

[19]中华人民共和国国家知识产权局

[51]Int. Cl⁶

[12] 发明专利申请公开说明书

[21] 申请号 96180126.3

G01N 33/68
G01N 33/543 C07K 16/16
C07K 14/415 A24B 15/36
A24B 15/40 A24D 3/04

[43]公开日 1999年3月17日

[11]公开号 CN 1211321A

[22]申请日 96.12.23 [21]申请号 96180126.3

[30]优先权

[32]95.12.26 [33]US [31]60/009,218

[32]95.12.26 [33]US [31]60/009,219

[86]国际申请 PCT/US96/20526 96.12.23

[87]国际公布 WO97/23783 英 97.7.3

[85]进入国家阶段日期 98.8.26

[71]申请人 皮考瓦医疗研究院

地址 美国纽约州

共同申请人 奥尔顿有限公司

[72]发明人 A·瑟拉米 R·J·布卡拉

H·维拉萨拉 H·W·富恩德斯

C·J·瑟拉米

[74]专利代理机构 中国专利代理(香港)有限公司

代理人 罗宏 杨九昌

权利要求书 5 页 说明书 41 页 附图页数 14 页

[54]发明名称 基于烟草及其燃烧副产物中存在的高级糖基化终产物的测定和处理方法 包括 所有这类方法和相应的材料。

[57]摘要

本发明公开了用于测定高级糖基化终产物(AGEs)的蓄积、和用于降低高级糖基化终产物蓄积的方法,这些方法基于这样一种发现,即 AGEs 及其前体的糖化毒素(glycotoxins)存在于烟草及其副产物中。更具体地说,这些方法基于这样一种观察结果,即相对于非吸烟个体来说,吸烟或另外使用烟草的个体的 AGEs 水平已经增加。本方法涉及在两种个体中和烟草及其副产物(烟雾)中测定 AGE 水平、并涉及使用能够与糖基化产物反应的试剂治疗这样的个体 以避免或减少 AGEs 在体内的累积。本发明还公开了用于评价烟草产物以测定其贮存情况和器官感觉能力和潜能的方法、用于处理环境空气以降低 AGE 水平的方法、和用于处理烟草产物和燃烧副产物以降低其中 AGE 水平的方法。例如,使用一种剂量器或类似装置可以吸入并评价空气或其它样品,从而测定 AGE 水平是否超过正常值,此后可以完成测定以改善环境条件。同样,本发明公开了用于从烟草的烟雾中去除 AGEs 的滤器和类似装置。本发明关注并

(BJ)第 1456 号

权 利 要 求 书

1. 一种用于在人类受试者体内测定如果可能的近来有吸烟史的方法，包括以下步骤：在所述的受试者体内测定高级糖基化终产物（AGEs）的血清水平，将此测定结果与取自具有在其他方面有类似病史的非吸烟个体的数据库标准相比较。

2. 一种用于估测吸烟过程中个体对高级糖基化终产物（AGEs）接触可能性的方法，包括以下步骤：在烟草及其挥发的燃烧产物（或烟雾）中测定这类 AGEs。

3. 一种用于测定烟草的器官感觉潜能的方法，包括以下步骤：在所述的烟草中测定高级糖基化终产物（AGEs）的存在及其量。

4. 一种用于测定烟草的期限和贮存情况的方法，包括以下步骤：在烟草中测定高级糖基化终产物（AGEs）的存在及其量。

5. 一种用于测定烟草的器官感觉潜能的方法，包括以下步骤：在由所述烟草燃烧产生的烟雾中测定高级糖基化终产物（AGEs）的存在及其量。

6. 一种用于测定烟草的期限和贮存情况的方法，包括以下步骤：在由所述烟草燃烧产生的烟雾中测定高级糖基化终产物（AGEs）的存在及其量。

7. 一种用于测定特殊烟草作物的商业价值的方法，包括以下步骤：测定烟草的器官感觉潜能并测定其期限和贮存情况，这一步骤通过在其样品中测定高级糖基化终产物（AGEs）及的存在其量来进行。

8. 权利要求 2-7 的方法，其中所述的 AGEs 通过以下步骤来测定：

A. 处理所述烟草的样品以形成怀疑含有所述 AGEs 或相应的前体的糖化毒素（glycotoxins）的提取物；和

B. 分析所述的提取物以检测其中含有的任何糖化毒素（glycotoxins）或 AGEs 的存在和量。

9. 权利要求 8 的方法，其中通过燃烧以从中形成烟雾来处理所述的样品，并将所述的烟雾用于检验其中含有的 AGEs 的和相关的糖化毒素（glycotoxins）的存在和量。

10. 一种用于检测吸烟个体体内高级糖基化终产物（AGEs）的存在及其量的方法，包括以下步骤：

A. 从所述的个体中收集生物样品，所述的生物样品选自由血清，唾液，尿和粪便组成的组；和

B. 将所述的样品用于检验所述 AGEs 的存在及其量。

11. 一种用于生成富集用于与存在于烟草及其燃烧副产物、包括烟草的烟雾中的高级糖基化终产物 (AGEs) 样部分反应的抗体的方法，包括以下步骤：用免疫原对动物进行免疫接种，所述的免疫原选自烟草；烟草的烟雾；其提取物；用上述任何一种物质衍生的载体蛋白；及其半抗原，非强制性使用一种双官能交联桥接反应。

