods for determining an analyte in general, and an ecstasy drug in particular. For example, a method that merely detects the presence or absence of an ecstasy drug in a sample lies within the scope of the present invention, as do methods that provide data as to the amount or concentration of the drug in the sample. The terms "detecting," "determining," "identifying," and the like are used synonymously herein, and all lie within the scope of the present invention.

The phrase "reagent kit" refers to an assembly of materials that are used in performing an assay. The reagents can be provided in packaged combination in the same or in separate containers, depending on their cross-reactivities and stabilities, and in liquid or in lyophilized form. The amounts and proportions of reagents provided in the kit can be selected so as to provide optimum results for a particular application. A reagent kit embodying features of the present invention comprises antibodies specific for ecstasy drugs. The kit may further comprise ligands of the analyte, and calibration and control materials. The reagents may remain in liquid form or may be lyophilized.

The phrase "calibration and control materials" refers to any standard or reference material containing a known amount of an analyte to be measured. A sample suspected of containing an analyte and the corresponding calibration material are assayed under similar conditions. The concentration of analyte is calculated by comparing the results obtained for the unknown

specimen with the results obtained for the standard. This is commonly done by constructing a calibration curve such as is shown in FIG. 8.

The phrase "alkyl group" refers to any straight, branched, cyclic, acyclic, saturated or unsaturated carbon chain. Representative alkyl groups include but are not limited to alkanes, alkenes, alkynes, cycloalkanes, cycloalkenes, cycloalkynes, aryls, and the like, and combinations thereof.

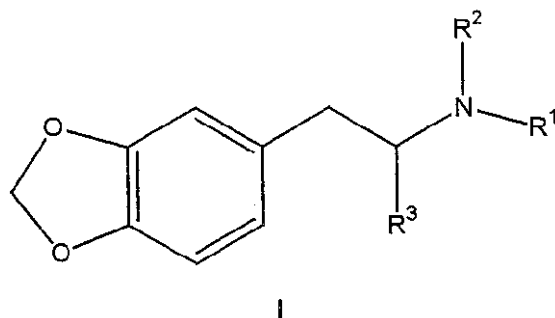
The phrase "optionally substituted" refers to the optional attachment of one or more substituents onto an alkyl group.

The phrase "leaving group" refers to any chemical moiety of a substrate that can be displaced by a reagent reacted therewith. Suitable leaving groups include but are not limited to halides, mesylates, tosylates, alkoxys, quaternary ammonium salts, and the like. Preferred leaving groups for use in accordance with the presently preferred embodiments are provided by activated esters (e.g., trifluoroethoxy esters, N-hydroxysuccinimide esters, p-nitrophenyl esters, pentafluorophenyl esters, imidazolyl esters, N-hydroxybenzotriazolyl esters), whereby the oxygen-containing portion of the ester that is attached to the carbonyl carbon is displaced in the course of the reaction.

The phrase "protecting group" refers to any moiety that is attached to a reactive atom or center in order to alter its usual reactivity. Suitable protecting groups include but are not limited to those described in the treatise entitled *Protective Groups in Organic Synthesis, 3<sup>rd</sup> Edition* by Theodora W. Greene and Peter G. M. Wuts (John Wiley & Sons, Inc., New York, 1999), the entire contents of which are incorporated herein by reference, except that in the event of any inconsistent disclosure or definition from the present application, the disclosure or definition herein shall be deemed to prevail. Various protecting groups for the nitrogen of amines are known in the art (e.g., *vide supra*), from amongst which trifluoroacetyl is a presently preferred nitrogen protecting group.

A compound embodying features of the present invention is useful as an intermediate, hapten, or immunogen in the production of antibodies

specific for ecstasy drugs. A first series of compounds embodying features of the present invention has a structure I:



wherein  $R^1$  is  $-J-M-T$ ;  $R^2$  is selected from the group consisting of hydrogen, an alkyl group, and a protecting group; and  $R^3$  is an optionally substituted alkyl group.  $J$  comprises 1-15 carbon atoms and 0-6 heteroatoms.  $M$  is selected from the group consisting of  $-O-$ ,  $-CO-$ ,  $-NR^4-$ ,  $-S-$ ,  $-C(=NH)O-$ ,  $-NH(CO)-$ ,  $-NH(CO)NH-$ ,  $-NH(CS)-$ ,  $-NH(CS)NH-$ ,  $-O(CO)NH-$ ,  $-NH(C=NH)-$ , and maleimidothioether, wherein  $R^4$  is selected from the group consisting of hydrogen and an alkyl group.  $T$  is selected from the group consisting of hydrogen, a hydroxyl, a leaving group, a macromolecular carrier, and a label.  $R^1$  is not  $-CH_2CN$ ,  $-CH_2C=CH_2$ ,  $-CHO$ ,  $-CH_2CH_2OH$ ,  $-CH_2CH_2OCH_3$ , or  $-CH_2CCH$  when  $R^2$  is hydrogen and when  $R^3$  is methyl.

Preferably, the macromolecular carrier is selected from the group consisting of proteins, polypeptides, and polysaccharides. Preferred proteins include KLH (keyhole limpet hemocyanin), BSA (bovine serum albumin), and BTG (bovine thyroglobulin). Preferably, the alkyl groups comprise straight or branched chains and 1-15 carbon atoms, more preferably 1-11 carbon atoms, and still more preferably 1-9 carbon atoms.

In this first series of preferred embodiments, it is preferred that  $J$  comprises  $-(CH_2)_k-$ , wherein  $k$  is 1, 2, 3, 4, 5, or 6, and more preferably  $k$  is 3. It is further preferred that  $M$  is  $-CO-$ . Preferably,  $R^2$  is hydrogen, methyl, ethyl, n-propyl, or n-butyl, and more preferably  $R^2$  is hydrogen. Preferably,  $R^3$  is hydrogen, methyl, ethyl, n-propyl, or n-butyl, and more preferably  $R^3$  is methyl. Preferably,  $T$  is selected from the group consisting of N-oxysuccinimide, a hemocyanin, a globulin, and an albumin, and more

preferably, T is selected from the group of proteins consisting of KLH, BSA, and BTG.

FIG. 1 shows a representative scheme for synthesizing compounds and immunogens in accordance with this first series of preferred embodiments. It is to be understood that in this representative synthetic scheme, the starting materials, reagents, individual synthetic transformations, and reaction conditions are purely illustrative, and are not to be construed as limiting. Alternative synthetic preparations, including syntheses based on entirely different starting materials than the ones shown, can be developed without departing from the spirit and scope of the appended claims.

As shown in FIG. 1, the synthesis begins with the ecstasy drug methylenedioxyamphetamine (MDA) **2**. The primary amino group of **2** is reacted with 4-bromo-butyric acid ethyl ester to give alkylation product **4**. The resultant secondary amino group of **4** is protected using a suitable amino protecting group. As shown in FIG. 1, the amino group of **4** is trifluoroacetylated with trifluoroacetic anhydride (TFAA) to give protected trifluoroacetylated derivative **6**. Hydrolysis of the ethyl ester moiety of **6** gives the carboxylic acid derivative **8**, which is esterified by reaction with N-hydroxysuccinimide (NHS) to give activated ester derivative **10**. Activated ester derivative **10** is reacted with a macromolecular carrier moiety [ T ] (e.g., KLH, BTG, BSA), deprotected (e.g., with potassium carbonate or at pH13), and dialyzed to provide immunogen **12**.

Although the preferred moieties  $-(CH_2)_3-$  and  $-CO-$  correspond to J and M, respectively, in compounds **6**, **8**, **10**, and **12** of FIG. 1, it should be emphasized that the specific compounds shown in this synthesis are purely illustrative, and that the synthetic strategy outlined in FIG. 1 can be modified to prepare compounds having substantially different chemical structures. For example, the alkylating agent 4-bromo-butyric acid ethyl ester shown in FIG. 1 can be replaced with a reagent having more or less contiguous methylene units separating the leaving group (e.g., bromide) from the terminal functional group (e.g., the ethyl ester). Similarly, the carbon chain separating these termini can contain heteroatoms, substitution, unsaturation, or the like.

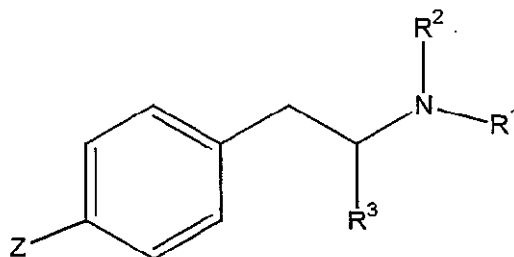
Moreover, the functional group introduced through this alkylation step (i.e., the ethyl ester moiety of 4-bromo-butyric acid ethyl ester) can be replaced by a wide array of alternative moieties including but not limited to alcohols, protected alcohols, carboxylic acids, protected carboxylic acids, amines (e.g., primary, secondary, or tertiary), protected amines, thiols, protected thiols, thioethers, amides, thioamides, imides, thioimides, nitriles, imines, hydrazones, maleimidothioethers, and the like, or by any functional group precursor to these moieties that can be converted thereto by one or more synthetic transformations, as is well established in the art.