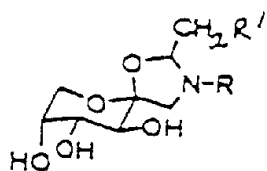
12. 与权利要求 11 抗体结合的与烟草相关的高级糖基化终产物。

13. 一种用于降低使用烟草或吸烟个体体内高级糖基化终产物 (AGEs) 蓄积的方法，包括以下步骤：通过给予抑制量的试剂来对个体进行治疗，所述的试剂能够与糖基化产物反应以阻止所述 AGEs 的形成和/或有害活性。

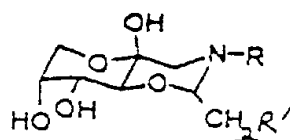
14. 一种用于抑制使用这类烟草个体体内与使用烟草或吸烟相关的高级糖基化终产物 (AGEs) 蓄积的方法，包括以下步骤：使用抑制量的一种试剂来对烟草进行处理，所述的试剂能够与糖基化产物反应以阻止它们的形成和/或所述 AGEs 的有害活性。

15. 权利要求 13 或 14 的方法，其中所述的试剂与早期糖基化产物反应，所述的试剂选自以下物质组成的组：氨基胍，拮抗剂，类似物，同类物，同源物及其模拟物，和它们的混合物。

16. 权利要求 13 或 14 的方法，其中所述的试剂含有一种参与通式 I 或 II 的产物形成的化合物



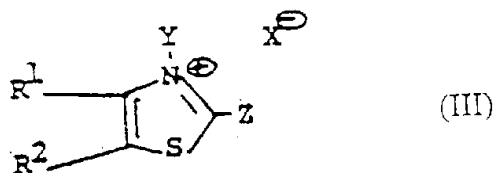
I



II

其中 R 是含有氨基的肽、蛋白质、或其它生物分子的残基，该残基通过早期糖基化产物（也称作 Amadori 或 Heyns 产物）的糖基-氨基部分的反应而产生，所述的早期糖基化产物通过葡萄糖（或其它反应糖）与所述的生物分子反应而形成，其中所述的试剂含有一种反应醛基。

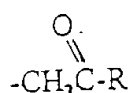
17. 权利要求 13 或 14 的方法，其中所述的试剂含有一种具有下列结构通式的噻唑化合物：



其中 R^1 和 R^2 独立选自以下基团组成的组：氢，羟基（低级）烷基，乙酰基（低级）烷基，低级烷基，低级链烯基，或 R^1 和 R^2 连同环碳可以是一种芳香稠环，可任意被一个或多个氨基，卤或亚烷基二氧取代；

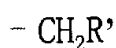
Z 是氢或氨基；

Y 是氨基，一种下列通式的基团



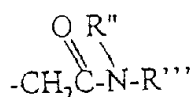
其中 R 是低级烷基，烷氧基，羟基，氨基或芳基，所述的芳基可任意被一个或多个低级烷基，低级烷氧基，卤，二烷基氨基，羟基，硝基或亚烷基二氧取代；

一种下列通式的基团



其中 R' 是氢，或低级烷基，低级炔基，或芳基；

或一种下列通式的基团



其中 R'' 是氢且 R''' 是低级烷基，可任意被芳基取代，或芳基，所述的芳基可任意被一个或多个低级烷基，卤，或烷氧基羰基取代；或 R'' 和 R''' 两者均为低级烷基；

X 是卤化物，甲苯磺酸盐，甲磺酸盐或苯磺酸盐的离子；及其混合物。

18. 权利要求 14 的方法，其中通过与试剂接触来处理所述的烟草或发烟物质。

19. 权利要求 18 的方法，其中所述的接触过程发生在所述烟草或发烟物质燃烧之前。

20. 权利要求 18 的方法，其中所述的接触过程发生在所述烟草或发烟物质燃烧过程中和之后。

21. 权利要求 19 的方法，其中所述的接触过程通过在收集所述烟草发烟物质前直接将所述试剂应用于所述烟草而发生。

22. 权利要求 21 的方法，其中所述的接触过程经将燃烧产生的所述烟草发烟物质的烟雾穿过含有所述试剂的过滤介质的通道而发生。

23. 权利要求 22 的方法，其中所述的过滤介质包括多孔材料，该多孔材料中均匀地含有一定量的所述试剂，且所述的试剂倾向于与从其中通过的烟雾接触。

24. 一种作为剂量器用于测定和监测存在于或来源于烟草和/或其副产物的 AGEs 或其前体的糖化毒素 (glycotoxins) 或糖化中间产物的存在和水平的装置，所述的装置包括一种底物或载体相，一定量糖化靶分子在此固定化结合，且适于与任何存在于被怀疑含有 AGEs、糖化毒素 (glycotoxins) 或其它反应糖化中间产物的样品中的 AGEs、糖化毒素 (glycotoxins) 或其它反应糖化中间产物反应。