Although the synthetic strategy outlined in FIG. 1 introduces the –J-M-T moiety through the alkylation of the amino group contained in MDA **2**, it should be emphasized that this strategy of elaborating a methylenedioxy-phenyl ring system that already contains nitrogen is purely illustrative, and that numerous alternative strategies can be employed instead. For example, a methylenedioxy-phenyl ring system containing a leaving group in place of the amino group of MDA **2** can be reacted with an amino-containing nucleophile, or with a nucleophile containing a precursor to an amino group (e.g., azide, cyanide, etc.). Indeed, reacting an analogue of MDA **2** containing a leaving group in place of the amino group with an amino analogue of 4-bromo-butyric acid ethyl ester—that is, with  $\text{NH}_2\text{-(CH}_2\text{)}_3\text{-CO}_2\text{Et}$ —would also provide compound **6** via a different route. All manner of chemical transformations known in the art—including but not limited to those described in treatises such as *Comprehensive Organic Transformations, 2<sup>nd</sup> Edition* by Richard C. Larock (Wiley-VCH, New York, 1999) and *March's Advanced Organic Chemistry, 5<sup>th</sup> Edition* by Michael B. Smith and Jerry March (John Wiley & Sons, Inc., 2001), and references cited therein, are contemplated for use in accordance with the presently preferred embodiments.

Transformations that may prove useful for modifications of the representative synthesis shown in FIG. 1 include but are by no means limited to Fischer esterifications, preparation of other activated esters (e.g., with carbonyldiimidazole, dicyclohexylcarbodiimide, 2-chloropyridinium, 3-chloroisoxazolium, 2,2'-dipyridyl disulfide, 2-pyridyl thiochloroformate, and the

like), oxidations (e.g., of alcohols, amines, thiols, thioethers, Baeyer-Villiger oxidation, etc.), reductions (e.g., reduction of nitro group, reductions of carbonyl groups, hydrogenation, etc.), protection of the amino group (e.g., carbamates amides, N-alkyl amines, N-aryl amines, imines, enamines, N-hetero atom derivatives, and the like) and the corresponding deprotections, condensation reactions (e.g., aldol, Claisen, Knoevenagel, etc.), 1,4-addition reactions (e.g., Michael reaction, Corey-Whitesides-House organocuprate coupling, etc.), 1,2-addition reactions (e.g., Grignard reactions, carbonyl reductions, etc.), reduction of nitriles, deprotection of alcohols, deprotection of carboxylic acids, deprotection of ketones, deprotection of aldehydes, reduction of azides, reductions of imines, and the like.

A second series of compounds embodying features of the present invention has a structure II:



wherein:  $R^1$  is an alkyl group comprising 2-6 carbon atoms;  $R^2$  is selected from the group consisting of hydrogen, an alkyl group, and a protecting group;  $R^3$  is an optionally substituted alkyl group; and Z is  $-L-X-Q$ . L comprises 1-15 carbon atoms and 0-6 heteroatoms. X is selected from the group consisting of  $-O-$ ,  $-CO-$ ,  $-NR^4-$ ,  $-S-$ ,  $-C(=NH)O-$ ,  $-NH(CO)-$ ,  $-NH(CO)NH-$ ,  $-NH(CS)-$ ,  $-NH(CS)NH-$ ,  $-O(CO)NH-$ ,  $-NH(C=NH)-$ , and maleimidothioether, wherein  $R^4$  is selected from the group consisting of hydrogen and an alkyl group. Q is selected from the group consisting of hydrogen, a hydroxyl, a leaving group, a macromolecular carrier, and a label.

Preferably, the macromolecular carrier is selected from the group consisting of proteins, polypeptides, and polysaccharides. Preferred proteins include KLH (keyhole limpet hemocyanin), BSA (bovine serum albumin), and

BTG (bovine thyroglobulin). Preferably, the alkyl groups comprise straight or branched chains and 1-15 carbon atoms, more preferably 1-11 carbon atoms, and still more preferably 1-9 carbon atoms.

In this second series of preferred embodiments, the connectivity of carbon atoms and optional heteroatoms comprising L is unrestricted, and may include straight, branched, cyclic, and acyclic systems. It is preferred that L comprises  $-(CH_2)_j-$ , wherein j is 1, 2, 3, 4, 5, or 6, and more preferably j is 3. It is further preferred that X is  $-CO-$ . Preferably,  $R^1$  is ethyl, n-propyl, or n-butyl, and more preferably,  $R^1$  is ethyl. Preferably,  $R^2$  is hydrogen or a protecting group, and more preferably,  $R^2$  is a protecting group such as the trifluoroacetyl group. Preferably,  $R^3$  is hydrogen, methyl, ethyl, n-propyl, or n-butyl, and more preferably  $R^3$  is methyl. Preferably, Q is selected from the group consisting of hydroxy, N-oxy succinimide, a hemocyanin, a globulin, and an albumin, and more preferably, Q is selected from the group of proteins consisting of KLH, BSA, and BTG.

FIG. 2 shows a representative scheme for synthesizing compounds and immunogens in accordance with this second series of preferred embodiments. It is to be understood that in this representative synthetic scheme, the starting materials, reagents, individual synthetic transformations, and reaction conditions are purely illustrative, and are not to be construed as limiting. Alternative synthetic preparations, including syntheses based on entirely different starting materials than the ones shown, can be developed without departing from the spirit and scope of the appended claims.

As shown in FIG. 2, the synthesis begins with 1-methyl-2-phenylethylamine **14**. The amino group of **14** is alkylated with ethyl bromide to give N-ethylamine derivative **16**. The amino group of **16** is protected using a suitable amino protecting group. As shown in FIG. 2, the amino group of **16** is trifluoroacetylated with trifluoroacetic anhydride (TFAA). Trifluoroacetylated derivative **18** is reacted with succinic anhydride in a Friedel-Crafts type reaction to give carboxylic acid derivative **20**. Reduction of the benzyl carbonyl group of carboxylic acid derivative **20** gives reduction product **22**, which is esterified by reaction with N-hydroxysuccinimide (NHS) to give the

activated ester derivative **24**. Activated ester derivative **24** is reacted with a macromolecular carrier moiety [ Q ] (e.g., KLH, BSA, BTG), the nitrogen deprotected under basic conditions and dialyzed to provide immunogen **26**. Alternatively, as shown in FIG. 3, activated ester derivative **24** can be further elaborated, for example, by reaction with 4-aminomethylbenzoic acid to give benzoic acid derivative **32**. Benzoic acid derivative **32**, and activated ester derivative **34** obtained from **32** by reaction with N-hydroxysuccinimide, are useful intermediates in the synthesis of a wide array of conjugates, labels, and the like in accordance with the present invention. The elaboration strategy outlined in FIG. 3 (i.e., introduction of the aminobenzoate moiety) can be easily adapted for use with methylenedioxy compounds of the type shown in FIG. 1 (e.g., by reacting activated ester derivative **10** with 4-aminomethylbenzoic acid).

Although the preferred moieties  $-(CH_2)_3-$  and  $-CO-$  correspond to L and X, respectively, in compounds **22**, **24**, and **26** of FIG. 2, it should be emphasized that the specific compounds shown in this synthesis are purely illustrative, and that the synthetic strategy outlined in FIG. 2 can be modified to prepare compounds having substantially different chemical structures. For example, the succinic anhydride shown in FIG. 2 can be replaced with a cyclic anhydride having more or fewer ring carbon atoms and/or ring heteroatoms, which themselves can be substituted, contain unsaturation, or the like. Moreover, there is no necessity to employ a cyclic anhydride as the Friedel-Crafts acylating agent. Acyclic reagents (e.g., acyl halides, carboxylic acids, ketenes, etc.) can also be employed. Furthermore, there is no necessity to employ a Friedel-Crafts acylation reaction to elaborate the structure of the phenyl ring as shown in FIG. 2. A multitude of alternative electrophilic aromatic substitutions can also be employed including but not limited to Friedel-Crafts alkylation, halogenation, nitration, sulfonation, *ipso* substitution, and the like. Similarly, the functional group introduced through the Friedel-Crafts acylation step (i.e., the terminal carboxylic acid moiety shown in compounds **20** and **22**) can be replaced by or converted to a wide array of alternative moieties including but not limited to alcohols, protected alcohols,

protected carboxylic acids, amines (e.g., primary, secondary, or tertiary), protected amines, thiols, protected thiols, thioethers, amides, thioamides, imides, thioimides, nitriles, imines, hydrazones, maleimidothioethers, and the like, or by any functional group precursor to these moieties that can be converted thereto by one or more synthetic transformations, as is well established in the art.

Although the synthetic strategy outlined in FIG. 2 introduces the -L-X-Q moiety through the acylation of the phenyl ring of trifluoroacetylated derivative **18**, it should be emphasized that this strategy of elaborating a pre-existing phenyl ring by an electrophilic substitution is purely illustrative, and that numerous alternative strategies could have been employed instead. For example, a phenyl ring substituted with a halogen (e.g., Cl, Br, I) at the position *para* to the amino-containing side chain can be converted to an organometallic reagent (e.g., a Grignard, an organolithium, an organostannane, an organoborane, an organocuprate, or the like) and reacted with an electrophilic reagent (e.g., a ketone, an aldehyde, an acid halide, a haloalkane, etc.) to form a carbon-carbon bond, using procedures well-known in the art. Alternatively, a phenyl ring substituted with an appropriate leaving group (e.g., Cl, Br, I, alkoxy, etc.) at the position *para* to the amino-containing side chain can be subjected to a nucleophilic aromatic substitution reaction, using procedures well-known in the art. Furthermore, the substitution pattern of the phenyl ring could be developed on an entirely saturated or partially unsaturated cyclohexane ring system (or precursor thereto), which is aromatized using reagents well-known in the art, including but not limited to hydrogenation catalyts (e.g., Pt, Pd, Ni, etc.), S and Se, quinines, and the like.