25. 权利要求 24 的装置，其中所述的样品物质包括怀疑含有来源于烟雾的 AGEs 或其它 AGE 前的糖化毒素 (glycotoxins) 的大气。

26. 权利要求 24 的装置，其中所述的底物是具有适合于与所述样品物质接触的表面的一种固体，且将所述的 AGE 靶分子固定在所述的表面上。

27. 权利要求 24 的装置，其中所述的载体相包括一种液体且其中容纳有所述的 AGE 靶分子，由此可以使所述的样品物质通过所述的液体，使得任何存在的 AGEs 能够与所述的 AGE 靶分子进行反应。

28. 一种用于捕捉并去除存在于从中通过的烟草烟雾中的 AGEs 或其它 AGE 前体的糖化毒素 (glycotoxins) 的滤器，包括一种其中均匀地含有一定量试剂而用于与所述的烟雾接触的多孔材料，其中所述的试剂能够与糖基化产物反应而阻止 AGE 形成和/或所述 AGEs 的有害活性。



29. 一种用于过滤烟草烟雾以抑制高级糖基化终产物形成并降低其量和活性的系统，所述的系统包括与所述烟草烟雾的发生器(source)连接的、根据权利要求 28 的一种滤器。

30. 权利要求 29 的系统，其中所述的烟雾发生器是一种香烟，且所述的系统包括一种固定地连接所述发生器并在其中直立排列的一种滤器。

31. 权利要求 29 的系统，其中所述的烟草烟雾发生器是一种管，且所述的系统包括放置在液体滞留处中的一种滤器，所述储器(bowl)的干(stem)放置在烟嘴口与装有所述烟草的储器之间。

说明书

基于烟草及其燃烧副产物中存在的高级糖基化终产物的测定和处理方法

本发明的技术领域

概括地说，本发明涉及使用烟草产品、诸如香烟与高级糖基化终产物 (AGEs) (advanced glycosylation end product) 的存在之间的相关性，并涉及可有助于涉及这一观察结果和关系的诊断、治疗和工业化应用。更具体地说，本发明本身涉及这样一种观察结果，即烟草产品的消耗可增加体内 AGEs 的量，伴随的情况是与吸烟和 AGE 蓄积相关的疾病的危害和发病率增加，且本发明涉及烟草、烟草的烟雾及其提取物中、以及烟草使用者体内 AGEs 的检测，包括检测不需要的过量 AGE 水平和评价商业化规模的烟草和发烟物质。本发明还涉及 AGEs 形成抑制剂在各种范围内的应用以便治疗或防止不需要的过量 AGE 水平、以及改进商业化规模的烟草和发烟物质。

本发明的背景

吸烟对人体健康的有害作用已经广泛地得到了证明。在其它情况中，就吸烟者来说，这类疾病、诸如癌症和冠状动脉疾病在发病率和严重性上显著地增加，且这类病人在脂蛋白分布和氧化 LDLs 升高方面同样表现出显著的改变。在其它情况中，在高级糖基化终产物 (AGEs) 水平升高的病人中还观察到冠状动脉疾病和 dyslipidemia 的发病率和严重性增加，且这些观察结果的一致性为构成本发明基础的这一发现提供了舞台。

葡萄糖与蛋白质之间的非酶反应已经得到确认许多年了，而这些反应的分子详图、以及体内非酶糖化的生物和医学后果目前依然显现。最早确认的非酶糖化表现形式是在烹调食品过程中出现褐色色素，这是由美拉德 (maillard) 在 1912 年确定的，并将术语“褐

变”用于这门食品化学。美拉德观察到葡萄糖或其它还原糖自发地与含有氨基的化合物、诸如氨基酸和肽反应而形成原始的希夫碱加合物。然后这种冷缩产物进行一系列另外的自发脱水、重排和其它反应而形成各种类的褐色色素、目前称作高级糖基化终产物（或 AGEs）。

在这一最初发现以后的几年中，食品化学家具体地研究了美拉德反应且确定储存和经热处理的食品可进行非酶褐变而作为葡萄糖与多肽链间原始反应的改进，并确定作为结果，蛋白质交联且蛋白质相应地表现出降低的生物利用度。在这点上，确定导致蛋白质糖基化（或高级糖化）中褐色显现的色素还具有特征吸收光谱和荧光特性。

近年来发现上述讨论的还原糖和食品组分之间的反应在体内平行进行。因此，通过向蛋白质上的游离氨基添加葡萄糖而形成的原始希夫碱的非酶重排可形成稳定的氨基，1-脱氧酮糖基（ketosyl）加合物，将该加合物称作 Amadori 产物。（涉及还原酮糖而不是醛糖的平行反应生成称作 Heyns 重排产物的早期糖化产物）。已经证明发生了这种早期糖化加合物与血红蛋白的蓄积，其中在与葡萄糖的原始反应后，血红蛋白 β -链氨基末端的重排形成修饰的血红蛋白、称作血红蛋白 A_{1c}，它是一种临床上用于糖尿病葡萄糖对照的重要标记物。还发现发生了与各种其它的体蛋白、诸如晶状体晶体蛋白、胶原神经蛋白、和低密度脂蛋白以及 DNA 和氨基磷脂的糖化反应。