As noted above in reference to the synthetic scheme shown in FIG. 1, all manner of chemical transformations known in the art are contemplated for use in accordance with the presently preferred embodiments.

Transformations that may prove useful for modifications of the representative synthesis shown in FIG. 2 include but are by no means limited to the ones identified above in reference to the synthetic scheme of FIG. 1, as well as

Wolff-Kishner reduction, Clemmensen reduction, the reduction of hydrazones (e.g., using  $\text{LiAlH}_4$ ,  $\text{NaBH}_4$ ,  $\text{NaBH}_3\text{CN}$ , or the like), and the like.

A first antibody embodying features of the present invention is specific for an ecstasy drug. Preferably, the ecstasy drug is selected from the group consisting of MDA, MDMA, MDEA, MDPA, BDB, MBDB, and combinations thereof.

A second antibody embodying features of the present invention is specific for MDEA.

A third antibody embodying features of the present invention is specific for an analyte (i.e., an immunogen, conjugate, or other chemical substance) comprising a structure I or II shown and described above.

Immunogens from the above-mentioned first series of preferred embodiments—that is, the series of compounds comprising a fused methylenedioxy-phenyl ring system (e.g., FIG. 1)—are useful for producing antibodies specific for ecstasy drugs including but not limited to MDA, MDMA, MDEA, MDPA, BDB, MBDB, and combinations thereof. Table 1, shown in FIG. 4, shows cross-reactivity data for several antibodies specific for ecstasy drugs, especially from Fusion #3, and in particular for Ab 2.1.1, which is an antibody generated in response to immunogen **12** of FIG. 1 wherein T is KLH. A classical immunization protocol of the type well established in the art was employed in developing this data. In Table 1, the abbreviation dAM represents d-amphetamine, the abbreviation dMA represents d-methamphetamine, the abbreviation IAM represents l-amphetamine, the abbreviation IMA represents l-methamphetamine, the abbreviation Ses represents sesamin, the abbreviation Phen represents phentermine, the abbreviation Tyr represents tyramine, the abbreviation Pseu represents pseudoephedrine, the abbreviation Eph represents ephedrine, the abbreviation PPA represents phenylpropanolamine, the abbreviation nEpn represents norephedrine, the abbreviation Adr represents adrenaline, and the abbreviation Ran represents ranitidine (sold under the tradename ZANTAC by Glaxo Wellcome, and distributed by Warner-Lambert Consumer Healthcare, Morris Plains, NJ).

Antibodies elicited by the immunogen **12** (e.g., wherein T is KLH) show good response and specificity to ecstasy drugs, as shown by the competitive inhibition plot in FIG. 5. Furthermore, these antibodies show little or no cross-reactivity to related drugs, as shown by the competitive inhibition plot in FIG. 6. In FIG. 6, the abbreviation dAMP represents d-amphetamine, the abbreviation lAMP represents l-amphetamine, and the abbreviation Smin represents sesamin, while the abbreviation lMA, dMA, and Phen have the same meanings as in Table 1 described above.

Table 2 shows cross-reactivity data for the antibody MDMA-2.1.1 that is generated in response to immunogen **12** of FIG. 1 wherein T is KLH. By determining the drug concentration that results in a 50% reduction in binding (ED 50) of a standard, methamphetamine, dividing by the ED50 of each other drug, and then multiplying the result by 100, the percent cross-reactivities shown in Table 2 can be calculated. The antibodies used in developing this data were produced through a classical immunization protocol of the type well established in the art.

Table 2: Cross-reactivity of MDMA-2.1.1 for various drugs.

Drug	% Cross-reactivity
d-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
Sesamin	0
Phentermine	0
Tyramine	0
Pseudoephedrine	0
Ephedrine	0
Phenylpropanolamine	0
Norepinephrine	0
Adrenaline	0
Ranitidine (ZANTAC)	0

Immunogens from the above-mentioned second series of preferred embodiments—that is, the series of compounds lacking a fused methylenedioxy-phenyl ring system—are useful for producing antibodies specific for ecstasy drugs including but not limited to MDA, MDMA, MDEA, MDPA, BDB, MBDB, and combinations thereof. Antibodies produced in response to N-ethyl substituted immunogens from this second series (i.e., R<sup>1</sup> in structure II is ethyl) show particularly high recognition for the ecstasy drug MDEA (“Eve”), which is generally poorly detected by conventional amphetamine and methamphetamine immunoassays. An antibody thus produced can be used either as a booster antibody to increase detection in an existing amphetamine or methamphetamine assay or as a separate antibody for MDEA in immunoassays for MD-class drugs.

Table 3 shows cross-reactivity data for the antibody NEAMP-1.3, which is generated in response to immunogen **26** of FIG. 2 wherein Q is KLH. By the procedure described above, the percent cross-reactivities shown in Table

3 can be calculated. The antibodies used in developing this data can be produced using a classical immunization protocol.

TABLE 3: Cross-reactivity of NEAMP-1.3 for various drugs

Drug	Percent Cross-Reactivity
d-methamphetamine	100
l-methamphetamine	nd
d-amphetamine	32.5
l-amphetamine	33.5
MDMA	114
MDEA	507
MDBD	20
Phendimetrazine	0.6
Pseudoephedrine	2.0
l-ephedrine	6.7
Ranitidine (ZANTAC)	0.2

Antibodies elicited by the N-ethyl substituted immunogen **26** (e.g., wherein Q is KLH) show good response and specificity to ecstasy drugs in general, and to MDEA in particular, as shown by the competitive inhibition plot in FIG. 7. In FIG. 7, the abbreviation dMeth represents d-methamphetamine, and the abbreviation l-meth represents l-methamphetamine.

A reagent kit embodying features of the present invention comprises an antibody embodying features of the present invention. A representative reagent kit may comprise an antibody specific for an ecstasy drug, a complex comprising a ligand of an ecstasy drug or a derivative thereof coupled to a labeling moiety, and may optionally also comprise one or more calibrators comprising a known amount of an ecstasy drug or a related standard.

Antibodies embodying features of the present invention can be included in a kit, container, pack, or dispenser together with instructions for their utilization. When the antibodies are supplied in a kit, the different

components of the immunoassay may be packaged in separate containers and admixed prior to use. Such packaging of the components separately may permit long-term storage without substantially diminishing the functioning of the active components. Furthermore, reagents can be packaged under inert environments (e.g., under a positive pressure of nitrogen gas, argon gas, or the like), which is especially preferred for reagents that are sensitive to air and/or moisture.

Reagents included in kits embodying features of the present invention can be supplied in all manner of containers such that the activities of the different components are substantially preserved, while the components themselves are not substantially adsorbed or altered by the materials of the container. Suitable containers include but are not limited to ampules, bottles, test tubes, vials, flasks, syringes, envelopes (e.g., foil-lined), and the like. The containers may be comprised of any suitable material including but not limited to glass, organic polymers (e.g., polycarbonate, polystyrene, polyethylene, etc.), ceramic, metal (e.g., aluminum), metal alloys (e.g., steel), cork, and the like. In addition, the containers may comprise one or more sterile access ports (e.g., for access via a needle), such as may be provided by a septum. Preferred materials for septa include rubber and polytetrafluoroethylene of the type sold under the trade name TEFLON by DuPont (Wilmington, DE). In addition, the containers may comprise two or more compartments separated by partitions or membranes that can be removed to allow mixing of the components.

Reagent kits embodying features of the present invention may also be supplied with instructional materials. Instructions may be printed (e.g., on paper) and/or supplied in an electronic-readable medium (e.g., floppy disc, CD-ROM, DVD-ROM, zip disc, videotape, audio tape, etc.). Alternatively, instructions may be provided by directing a user to an Internet web site (e.g., specified by the manufacturer or distributor of the kit) and/or via electronic mail.

As noted above, reagent kits embodying features of the present invention may comprise calibration or control materials, which comprise a

known amount of the analyte to be measured. The concentration of an analyte can be calculated by comparing results obtained for the sample with results obtained for the standard. A calibration curve can be constructed and used for relating the sets of results, and for determining the concentration of an analyte in a sample. FIG. 8 shows a curve on a HITACHI Analyzer using modified Roche ONLINE formats and reagents and Ab MDMA 2.1.1 (i.e., the antibody elicited from immunogen **12** in which T is KLH).

Methods of detecting an analyte that embody features of the present invention comprise contacting a sample with an antibody embodying features of the present invention, binding the antibody to the analyte, and detecting an adduct formed by the antibody and the analyte.

Any sample that is suspected of containing an analyte (e.g., an ecstasy drug) can be analyzed in accordance with the methods of the presently preferred embodiments. The sample can be pretreated if desired and can be prepared in any convenient medium that does not interfere with the assay. Preferably, the sample comprises an aqueous medium, such as a body fluid from a host. Representative bodily fluids include but are not limited to urine, whole blood, plasma, serum, saliva, semen, stool, sputum, cerebral spinal fluid, tears, mucus, and the like, and combinations thereof. Preferably, the bodily fluid comprises a plasma, serum, or urine.