美拉德褐变过程生成大量不同数量的高级糖基化产物，它们中的每一种都呈现很低的收率。这种多样性使具体 AGEs 的确定和结构测定成为疑难问题。在美国专利 4,665,192 中，从某些变褐的多肽、诸如牛血清白蛋白和聚-L-赖氨酸中分离并识别了荧光发色团 2-(2-糠酰)-4(5)-2(咪喃基)-1H-咪唑。这一成功促进了随后另外的高级糖基化终产物的识别并促使了更多的试图理解蛋白质老化过程的化学和识别所涉及的特殊反应物、中间产物和产物的研究，从而改进了用于抑制糖化的方法和试剂。

近来，已经确认了其它高级糖基化产物，诸如 AFGP（Farrar 等，美国专利 5,017,696，1991 年 5 月 21 日授权）；pyrraline

(Hayase 等, “蛋白质的老化: 葡萄糖诱导的体内美拉德反应过程中形成的吡咯的免疫检测”, 《生物化学杂志》263: 3758 - 3764 (1989)), 和 pentosidine (Sell, D. 和 Monnier V. “来自人体胞外基质老化交联物的结构说明”, 《生物化学杂志》264: 21597 - 21602 (1989))。

已经收集到的大量证据证明作为一个整体的美拉德产物构成在体内 AGEs 蓄积时发生的各种正常和致病活性和反应的基础。这类活性可以是直接的, 例如糖化产物和加合物化学反应性的结果; 或非直接的, 它通过 AGE 特异性结合蛋白或受体由糖化加合物的细胞识别介导。

尽管描述体内 AGE 蓄积的致病作用的多数研究集中在 AGE - 蛋白质和 AGE - 肽上, 但是已经确认脂、且特别是低密度脂蛋白 (LDL) 与葡萄糖之间形成脂 - AGEs 的反应在 (例如) 动脉粥样硬化形成中起致病作用, 其中泡沫细胞的形成表明动脉粥样硬化斑的蓄积。低密度脂蛋白 (LDL) 的蛋白质和脂成分的氧化和糖化导致细胞 LDL 受体无法识别 apo B 成分, 同时借助于巨噬细胞“清除剂”受体、AGE 受体、和其它特殊细胞机理延长了这种 LDL 的循环半衰期并导致更好地摄取氧化的 LDL (ox-LDL) 或另外修饰的 LDL。增加的 ox-LDL 经血管壁巨噬细胞胞吞作用与它们转化入表明具有早期动脉粥样硬化损害的满载脂的泡沫细胞有关。上述研究还证明 LDLs 的 AGE 修饰增加了脂氧化的潜力。

AGEs “族” 包括可以被分离且特征在于化学结构的相对稳定的种类, 而其它的种类是不稳定或反应性的且它们的结构测定由此已经成为疑难问题。通过特殊的化学试剂可以“捕捉”不稳定或反应性的 AGEs, 且对于治疗目的来说, 这类反应和捕捉过程不仅用于深入了解结构而且用于抑制糖化过程。AGE - 脂还可以是稳定的、不稳定的或反应性的。

对 AGEs 致病潜在性的评价提示干扰 (或抑制) 高级糖化的化学过程可以具有巨大的疗效。在这方面, 已经发现了一系列试剂, 以氨基胍 (也称 Pimagedine) 为典型实例, 它们是有用的糖化抑制剂。理论上推断这种化合物 (和类似它的其它化合物) 可与靶蛋白 (或其它生物分子) 早期糖基化产物的羰基部分反应, 所述的靶蛋

白在与葡萄糖或另一种还原糖的原始非酶反应之后形成，且由此防止了进一步形成高级糖基化终产物的反应。

高级糖化反应的各种其它抑制剂也是公知的，认为在对由氨基胍及其类似物产生的抑制作用最敏感的阶段之外的美拉德反应阶段特别有效。例如，具有活性醛取代基的某些化合物（诸如乙醛）、或其组合物是高级糖化途径的有效抑制剂。认为这种活性是通过这类活性醛试剂与美拉德反应初始阶段中形成的糖化产物的糖基-氨基部分反应而产生的，即这些试剂与 Amadori 和 Heyns 重排产物（它们是早期的糖化产物）进行反应。可以具有类似能力的其它试剂是那些包括保守结合基元的物质，所述的保守结合基元含有共有的 17-18 氨基酸半胱氨酸结合的亲水肽环区，这是最初在抗菌蛋白质溶菌酶和乳铁蛋白中发现并确定的。更具体地说，典型的试剂包括具有亲水环区的分子，该亲水环区具有符合 $R_1Z_1Xaa_nZ_2R_2$ (SEQ ID NOS: 1-6) 的结构，其中 Z_1 和 Z_2 是能够形成交联物的残基； R_1 和 R_2 是独立的多肽， C_1-C_{12} 的烷基，芳基，杂烷基，或杂芳基，或氢；Xaa 是任意的 L-或 D-氨基酸；且 $n=13-18$ 。这类试剂及其应用出现在国际申请 WO 96/31537 中，该申请于 1996 年 10 月 10 日公开，将该文献引入本文作为参考。而通过与晚期糖化产物反应，其它试剂、诸如某些噻唑化合物对防止高级糖化特别有效，且甚至可使高级糖化终产物和相关交联部分的形成可逆。