It is to be understood that all manner of immunoassays employing antibodies are contemplated for use in accordance with the presently preferred embodiments, including assays in which antibodies are bound to solid phases and assays in which antibodies are in liquid media. Methods of immunoassay that can be used to detect analytes using antibodies embodying features of the present invention include but are not limited to: competitive (reagent limited) assays wherein labeled analyte and analyte in a sample compete for antibodies; single-site immunometric assays wherein the antibody is labeled; two-site immunometric (reagent excess) assays wherein a capture antibody (i.e., an antibody attached to a solid phase) binds a first epitope of an antigen, and wherein a detecting antibody (i.e., a labeled antibody) binds to the antigen-capture antibody complex; and the like.

Procedures for performing various types of immunoassays are well established in the art and are set forth in numerous treatises and publications including *The Immunoassay Handbook, 2<sup>nd</sup> Edition* edited by David Wild (Nature Publishing Group, 2000), the entire contents of which are incorporated herein by reference, except that in the event of any inconsistent disclosure or definition from the present application, the disclosure or definition herein shall be deemed to prevail.

Methods of producing antibodies embodying features of the present invention comprise inoculating a host with an immunogen embodying features of the present invention. Suitable hosts include but are not limited to mice, rats, hamsters, guinea pigs, rabbits, chickens, donkeys, horses, monkeys, chimpanzees, orangutans, gorillas, humans, and any species capable of mounting a mature immune response. The immunization procedures used are well established in the art and are set forth in numerous treatises and publications including *The Immunoassay Handbook, 2<sup>nd</sup> Edition* cited above, and the references cited therein.

Preferably, an immunogen embodying features of the present invention is administered to a host subject (e.g., an animal or a human) in combination with an adjuvant. Suitable adjuvants include but are not limited to Freund's adjuvant, powdered aluminum hydroxide (alum), aluminum hydroxide together with *Bordetella pertussis*, and monophosphoryl Lipid A synthetic-trehalose dicorynomycolate (MPL-TDM).

Polyclonal antibodies can be raised in a mammalian host by one or more injections of an immunogen, which can optionally be administered together with an adjuvant. Typically, an immunogen (or a combination of an immunogen and an adjuvant) is injected into a mammalian host by one or multiple subcutaneous or intraperitoneal injections. Preferably, the immunization program is carried out over at least one week, and more preferably over two or more weeks. Polyclonal antibodies produced in this manner can be isolated and purified utilizing methods well known in the art.

Monoclonal antibodies can be produced by the well-established hybridoma methods of Köhler and Milstein (e.g., *Nature*, **1975**, 256, pp. 495-

497). Hybridoma methods typically involve: (1) immunizing a host or lymphocytes from a host; (2) harvesting the monoclonal antibody secreting (or having the potential to secrete) lymphocytes; (3) fusing the lymphocytes to immortalized cells; and (4) selecting cells that secrete the desired monoclonal antibody.

A host can be immunized to elicit lymphocytes that produce or are capable of producing antibodies specific for an immunogen. Alternatively, the lymphocytes can be immunized *in vitro*. If human cells are desired, peripheral blood lymphocytes (PBLs) can be used, although spleen cells or lymphocytes from other mammalian sources are preferred.

The lymphocytes can be fused with an immortalized cell line to form hybridoma cells, a process which can be facilitated by the use of a fusing agent (e.g., polyethylene glycol). By way of illustration, mutant rodent, bovine, or human myeloma cells immortalized by transformation can be used. Substantially pure populations of hybridoma cells—as opposed to unfused immortalized cells—are preferred. Thus, following fusion, the cells can be grown in a suitable medium that inhibits the growth or survival of unfused, immortalized cells, for example, by using mutant myeloma cells that lack the enzyme hypoxanthine guanine phosphoribosyl transferase (HGPRT or HPRT). In such an instance, hypoxanthine, aminopterin and thymidine can be added to the medium (HAT medium) to prevent the growth of HGPRT-deficient cells while permitting hybridomas to grow.

Preferably, immortalized cells fuse efficiently, can be isolated from mixed populations by selection in a medium such as HAT, and support stable and high-level expression of antibody following fusion. Preferred immortalized cell lines include myeloma cell lines available from the American Type Culture Collection (Manassas, VA).

Because hybridoma cells typically secrete antibody extracellularly, the culture media can be assayed for the presence of monoclonal antibodies specific for the MD-class of amphetamine derivatives. Immunoprecipitation or *in vitro* binding assays—for example, radio immunoassay (RIA) or enzyme-

linked immunoabsorbent assay (ELISA)—can be used to measure the binding specificity of monoclonal antibodies.

Monoclonal antibody secreting hybridoma cells can be isolated as single clones by limiting dilution procedures and sub-cultured. Suitable culture media include but are not limited to Dulbecco's Modified Eagle's Medium, RPMI-1640, and polypeptide-free or polypeptide-reduced or serum-free media (e.g., Ultra DOMA PF or HL-1, available from Biowhittaker; Walkersville, MD). Alternatively, the hybridoma cells can be grown *in vivo* as ascites.

Monoclonal antibodies can be isolated and/or purified from a culture medium or ascites fluid by conventional Ig purification procedures including but not limited to: polypeptide A-Sepharose, hydroxylapatite chromatography; gel electrophoresis; dialysis; ammonium sulfate precipitation; and affinity chromatography.

Monoclonal antibodies can also be produced by recombinant methods, such as are described in United States Patent No. 4,166,452. DNA encoding monoclonal antibodies can be isolated and sequenced using conventional procedures (e.g., using oligonucleotide probes that specifically bind to murine heavy and light antibody chain genes), preferably to probe DNA isolated from monoclonal antibody hybridoma cell lines secreting antibodies specific for ecstasy drugs. The isolated DNA fragments can be sub-cloned into expression vectors that are then transfected into host cells—for example, simian COS-7 cells, Chinese hamster ovary (CHO) cells, or myeloma cells that do not otherwise produce Ig polypeptide—to express monoclonal antibodies. The isolated DNA fragments can be modified by substituting the coding sequence for human heavy and light chain constant domains in place of the homologous murine sequences, as described in United States Patent No. 4,816,567, or by fusing the Ig coding sequence to all or a portion of the coding sequence for a non-Ig polypeptide. Such a non-Ig polypeptide can be substituted for the constant domains of an antibody, or can be substituted for the variable domains of one antigen-combining site to create a chimeric bivalent antibody.

The following representative procedures for preparing immunogens embodying features of the present invention and for developing hybridomas to ecstasy drugs are provided solely by way of illustration, and are not intended to limit the scope of the appended claims or their equivalents.

## Examples

### General

Chemical reagents were obtained from Aldrich Chemical Co., Milwaukee, WI, USA, unless otherwise stated. Solvents were obtained from either J T Baker or Fisher Scientific and were of ACS or HPLC grade or better, unless otherwise stated. Methylene chloride ( $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ ) was dried by distillation over and from calcium hydride. Tetrahydrofuran (THF) was dried by distillation over and from sodium and benzophenone. Dry dimethylformamide (DMF) was obtained from Aldrich Chemical Co. in sealed SURESEAL bottles. Column chromatography was performed using E.M. Science flash-grade silica gel (Cat. # 9385-9; Silica gel 60; 230-400 mesh ASTM). Thin layer chromatography was performed using silica gel plates obtained from E.M. Science (Cat. # 5715-7; 0.025 cm thickness). "KPI" refers to potassium phosphate buffer. Mixed solvents are expressed as volume for volume percentages (e.g., 10% MeOH- $\text{CHCl}_3$  or 10% MeOH in  $\text{CHCl}_3$  is chloroform containing 10% of methanol by volume).

## Representative Synthetic Procedures

### Synthesis of MDA derivative 4

a) A suspension/solution of 700 mg of methylenedioxyamphetamine hydrobromide salt in methylene chloride ( $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ ) was shaken thoroughly with saturated aqueous (sat. aq.) sodium bicarbonate ( $\text{NaHCO}_3$ ). The layers were separated and the aqueous layer extracted repeatedly with additional  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  until only negligible organic material was being extracted. The combined organic layers were evaporated to dryness under reduced pressure (rotary

evaporator; rotovap) and briefly dried further under high vacuum to give 408 mg of the free base of methylenedioxyamphetamine **2** as an oil.

b) To a solution of 400 mg of the free base **2** in 5 mL of dry dimethylformamide (DMF) was added 387  $\mu\text{L}$  (1.2 mol. equiv.) of ethyl 4-bromobutyrate (Fluka Chemical Co.) and the reaction stirred overnight (O.N.) at room temperature (RT) under argon. The reaction mixture was diluted with 20 mL of  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ , stirred with 25 mL of sat. aq.  $\text{NaHCO}_3$ , the layers separated, the aq. layer extracted with 50 mL  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  followed by 50 mL ethyl acetate (EtOAc), the organic extracts combined, dried over sodium sulfate ( $\text{Na}_2\text{SO}_4$ ), evaporated under reduced pressure (rotovap) and the residue dried under high vacuum (manifold) to give 520 mg of the product **4**, shown by  $^1\text{H-NMR}$  to be about 90% pure. The material was used without further purification in the next step.