认为本发明中应用的化合物（及其组合物）与早期糖基化产物反应，由此防止来自晚期的相同物质形成高级糖基化终产物，这些高级糖基化终产物可导致交联并由此导致分子或蛋白质老化和其它有害的分子影响。

与早期和晚期糖化产物反应的所有这类不同的糖化途径抑制剂和其它化合物（单独或以结合方式）可应用于改善蓄积在体内的 AGEs 的致病潜在性。

AGEs 可以通过以下方式蓄积：通过与外源 AGEs 接触（例如通过吸烟）在体内重新形成、在体内由细胞活性释放的 AGEs 的重新结合 (reattachment)、或作为由申请人在本文中所公开的方式。因此，AGEs 反应途径的意义以及在烟草和烟雾中所观察到的它们的存在对需要监测个体吸烟习惯、以及对于减少通过使用烟草而转化的

AGEs 的有效试剂和装置的有效技术的建立都具有进一步的重要性和促进性。这类监测技术可用于收集这类吸烟者的吸烟史，且还用于监测他们的内科疾病且特别是这些与升高的 AGEs 水平相关的疾病的素因。在烟草中测定 AGEs 可促进对烟草作物的评价、以及提供在消耗由上述作物制备的发烟物质的过程中转移到吸烟者中的 AGEs 量的指标；在这方面，还可以在烟雾中估测 AGEs。在这方面有效的治疗策略、方法和试剂提及抑制烟草中（发烟物质中）的 AGEs、且包括改善用于吸烟、或在防止或治疗吸烟或接触吸烟或接触烟雾群体的个体的过滤装置和类似物质。本发明所涉及的所有上述目的趋于实现。

本发明的概括

本发明来源于这样一种发现，即烟草及其燃烧副产物、诸如烟雾含有高级糖基化终产物（AGEs），这些 AGEs 作为一组与含有胺（amine）的生物分子（特别是蛋白质）进行反应，且因此吸烟或另外使用烟草的个体一般表现出整个血液和组织中 AGE 水平的增加。这样的水平升高与病理性发病率增加有关，诸如冠状动脉疾病、动脉粥样化形成和其它疾病所增加的危害，这些疾病与 AGEs 的蓄积有关。

因此，本发明确认 AGEs 存在于烟草、作为通过吸烟和烟草燃烧副产物而使用的烟草产品以及取自吸烟者的生物样品中。在第一个方面中，本发明涉及测定烟草发烟物质中、烟草燃烧副产物中、和取自吸烟者的生物样品中的 AGEs，从而确定 AGE 水平并由此便利对吸烟过程中个体接触这类 AGEs 的可能性或历史的判断，或对烟草或烟草产品的状况、包括（例如）估测烟草作物的期限、气味和/或贮存情况（新鲜性）提供信息。

更具体地说，对吸烟者的测定和评价可用于对任何病理性疾病的病人和从业者进行评价，所述的疾病可以具有很高的发作可能性，或如果这样的疾病出现，它需经历周密的定期监测和/或表明需要治疗措施，对吸烟者的测定和评价又可用于评价吸烟者根据吸烟习惯而耐受的程度和随后的危害。后者的见解将会补充到对作为用

于戒烟目的步骤中的参与者的病人的评价中，既评价检测受试者的吸烟史的长短，又评价安全性或类似的研究目的，从而证实停止使用烟草（或因其缺乏）。

通过处理烟草样品以形成怀疑其中存在 AGEs 的提取物的方式可以进行 AGEs 的测定，随后对该提取物进行这类目的的分析。在一个实施方案中，通过燃烧以形成烟雾来处理样品，然后对烟雾进行 AGEs 的存在和量的检验。另一方面，该提取物可以通过对烟草单独进行化学处理而产生。还可以检验吸烟者的体液和组织以测定因吸烟而出现的 AGEs 的水平和程度。将这些结果和从与非吸烟的然而共有同样医学分布图的待检病人的个体建立的标准进行比较。

本发明包括制备用于特异性识别与烟草相关的 AGEs 的试剂，诸如特异性抗烟草和烟雾中发现的 AGEs 的抗体，从而有助于与烟草相关的 AGEs 的检测和吸烟者医疗情况的评价。将这类试剂引入检验试剂盒和类似物中而用于进行这样的评价。

在相关的方面中，使用保留和承载糖化靶分子（诸如含有胺（amine）的部分）的底物或载体来制造剂量器，所述的糖化靶分子固定化与底物或载体结合、并能够与存在于样品中的 AGEs 反应，所述的样品是环境空气样品或取自病人的生物样品。可以将剂量器连同本文所列的诊断方案和检验试剂盒一起使用。

本发明进一步涉及用于检测和测定吸烟个体中高级糖基化终产物水平的方法，该方法通过以下步骤进行：收集来自这类个体的生物样品，此后对这些样品进行高级糖基化终产物的存在和量的检验。所收集的样品可以涉及细胞，组织，血清，唾液，尿或粪便，且以前依据 AGEs 已经对检测和测定技术进行了改进和应用。

在另一个方面中，本发明涉及制备拮抗剂，诸如特别抗烟草和烟雾中发现的 AGEs 的抗体、结合基元和高级糖化的化学抑制剂。

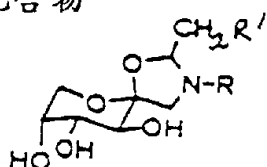
本发明还涉及用于治疗烟草使用者或吸烟者个体中的疾病的方法和相关试剂，包括将这类方法和试剂用于抑制蛋白质的老化，且特别是这类试剂能够与糖基化产物反应，从而阻止它们的形成和/或这类 AGEs 的有害活性。

特别地，用于抑制因高级糖基化终产物形成导致的蛋白质老化的试剂可以选自以下物质组成的组：氨基胍，拮抗剂，类似物，同

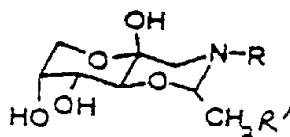
类物，同源物(cognate)及其模拟物，和它们的混合物。

这类试剂还可以包括并可以选自能够与早期糖基化产物（也称作 Amadori 和 Heyns 产物）的糖基-氨基部分反应的物质，所述的早期糖基化产物通过葡萄糖（或其它反应糖）与提供糖化敏感部分（诸如蛋白质上的氨基）的生物分子反应而形成，由此使这种早期糖基化产物稳定，并防止其进一步反应形成高级糖基化终产物。因此，例如，具有活性醛取代基的化合物或组合物、且更具体地说诸如乙醛这样的化合物是稳定的。认为这种活性是由这类活性醛试剂与美拉德反应起始阶段中形成的糖化产物的糖基-氨基部分反应而产生的，即这些试剂与 Amadori 和 Heyns 重排产物反应，Amadori 和 Heyns 重排产物是早期糖化产物。

更具体地说，这些试剂可以含有参与具有通式 I 或 II 的产物形成的化合物



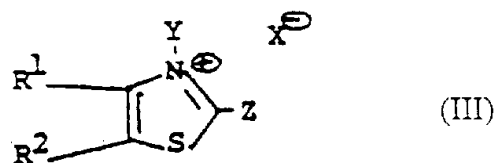
I



II

其中 R 是含有氨基的肽或蛋白质的残基，它们通过早期糖基化产物（也称作 Amadori 或 Heyns 产物）的糖基-氨基部分与含有活性醛基的试剂反应来制备，所述的早期糖基化产物通过葡萄糖（或其它反应糖）与蛋白质反应所而形成。临时申请顺序号为 60/006,752（“抑制蛋白质老化的改进方法和试剂”，1995 年 11 月 15 日申请）中描述了这类典型试剂，将该文献引入本文作为参考。

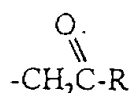
通过与晚期糖化产物的反应，其它试剂、诸如某些噻唑化合物对防止高级糖化特别有效，且甚至可逆转高级糖化终产物和相关交联部分的形成。认为有效抵抗预先存在或晚期糖化加合物的典型化合物和组合物通过与存在于 AGEs 中的 α -二羰基片段、特别是在形成分子间或分子内交联的 AGE 结构中出现的这类 α -二羰基片段反应，并导致裂解它们而起作用。这种基于噻唑的化合物优选以一种再生原始的、活性噻唑衍生物的催化方式在这方面起作用，所述的噻唑衍生物可以催化另外存在的 AGE 部分的裂解。这类典型试剂可以含有具有下列结构通式的噻唑化合物：



其中 R^1 和 R^2 独立选自以下基团组成的组：氢，羟基（低级）烷基，乙酰基（低级）烷基，低级烷基，低级链烯基，或 R^1 和 R^2 连同其环碳可以是一种芳香稠环，它可任意被一个或多个氨基，卤或亚烷基二氧(alkylenedioxy)取代；

Z 是氢或氨基；

Y 是氨基，一种下列通式的基团



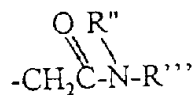
其中 R 是低级烷基，烷氧基，羟基，氨基或芳基，所述的芳基可任意被一个或多个低级烷基，低级烷氧基，卤，二烷氨基，羟基，硝基或亚烷基二氧取代；

一种下列通式的基团



其中 R' 是氢，或低级烷基，低级炔基，或芳基；

或一种下列通式的基团



其中 R'' 是氢且 R''' 是低级烷基，可任意被芳基取代，或芳基，所述的芳基可任意被一个或多个低级烷基，卤，或烷氧基羰基取代；或 R'' 和 R''' 两者均为低级烷基；

X 是卤化物，甲苯磺酸盐，甲磺酸盐或苯磺酸盐的离子；及其混合物。

认为本发明中应用的化合物（及其组合物）与早期糖基化产物

反应，由此阻止其后形成高级糖基化终产物，这些高级糖基化终产物可导致交联（并由此）导致分子或蛋白质老化和其它有害的分子影响。此外，认为所述的化合物和组合物与已经形成的高级糖基化终产物反应以减少这类产物的量。在申请顺序号为 08/375,155 中更具体地描述了这些试剂，将该文献引入本文作为参考。