Material obtained from the extraction of a similar reaction after the aqueous quench indicated the presence of the product **4** as the HBr salt, together with small amounts of the disubstituted product, by  $^1\text{H-NMR}$ . Silica gel chromatographic purification [1<sup>st</sup> column: 20% methanol (MeOH) in chloroform ( $\text{CHCl}_3$ ) as eluent; 2<sup>nd</sup> column: EtOAc – MeOH – acetone – water (6:1:1:1) as eluent] gave clean product **4**. Mass spec: M-H, 292.

### Synthesis of 6

To a solution of 500 mg of crude **4** and 950  $\mu\text{L}$  (4 mol. equiv.) of triethylamine in dry  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  under argon and cooled to  $\sim 0^\circ\text{C}$  (ice bath) was added 289  $\mu\text{L}$  (1.2 mol. equiv.) of trifluoroacetic anhydride (TFAA). The reaction was allowed to warm up to RT while stirring overnight. The reaction was diluted to a volume of 50 mL with  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ , washed with water (2x50 mL), sat. aq.  $\text{NaHCO}_3$  (2x50 mL), sat. aq. sodium chloride (NaCl) (1x50 mL), dried over  $\text{Na}_2\text{SO}_4$ , evaporated (rotovap) and dried under high vacuum to give  $\sim 730$  mg of crude product. The material was chromatographed on silica gel, eluting with 30% EtOAc in hexanes, to give 449 mg of the product **6** as a pale colored liquid. Mass spec (M+H): Observed, 389.1449; Calc, 389.1450.

### Synthesis of 8

A solution of 445 mg of **6** in 2 mL of THF and 2 mL of 3-Normal (3N) perchloric acid was stirred at 50 °C (oil bath) under argon for 4.5 hours. The reaction was poured into 75 mL of water, the mixture extracted with EtOAc (2x50 mL), the organic extracts washed with water, dried (Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>) and evaporated (rotovap) to give 416 mg of crude product. The material was chromatographed on silica gel, eluting with 5% MeOH in CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>, the fractions containing product combined, evaporated (rotovap) and dried under high vacuum to give 320 mg of product **8** as a collapsing foam. Low Resolution Mass spec: (M+H): Observed, 362.1. High Resolution Mass Spec: (M+Na): Observed, 384.1024; Calc, 384.1035.

### Synthesis of 10

A solution of 310 mg of **8** in 20 mL of dry CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> under argon was treated with 296 mg (3 mol. equiv.) of N-hydroxysuccinimide followed by 329 mg (2 mol. equiv.) of 1-ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl)carbodiimide hydrochloride (EDC.HCl) (Sigma Chemical Co.) and stirred O.N. at RT. The reaction was washed with water (1x20 mL), sat. aq. NaHCO<sub>3</sub> (2x20 mL), sat. aq. NaCl (1x20 mL), dried (Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>) and evaporated (rotovap). The residue was chromatographed on silica gel, eluting with 30% EtOAc in hexanes, the product fractions combined and evaporated (rotovap). The residue was redissolved in dry CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> and re-evaporated (x6), then dried under high vacuum, to give 280 mg of the NHS ester derivative **10** as a white/colorless collapsing foam. High Res Mass Spec: (M+H): Observed, 459.1381; Calc, 459.1379.

### Synthesis of MDMA immunogen 12 (T = KLH; 12a)

To a stirring solution of 220 mg of purified keyhole limpet hemocyanin (KLH) in 13 mL of 50 mM Kpi pH 7.5 cooled in an ice-water bath was added 4.33 mL of dimethylsulfoxide (DMSO) dropwise, to give a solution of KLH in 25% DMSO – KPi. 1.58 mL, equivalent to ~20 mg protein, was withdrawn for use as the control. To the remainder was added a solution of 26 mg of **10** (~

0.6 equiv. per lysine in KLH) dissolved in a total of 1.5 mL DMSO, giving a reaction of **10** with KLH in ~31% DMSO – KPi. The ice bath was removed and the reaction (stoppered flask) stirred overnight. The opalescent gray reaction was transferred to dialysis tubing (15,000 MW cut-off; SpectraPor 7) and dialyzed sequentially against 30% DMSO – KPi/RT (3x1.1 L), 15% DMSO – KPi/RT, then KPi (1x2.2 L/RT -> ~4 °C; 5x2.2 L/~4 °C) (all KPi was 50 mM KPi pH 7.5). The control KLH was also transferred to dialysis tubing (15,000 MW cut-off; SpectraPor 7) and dialyzed separately against 30% DMSO – KPi, then placed in the same dialysis vessel with the immunogen when stepping down to 15% DMSO – KPi. 1 mL of the retentate was removed for determination of the extent of lysine modification. The remainder was dialyzed against 50 mM K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> (4x2.2 L/RT/2 days) then against KPi (4x2.2 L/~4 °C). Deprotection of the amine was completed by redialysis against pH 13 buffer (50 mM K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> basified with KOH to pH 13) at RT for ~7 days followed by dialysis back into 50 mM KPi pH 7.5 (3 changes) to give the MDMA immunogen **12** (T = KLH; **12a**) as an almost colorless clear solution. Coomassie Blue protein assay (modified Bradford assay) (Biorad Laboratories, Hercules, CA, USA) gave 1.9 mg/mL protein. Trinitrobenzenesulfonic acid (TNBS) assay on the undeprotected immunogen (*vide supra*) (after protein concentration determination via the Coomassie Blue assay) gave 38% modification of available lysines on KLH.

#### Synthesis of the MDMA conjugate **12** (T = BSA; **12b**)

To a stirring solution of 0.55 g of bovine serum albumin (BSA) (Pentex Fraction V; Miles Inc., Kankakee, IL, USA) in 11 mL of 50 mM KPi pH 7.5 cooled in an ice-water bath was added 4.0 mL of DMSO dropwise. From the resulting solution of BSA in ~27% DMSO – KPi was withdrawn 1.36 mL, containing ~0.05 g of BSA, for use as the control if needed. To the remaining solution was added 8.2 mg (~2.4 mol. equiv.) of **10** dissolved in a total of 0.6 mL of DMSO, resulting in a mixture of **10** and BSA in 30% DMSO – KPi. The ice-water bath was removed and the reaction allowed to stir overnight in a stoppered flask. The clear reaction was transferred to dialysis tubing (15,000

MW cut-off; SpectraPor 7) and dialyzed sequentially against 30% DMSO – KPi/RT (1.1 L), 15% DMSO – KPi/RT (1.1 L), KPi/RT (1x1.1), then 50 mM  $K_2CO_3$  (4x1.1 L/RT/2 days) then against KPi (4x2.2 L/~4 °C) (all KPi was 50 mM KPi pH 7.5). The control KLH was also transferred to dialysis tubing (15,000 MW cut-off; SpectraPor 7) and dialyzed separately against 30% DMSO – KPi, then placed in the same dialysis vessel with the immunogen when stepping down to 15% DMSO – KPi and carried forwards alongside. Analysis of a portion of the retentate here showed the protein concentration to be 18.9 mg/mL (Coomassie Blue protein assay) and the substitution by hapten to be ~1.6 (Difference UV, against the BSA control). Deprotection of the amine was completed by redialysis against pH 13 buffer (50 mM  $K_2CO_3$  basified with KOH to pH 13) at RT for ~4 days followed by dialysis back into 50 mM KPi pH 7.5 (4 changes) to give the MDMA conjugate **12** (T = BSA; **12b**) as a colorless clear solution. The protein concentration was determined by UV ( $OD_{280}$  of conjugate taken to be approximately the same as  $OD_{280}$  of parent BSA = 0.6 at 1 mg/mL) to be approximately 1.9 mg/mL protein.

#### Synthesis of N-ethylamphetamine **16**

5.0 g of d-amphetamine sulfate (Sigma Chemical Co., St. Louis, MO, USA) was treated with 100 mL of  $CH_2Cl_2$  and 30 mL of 1N NaOH and stirred vigorously for 15 min. The layers were separated and the aqueous portion was extracted with 25 mL of  $CH_2Cl_2$ . The organic portions were combined, dried over anhydrous  $Na_2SO_4$  and conc. at reduced pressure to give 3.66g of d-amphetamine free base **14** as a clear oil. This was dissolved in 30 mL of anhydrous DMF and treated with 2.9 g of ethyl bromide and stirred at room temp. for 3 days. The mixture was conc. at reduced pressure to yield 6.6 g and used crude in the next step. The product contains some starting material and diethylated by-product, which is difficult to purify by column chromatography.

### Synthesis of 18

A solution of 6.6 g of crude N-ethylamphetamine in 75 mL of anhydrous  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  was treated with 10 mL of triethylamine. The mixture was cooled with an ice bath and treated with 4.3 mL of trifluoroacetic anhydride and stirred at room temp. under argon overnight. The mixture was conc. at reduced pressure. The residue was dissolved in 75 mL of EtOAc and washed with 3x25 mL of sat.  $\text{NaHCO}_3$ , 25 mL of  $\text{H}_2\text{O}$ , 25 mL of sat. brine, dried over anhydrous  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  and conc. at reduced pressure. The residue was chromatographed on 300 g of silica gel using 30% EtOAc-hexane as eluent to yield 4.0 g of clear oil which still contained some diethylated by-product from the previous step. This was rechromatographed on 250 g of silica gel using 5% EtOAc-hexane as eluent to yield 2.6 g of **18** as a clear oil.

### Synthesis of 20

A solution of 2.0 g of **18** in 50 mL of anhydrous  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  under argon was treated with 1.2 g of succinic anhydride. The mixture was cooled with an ice bath then treated with 4.0 g of  $\text{AlCl}_3$  added portionwise. The reaction was stirred at  $0^\circ\text{C}$  for 2 hrs., then at room temp. overnight. The mixture was treated with 18 mL of 3N HCl added slowly at first, then stirred vigorously for 30 min. The layers were separated and the organic layer was washed with 25 mL of  $\text{H}_2\text{O}$  and 25 mL of sat. brine, dried over  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  and conc. at reduced pressure to an amber oil. This was chromatographed on 150 g of silica gel using 3% MeOH- $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  as eluent to yield 2.6 g of **20** as an amber oil.

### Synthesis of 22

A 500 mL Parr bottle was charged with 115 mg of 10% Pd/C followed by a solution of 600 mg of **20** in 30 mL of acetic acid and hydrogenated at 50 PSI for 17 hrs. The catalyst was filtered off through the filter agent sold under the tradename CELITE by Celite Corporation (available from Aldrich Chemical Company, Inc., Milwaukee, WI) and the filtrate was conc. at reduced pressure. Residual acetic acid was driven off by evaporating 5 times with 25

mL of toluene. The toluene was driven off by evaporating 5 times with  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  to yield 576 mg of **22** as an amber oil.

#### Synthesis of 24

A solution of 576 mg of **22** in 25 mL of anhydrous  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  under argon was treated with 260 mg of N-hydroxysuccinimide followed by 435 mg of 1-ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl)carbodiimide HCl and stirred at room temp. overnight. The mixture was washed with 25 mL of 0.1N HCl, 25 mL of  $\text{H}_2\text{O}$ , 2x25 mL of sat.  $\text{NaHCO}_3$ , 25 mL of sat. brine, dried over  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  and conc. at reduced pressure to yield 735 mg of **24** as an amber oil.

#### Synthesis of 32

A mixture of 108 mg of 4-(aminomethyl)benzoic acid in 5 mL of  $\text{H}_2\text{O}$  and 10 mL of distilled THF was treated with a solution of 315 mg of **24** in 10 mL of distilled THF, followed by 1.2 mL of 1N NaOH and stirred at room temp. for 1 hr. The pH of the reaction is 9. The THF was removed at reduced pressure and the aqueous residue was diluted with 5 mL of  $\text{H}_2\text{O}$ , and acidified to pH 6 with 6N HCl. This was extracted with 2x15 mL of EtOAc. The EtOAc extracts were combined, dried over anhydrous  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  and conc. in vacuo to yield 290 mg of **32** as a white amorphous solid.

#### Synthesis of 34

A solution of 270 mg of **32** in 10 mL of anhydrous  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  under argon was treated with 85 mg of N-hydroxysuccinimide followed by 140 mg of 1-ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl)carbodiimide HCl and stirred at room temp. overnight. The mixture was diluted with 10 mL of  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ , washed with 10 mL of 0.1N HCl, 10 mL of sat. brine, 2x10 mL of sat.  $\text{NaHCO}_3$ , 10 mL of sat. brine, dried over  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  and conc. at reduced pressure to a white amorphous solid. This was chromatographed on 80 g of silica gel using EtOAc as eluent to yield 190 mg of **34** as a white amorphous solid.

### Synthesis of N-ethylamphetamine immunogen **26** (Q = KLH **26a**)

A solution of 342 mg of purified KLH in 10 mL of 50 mM KPi pH 7.5 was cooled with an ice bath and treated with 4 mL of DMSO added dropwise. 1.7 mL was removed, which was used as a reference. This left 300 mg of KLH in solution. This was then treated with a solution of 50 mg of **24** in 1.0 mL of DMSO added dropwise. The reaction was stirred at room temp. overnight. The reaction and the reference sample were placed in separate 10,000 MW cut-off dialysis tubing (SpectraPor 7) and dialyzed in 1 liter of 33% DMSO-50 mM KPi pH 7.5 at room temp., 3 changes, at least 3 hrs. each, the last one going overnight. This was then dialyzed using a step-down gradient in 1 liter of 20% DMSO, 1 liter of 10% DMSO, 1 liter of 100% KPi pH 7.5 at room temp. at least 3 hrs. each. The bags were then placed in 1 liter of 50 mM K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> (pH 11.4) and dialyzed for 4 days at 40°C (changed once on day 2). This was then dialyzed in 1 liter of 50 mM KPi pH 7.5 at 4°C, 6 changes at least 6 hrs. each. Coomassie Blue Protein assay (modified Bradford assay) (Biorad Chem. Co.) gives a protein conc. of 8.16 mg/mL. Trinitrobenzenesulfonic acid (TNBS) assay on a protected sample gives 41.4% of available lysines modified.

### Synthesis of N-ethylamphetamine conjugate **26** (Q = BSA; **26b**)

A solution of 500 mL of bovine serum albumin (BSA) (Cohn Fraction V modified powder; Intergen Company, Purchase, NY, USA) in 8 mL of 50 mM KPi pH 7.5 was cooled with an ice bath and treated with 11 mL of DMSO added slowly dropwise. This was then treated with a solution of 6.7 mg of **24** in 1 mL of DMSO added dropwise and stirred at room temp. overnight. The mixture was placed into 10,000 MW cut-off dialysis tubing (SpectraPor 7) and dialyzed in 1 liter of 60% DMSO-50 mM KPi pH 7.5 at room temp. 3 changes at least 3 hrs. each, the last one going overnight. This was then dialyzed using a step-down gradient in 1 liter of 40% DMSO, 1 liter of 20% DMSO 1 liter of 10% DMSO and 1 liter of 100% 50mM KPi pH 7.5 at room temp. at least 3 hrs. each. This was then dialyzed in 1 liter of 50 mM K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> (adjusted to pH 13 with KOH) for 4 days with 4 changes of buffer. This was then

dialyzed in 1 liter of 50 mM KPi pH 7.5 at 4<sup>0</sup>C, 6 changes, at least 6 hrs. each. Coomassie Blue Protein Assay gives a protein conc. of 12.2 mg/mL.

### Development of Hybridomas to Ecstasy Drugs using MDMA-immunogen

#### Immunizations:

BALB/c female mice of 18-24 weeks of age were immunized with **12** (T = KLH; **12a**). The immunogen was emulsified in Freund's Adjuvant and administered via intraperitoneal (IP) injection. Injections were given at no less than 21 day intervals, and typically comprised 50 µg of the conjugate in 100 µL of 50% saline, 50% Adjuvant emulsion. Complete Freund's Adjuvant was used for the primary immunization, and Incomplete Freund's Adjuvant used thereafter. A booster immunization of 50 µg in the same emulsion was administered IP 4 days prior to fusion.

#### Fusion:

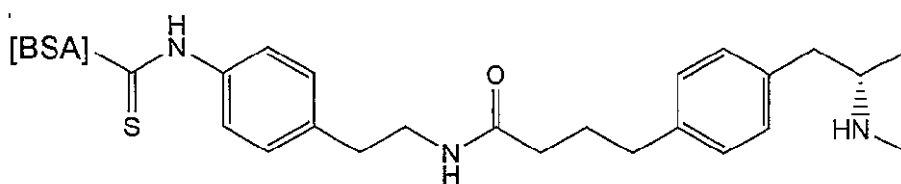
On the day of performing the fusion the mouse was killed by cervical dislocation and a blood sample taken. The spleen and popliteal, inguinal, subclavial and deep inguinal lymph nodes were harvested and pooled. These were ground between two sterile glass slides to release the lymphocytes. One-half of the resulting lymphocyte suspension was used to fuse with the F0 myeloma cell line, the remaining half was fused with the P3 myeloma (both myelomas were from ATCC).

Fusion consisted with adding myeloma cells (1/5 the number of lymphocytes), washing via centrifugation, resuspension in serum-free warm Iscove's Modified Dulbecco's Media, and re-centrifugation. The centrifuge tubes containing the resulting pellets were gently tapped to loosen the cells, then 1 mL of warmed PEG/DMSO solution (Sigma Chemical Co.) was slowly added with gentle mixing. The cells were kept warm for 1.5 minutes, after which pre-warmed serum-free IMDM was added at the following rates: 1 mL/min, 2 mL/min, 4 mL/min, 10mL/min, then the tube was filled to 50 mL, sealed and incubated for 15 minutes. The cell suspensions were centrifuged,

the supernatant decanted, and IMDM containing 10% Fetal calf serum was added. The cells were centrifuged once again, and re-suspended in complete cloning medium. This consists of IMDM, 10% FCS, 10% Condimed H1 (Roche Molecular Systems, Pleasanton, CA, USA), 4 mM Glutamine, 50  $\mu$ M 2-mercaptoethanol, 40  $\mu$ M ethanolamine, and pen/strep antibiotics. The cells were suspended at a density of  $4 \times 10^5$  lymphocytes/mL, distributed 100  $\mu$ L/well into sterile 96-well sterile microculture plates and incubated at 37 °C in 5% carbon dioxide for 24 hours. The next day, 100  $\mu$ L of HMT selective medium (Cloning medium + 1:25 HMT supplement from Sigma Chemical Co.) was added. On the 6<sup>th</sup> day of incubation, approximately 150  $\mu$ L of media was drawn from each well using a sterile 8-place manifold connected to a light vacuum source. One hundred fifty microliters of HT media was then added. This consists of Cloning Medium + 1:50 HT supplement (Sigma Chemicals). The plates were returned to the incubator and inspected daily for signs of growth. When growth was judged sufficient, wells were screened for antibody production via ELISA.