本发明进一步涉及特别在吸烟者或另外消耗烟草产品的个体中减少高级糖基化终产物蓄积的方法，该方法通过以下步骤进行：使用公知用来抑制高级糖基化终产物形成的试剂、诸如那些上文所列的试剂来治疗这类个体。所述的试剂特别应用于发病率或严重性与烟草的消耗、特别是吸烟有关的几种疾病和病理情况，诸如心血管、脑血管和外周血管的疾病，它们包括、例如心脏和冠状动脉疾病，心律失常，动脉粥样硬化，中风，高血压，肺部感染，闭塞性血栓性脉管炎，外周闭塞性血管病，雷诺病，跛行和肾衰竭；肺部疾病，诸如慢性阻塞性肺部疾病，慢性支气管炎，肺气肿，哮喘，和肺嗜曙红细胞肉芽肿；各种癌症包括、但不限于肺癌，口腔、头部和颈部的癌，间皮瘤，食管、膀胱、颈、子宫内膜、胰和肾细胞的癌；消化性、胃和食管溃疡；高血脂和 dyslipidemia；骨质疏松；硬皮病，鼻烟引起的（snuff）角化病和口腔粘膜白斑病；免疫抑制；以及牙和皮肤染色。

除直接治疗个体外，本方法还涉及处理烟草物质本身以减少这类 AGEs 的对消费者或旁观者生成和通过。因此，在第一种情况中，本方法包括通过化学方法或其它方法处理烟草物质本身，从而减少高级糖基化终产物的形成或存在。当用糖处理某些烟草时，这类方法可涉及处理所处理的烟草以便完成降低本文所定义的 AGEs 或其前体的糖化毒素（glycotoxins）含量的步骤。

处理烟草物质的另一个实施方案包括制备用于与烟草终产物或香烟一起使用的合适过滤介质，将这种过滤介质用诸如本文所列的、公知作为高级糖基化的抑制剂的那些试剂进行处理。然后将这类试剂分布在过滤介质内，以这样的方式便于在烟雾通过过滤器时与它进行表面接触和液体滞留，从而捕捉和/或防止高级糖基化终产物的形成。在这后一方面中，本发明涉及包括多孔介质的滤器，它由纤维或其它类似的合适材料来制备，在其活性表面上已经包含了一

定量的、公知用于抑制高级糖基化或能够通过存在于烟草的烟流中的 AGEs 反应而捕捉的试剂。这类衍生的滤嘴和过滤介质不仅可以应用于减少或消除在通过吸烟而直接消耗烟草产品生成的最初烟流中的 AGEs，而且当已经指出旁观者吸入附近其它人吸烟活动中产生的烟雾时，所述的滤嘴和过滤介质可以减少或消除与烟草烟雾接触的环境中、诸如在“二次吸烟”中的周围的 AGEs。用于制备这类过滤介质的技术也是公知的，且它们本身不构成本发明的部分。当然，就使本发明应用的试剂进入这类过滤介质上的活性位置这一特定过程来说，实际上这类技术是本文的一部分。

本发明的一个特殊和重要的方面是这样一种发现，即烟草及其燃烧副产物含有非常类似于那些在其它食物中以及在体液和组织中观察到的反应糖，这些反应糖对吸烟者和间接吸收烟雾者的身体系统具有毒性作用。当在可导致反应糖形成的条件下进行烟草的处理时，本发明者检验并随后确认烟草和烟草烟雾含有并传播这些公知用来增加体内 AGE 形成的反应物质。本文将这些反应物质称作“糖化毒素 (glycotoxins)”。将本文中术语“糖化毒素 (glycotoxins)”定义为可以参与美拉德反应过程、或可以在美拉德反应过程中形成的反应物质，它们由单独的碳水化合物、或碳水化合物与含有氨基的物质的加合物组成，例如蛋白质，DNA，脂，和所有这类物质。

作为本文所证明的，糖化毒素 (glycotoxins) 与蛋白质反应、表现出特殊的荧光、交联蛋白质且是致突变的。本文后面所列的数据证明烟草烟雾含有显著量的糖化毒素 (glycotoxins)，该糖化毒素 (glycotoxins) 可以进入循环系统并与血清和组织蛋白反应而形成 AGEs。与糖化毒素 (glycotoxins) 接触的增加可使吸烟者中动脉粥样硬化增加且癌症非常普遍，且作为本文所列的，认为有效的疗法是保持使用并给予高级糖化的抑制剂、诸如氨基胍。

因此，本发明以高级糖基化终产物的形成与烟草的制造和消耗之间的关系为基础。烟草和烟草烟雾中伴随存在的糖化反应物、诸如其中的反应糖和它们进入吸烟者和旁观者体内这一情况为各种应用打下了基础，所述的应用包括但不限于诊断和评价应用、与抑制高级糖基化终产物的蓄积及其有害后遗症相关的治疗应用、以及处

理烟草物质以加强其器官感觉特性和贮存情况，且更重要的是减少它们应用的有害作用。从本发明者详细研究的高级糖基化现象中得到的主要研究结果和经验以及本文公开的特殊发现和观察结果均有助于实现本发明的机理。