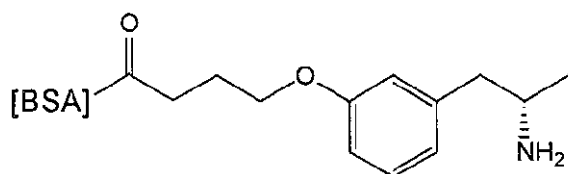
#### ELISA Screening:

Microplates were coated with 100  $\mu$ L methylenedioxymethamphetamine-BSA conjugate **12** (T = BSA; **12b**) at a concentration of 1 mg/mL and separate plates with either 100  $\mu$ L methamphetamine-BSA (MAMP-BSA) **28** at a concentration of 1 mg/mL



**28**

or with 100  $\mu$ L of Amphetamine-BSA (AMP-BSA) **30** at a concentration of 1 mg/mL



30

All dilutions are in 0.1 M carbonate buffer pH 9.5.

The plates were incubated covered for 1 hour at 37 °C (humidified). The plates were then emptied and filled with a post-coat solution consisting of Tris buffer, 1% gelatin hydrolysate, 2% sucrose, and 0.17% Tween-20 (all reagents were from Sigma Chemical Co.). The plates were incubated covered for an additional 1 hour at 37 °C (humidified) after which they were washed with Phosphate-buffered Saline containing 0.1% Tween 20. The plates were then filled with a 2% sucrose solution in 0.15M Tris, pH 7.2-7.4 briefly, then emptied and allowed to air dry at room temperature. When dried, the plates were packed in zip-lock bags containing several desiccant pillows, sealed and stored at 4 °C until use.

#### Primary Fusion Screen.

For the primary screening of the growing clones from the fusion plates, only the MDMA-BSA (**12**; T = BSA, **12b**) coated plates were used. Fifty microliters of PBS was added to each well, followed by 50  $\mu$ L of the sample of culture media from wells on the fusion plate, diluted 1:10 in PBS. The plates are incubated covered for 1 hour at 37 °C, then washed with PBS-Tween (0.1%). The wells are then filled with 100  $\mu$ L of goat anti-mouse IgG-HRP conjugate (Zymed Labs) diluted in PBS-Tween and the plates re-incubated for 1 hour. The plates are then washed again, and 100  $\mu$ L of K-Blue substrate (Neogen Corp) added. This is allowed to develop for 5-15 minutes, the reaction being stopped by the addition of 100  $\mu$ L of 1 N HCl. Color is read by means of a microplate reader at 450 nm and collected by computer for analysis. Those wells that showed the presence of antibody binding to MDMA-BSA (**12**; T = BSA, **12b**) were selected for further processing. Cells

were subjected to limiting dilution subcloning, and upon appearance of growth, were tested by a secondary screen.

#### Secondary Screen.

Four plates coated with the MDMA-BSA conjugate (**12**; T = BSA, **12b**) are prepared by adding 50  $\mu$ L of Phosphate buffered saline (PBS) to the wells of one plate, 50  $\mu$ L of a solution of free MDMA (800 ng/mL) to the second plate, 50  $\mu$ L of a solution of MDEA (800 ng/mL) to the third plate, and 50  $\mu$ L of a solution of pseudoephedrine (8  $\mu$ g/mL) to the fourth plate. All drugs were dissolved in PBS. Fifty microliters of PBS are added to the wells of the MAMP-BSA (**28**) and AMP-BSA (**30**) coated plates.

When the growing subclones were judged ready for testing, 25  $\mu$ L of supernatant from the wells were taken and transferred to 96-well flexible plates. Culture medium is added to each well to provide a 1:10 dilution of the media sample. Fifty microliters of the diluted sample are transferred to each of the coated plates above. Subsequent processing was exactly as for the Primary screen. Criteria for selection were binding to the MDMA-BSA (Methylenedioxymethamphetamine-BSA) conjugate (**12**; T = BSA, **12b**), and indication of inhibition by free MDMA and/or MDEA, and little or no inhibition by pseudoephedrine. Binding to the AMP-BSA (**30**) and MAMP-BSA conjugates (**28**) was for reference only.

Clones chosen were immediately subcloned, and when ready, retested by the secondary screen procedure. Stable subclones were expanded, frozen and the spent media used to determine specificity using the Cross-reactivity Assay. Subclones are identified by adding a "." suffix and a number indicating the order of selection, to the parent clone designation.

Table 4 presents a portion of the screening results.

Table 4

Clone	MDMA-BSA (12b) plates				(30) plates	(28) plates
	+PBS	+MDMA	+MDEA	+Pseu		
MDMA-2	3.169	–	–	–	–	–
MDMA-2.1	3.771	0.796	0.370	3.806	0.139	0.153
MDMA-2.1.1	4.200	0.857	0.754	3.910	1.679	0.089
MDMA-14	4.131	–	–	–	–	–
MDMA-14.1	3.898	0.724	0.454	3.802	0.241	0.145

### Cross-reactivity Assay

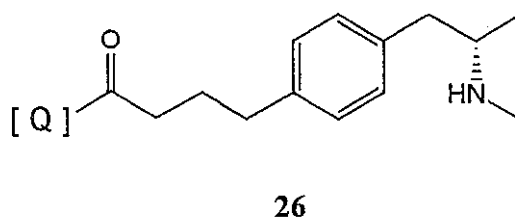
Supernatants are subjected to serial dilutions and re-tested in the ELISA screen above. The dilution providing for about a 50% reduction from the maximum OD is chosen for proceeding to cross-reactivity testing. This consists of repeating the preceding assay with the antibody at the chosen dilution and in the presence of varying concentrations of drugs. The charts shown in FIG. 5 and FIG. 6 present the results of such determinations.

### Development of Hybridomas to Ecstasy Drugs using N-Ethylamphetamine Immunogen

#### Immunizations

SJL female mice of 18-24 weeks of age were immunized via a modified RIMMS method (Kilpatrick et al., *Hybridoma*, **1997**, 16:4, pp. 381-389).

Briefly, immunogen **26** (Q = KLH, **26a**)



wherein Q is KLH was emulsified in incomplete Freund's Adjuvant and administered via subcutaneous injection at 6 sites distributed over the nape of the neck, and bilaterally to the calf and groin. Injections were given on day 0,

day 3, day 6, and day 11. The respective dosages given were: 50 µg, 25 µg, 12 µg, and 6 µg total amounts.

### Fusion

On day 13 two mice were killed via exsanguinations. The popliteal, inguinal, subclavial and deep inguinal lymph nodes were harvested and pooled. These nodes were ground between two sterile glass slides to release the lymphocytes. One-half of the resulting lymphocyte suspension was used to fuse with the F0 myeloma cell line. The remaining half was fused with the P3 myeloma (both myelomas were obtained from ATCC).

Fusion consisted of adding myeloma cells (1/5 the number of lymphocytes), washing via centrifugation, resuspension in serum-free warm Iscove's Modified Dulbecco's Media, and re-centrifugation. The centrifuge tubes containing the resulting pellets were gently tapped to loosen the cells, then 1 mL of warmed PEG/DMSO solution (Sigma Chemical Co.) was slowly added with gentle mixing. The cells were kept warm for 1.5 minutes, after which pre-warmed serum-free INMM was added at the following rates: 1 mL/min, 2 mL/min, 4 mL/min, and 10 mL/min. Then, the tube was filled to 50 mL, sealed and incubated for 15 minutes. The cell suspensions were centrifuged, the supernatant decanted, and IMDM containing 10% Fetal calf serum was added. The cells were centrifuged once again, and resuspended in complete cloning medium. This consists of IMDM, 10% FCS, 10% Condimed H1 (Roche Molecular Systems, Pleasanton, CA, USA), 4 mM Glutamine, 50 µM 2-mercaptoethanol, 40 µM ethanolamine, and pen/strep antibiotics. The cells were suspended at a density of  $4 \times 10^5$  lymphocytes/mL, distributed 100 µL/well into sterile 96-well microculture plates, and incubated at 37 °C in 5% CO<sub>2</sub> for 24 hours. The next day, 100 µL of HMT selective medium (Cloning medium + 1:25 HMT supplement from Sigma Chemicals) was added. On the 6<sup>th</sup> day of incubation, approximately 150 µL of media was drawn from each well using a sterile 8-place manifold connected to a light vacuum source. One hundred fifty microliters of HT media was then added.

This consists of Cloning Medium + 1:50 HT supplement (Sigma Chemical Co.). The plates were returned to the incubator and inspected daily for signs of growth. When growth was judged sufficient, wells were screened for antibody production via ELISA.

### ELISA Screening

Microplates were coated with 100  $\mu$ L Methamphetamine-BSA conjugate **28** and separate plates with 100  $\mu$ L N-ethylamphetamine-BSA **26** (Q = BSA, **26b**) at 1  $\mu$ g/mL in 0.1 M carbonate buffer, pH 9.5 for 1 hour at 37 °C (humidified). The plates were then emptied and filled with a post-coat solution consisting of Tris buffer, 1% gelatin hydrolysate, 2% sucrose, and 0.17% Tween-20 (all reagents were from Sigma Chemical Co.). The plates were incubated for an additional 1 hour at 37 °C (humidified) after which they were washed with Phosphate-buffered Saline containing 0.1% Tween 20. The plates were then filled with a 2% sucrose solution in 0.15 M Tris, pH 7.2-7.4 briefly, then emptied and allowed to air-dry at room temperature. When dried, the plates were packed in zip-lock bags containing several desiccant pillows, sealed and stored at 4 °C until use.

When the growing clones were judged ready for testing, 25  $\mu$ L of supernatant from the wells were taken and transferred to 96 well flexible plates. Culture medium is added to each well to provide a 1:10 dilution of the media sample. One hundred microliters of the diluted sample are transferred to each of the coated plates above. The plates are incubated covered for 1 hour at 37 °C, then washed with PBS-Tween. The wells are then filled with 100  $\mu$ L of goat anti-mouse IgG-HRP conjugate (Zymed Labs) diluted in PBS-Tween and the plates re-incubated for 1 hour. The plates are then washed again, and 100  $\mu$ L of K-Blue substrate (Neogen Corp) are added. This is allowed to develop for 5-15 minutes, the reaction being stopped by the addition of 100  $\mu$ L of 1 N HCl. Color is read by means of a microplate reader at 450 nm and collected by computer for analysis. A criterion for selection was binding to the Methamphetamine-BSA conjugate **28**. Table 5 presents

binding data for a portion of the screening of the Meth-BSA **28** and NEAMP-BSA **26** (Q = BSA, **26b**) coated plates.

Table 5

Clone	Meth-BSA <b>28</b>	NEAMP-BSA <b>26b</b>
Neamp-1	0.539	0.356
Neamp-2	0.350	1.146
Neamp-4	1.079	1.617

Clones chosen were immediately subcloned, and when ready, retested. Stable subclones were expanded, frozen and the spent media used to determine specificity using the Cross-reactivity Assay.

#### Cross-reactivity Assay

Supernatants are subjected to serial dilutions and re-tested in the ELISA screen above. The dilution providing for about a 50% reduction from the maximum OD is chosen for proceeding to cross-reactivity testing. This consists of repeating the preceding assay with the antibody at the chosen dilution and in the presence of varying concentrations of drugs. The chart shown in FIG. 7 presents the results of such a determination, while Table 3 (*vide supra*) shows the percentage cross-reactivity determined.

The foregoing detailed description and examples have been provided by way of explanation and illustration, and are not intended to limit the scope of the appended claims. Many variations in the presently preferred embodiments illustrated herein will be obvious to one of ordinary skill in the art, and remain within the scope of the appended claims and their equivalents.

## 4 Brief Description of Drawings

FIG. 1 shows a first representative scheme for synthesizing compounds and immunogens embodying features of the present invention.

FIG. 2 shows a second representative scheme for synthesizing compounds and immunogens embodying features of the present invention.

FIG. 3 shows a third representative scheme for synthesizing compounds embodying features of the present invention.

FIG. 4 shows a table of cross-reactivity data for antibodies embodying features of the present invention.

FIG. 5 shows an ELISA plot of competitive inhibition of an antibody embodying features of the present invention by members of the MD class of drugs.

FIG. 6 shows an ELISA plot of competitive inhibition of an antibody embodying features of the present invention by related drug derivatives.

FIG. 7 shows an ELISA plot of competitive inhibition of an antibody embodying features of the present invention by various drugs

FIG. 8 shows a curve generated using a conjugate and an antibody embodying features of the present invention.

## 1 Abstract

Compounds including haptens, intermediates, and immunogens that are useful in the production of antibodies specific for the methylenedioxy class of amphetamine derivatives are described. Antibodies specific for the methylenedioxy class of amphetamine derivatives, reagent kits containing antibodies specific for the methylenedioxy class of amphetamine derivatives, methods of producing antibodies specific for the methylenedioxy class of amphetamine derivatives, and methods of detecting analytes including members of the methylenedioxy class of amphetamine derivatives are also described.



FIG 5

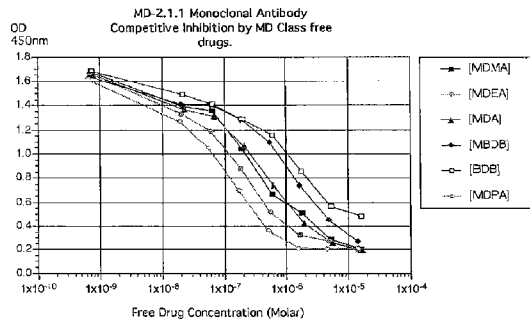


FIG. 7

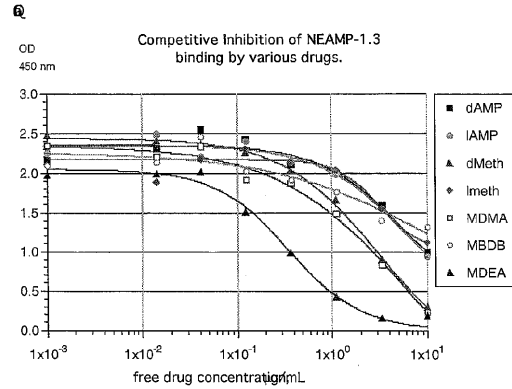
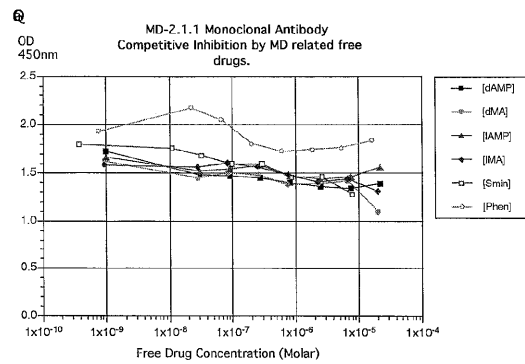


FIG. 6



MDMA 2.1.1 Cross-Reactivity in Modified Roche OnLine Format

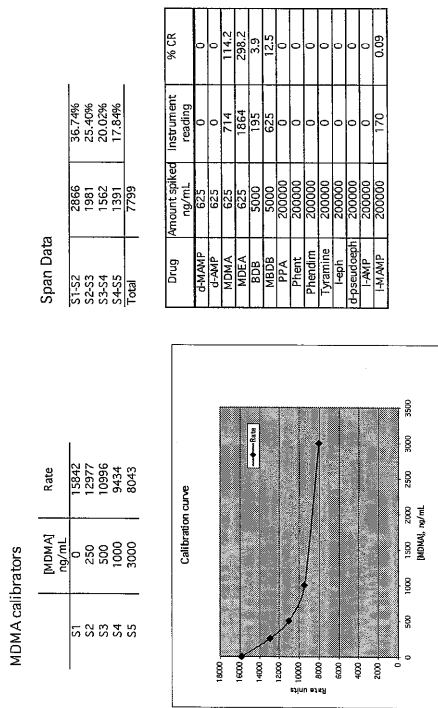


FIG. 8

专利名称(译)	化合物，抗体，试剂盒，抗体制备方法和标本检测方法		
公开(公告)号	<a href="#">JP2004123692A</a>	公开(公告)日	2004-04-22
申请号	JP2003049992	申请日	2003-02-26
申请(专利权)人(译)	F.霍夫曼 - 罗氏公司		
[标]发明人	レイモンドエーファイ リチャードティールート スティーブンエスヴィトン		
发明人	レイモンド エー.ファイ リチャード ティール.ルート スティーブン エス.ヴィトン		
IPC分类号	G01N33/53 C07C233/47 C07C237/22 C07D207/404 C07D207/46 C07K14/435 C07K14/76 C07K14/795 C07K16/44 C12P21/08 G01N33/94		
CPC分类号	C07K16/44 C07C233/47 C07D207/46 G01N33/946		
FI分类号	C07C233/47 C07C237/22 C07D207/404 C07K14/435 C07K14/76 C07K14/795 C07K16/44 C12P21/08 G01N33/53.G		
F-TERM分类号	4B064/AG27 4B064/CA20 4B064/CC24 4C069/AC30 4C069/BC06 4C069/BC12 4H006/AA01 4H006/AA03 4H006/AB20 4H006/BJ50 4H006/BM10 4H006/BM71 4H006/BS10 4H006/BV22 4H045/AA10 4H045/AA11 4H045/BA72 4H045/CA40 4H045/DA86 4H045/EA20 4H045/FA50		
代理人(译)	荒井英一		
优先权	10/087612 2002-03-01 US		
其他公开文献	JP4064261B2		
外部链接	<a href="#">Espacenet</a>		

摘要(译)

[问题] 本发明涉及可用于生产对亚甲二氧基类苯丙胺衍生物特异的抗体的化合物，如半抗原，中间体和免疫原。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具有特异性的抗体的试剂盒，对亚甲二氧基苯丙胺衍生物具有特异性的抗体的制造方法以及亚甲基 本发明还涉及一种检测包含二氧基类苯丙胺衍生物的分析物的方法。 解决方案：结构 [化学1] 具有[在说明书中定义每个符号的地方]的化合物。 [选择图]无