因此，本发明的第一个目的是提供一种用于测定烟草及其副产物中、以及消耗这类产品的个体中高级糖基化终产物形成的程度和水平的方法。

本发明的进一步目的是提供一种上述能够用于诊断目的的方法，以便监测吸烟者和其它烟草使用者的病史并由此防止伴随高级糖基化终产物蓄积和吸烟的严重病理性并发症的发展。

本发明的另一个目的是提供一种上述涉及评价烟草以测定其贮存情况和器官感觉潜能的方法。

本发明的另一个目的是提供诊断试验法和相关的物质，它们可有效地识别与烟草相关的高级糖基化终产物和它们在特殊烟草产品中的存在并且同样可以识别它们在消费者体内的类似的蓄积。

本发明的另一个目的是改进对烟草和烟草产品的改良方法，这些改良方法用于减少高级糖基化终产物对烟草产品消费者的形成和传播。

本发明的进一步目的是提供抑制、捕捉或另外中和 AGEs、且特别是存在于烟草烟雾中的糖化毒素（glycotoxins）（包括反应 AGEs）的过滤器。

本发明的另一个目的是提供用于评价危害程度的方法和相关的物质，如果可能，个体可以作为环境中 AGEs 水平的函数，从而实现或调整这类个体的治疗方法以防止或减少这类个体接触 AGE 的有害作用。

本发明另一个目的是提供上述用于在所述环境中调节所述 AGEs 水平的方法和相关的物质。

本发明的另一个目的是提供用于在烟草使用者、吸烟者或与烟接触个体中抑制 AGEs 和蛋白质老化的试剂，从而在所述个体和群体中防止 AGEs 的有害蓄积。

由于考虑到参照下面的说明性附图继续进行后面的具体描述，所以其它目的和优点对于本领域技术人员来说是显而易见的。

附图的简要说明

附图 1 是表示香烟烟草水提取物 AGE 含量的示意图。按照标准化竞争性 AGE 免疫测定法对香烟样品的磷酸盐缓冲液提取物中的 AGE 水平进行定量并将其计算为总 AGE 单位/香烟。香烟的牌号是: Gau, Gauloises; Mar, Marlboro; ML, Marlboro Light; Par, Parliament; Sal, Salem Ultra Lights.

附图 2 是表示在实验上与烟草烟雾接触的血清中 AGE 水平的示意图。按照标准化竞争性 AGE 免疫测定法对香烟烟雾鼓泡通过的血清样品中的 AGE 水平进行定量并将其计算为 AGE 单位/ml 血清。对照品 = 仅与气流接触的类似血清样品 (不含烟草的烟雾)。

附图 3 是表示存在于烟草烟雾冷凝物水溶液中的糖化毒素 (glycotoxins)、以及反应糖和 AGEs 在体外与蛋白质反应的示意图。将用胶原包被的测定平板与磷酸盐缓冲液增溶的香烟烟雾冷凝物进行接触, 并通过一种免疫度量法来测定在胶原处理的测定平板孔上形成的 AGEs, 由此最终吸收度 (光密度或 OD) 的增加反映出与测定平板的胶原基质交联并在测定平板的胶原基质上蓄积的 AGE 增加。

附图 4 是表示 Pimagedine (氨基胍) 抑制体外香烟烟雾冷凝物提取物与蛋白质反应的示意图。在有或没有不同浓度 Pimagedine 的情况下将由胶原包被的测定平板与香烟烟雾冷凝物的水提取物进行接触。通过一种免疫度量法来测定在胶原处理的测定平板孔上形成的 AGEs, 由此最终吸收度 (光密度或 OD) 的增加反映出与测定平板的胶原基质交联并在测定平板的胶原基质上蓄积的 AGE 增加。

附图 5 是表示在烟草和烟草烟雾的水提取物中发现的糖化毒素 (glycotoxins) (反应 AGEs 或糖化中间产物) 的示意图。按照竞争性 AGE 测定法 (A) 和定向结合免疫测定法 (B) 在烟草的水提取物中测定糖化毒素 (glycotoxins)。将来自四个不同牌号的美国香烟的烟草样品在 PBS 中提取 24 小时、进行无菌过滤并按照上述竞争性 AGE ELISA 检测样品的 AGE 含量。每个条形框代表不同牌号的香烟 (A)。将总 AGE 单位/香烟计算为提取物 AGE 含量的指标。将

烟草样品在 PBS 中提取 1 小时、无菌过滤并利用固定在 96 孔微量滴定平板中的鼠尾腱胶原来检测样品中的反应糖（糖化毒素（glycotoxins））含量（B）。

附图 6 是另一系列表示在烟草烟雾中发现的糖化毒素（glycotoxins）的坐标图。

（A）按照体外 AGE 形成测定法在香烟烟雾冷凝物中测定糖化毒素（glycotoxins）。将连续稀释的香烟烟雾添加到用胶原预包被的孔中并用 PBS/0.05% 吐温 - 20 进行封闭。使用一种兔抗 AGE 多克隆血清来显示 AGE 的形成。

（B）借助于烟雾通过氨基胍可以去除糖化毒素（glycotoxins）。使新制的香烟烟雾通过标准滤器（黑色条）、标准滤器 + 500mg 硫酸钠（带纹条的条）和标准滤器 + 500mg 氨基胍（白色条）。

（C）来自主流烟雾的糖化毒素（glycotoxins）可以以共价键的方式交联 RNA 酶 A 蛋白（且氨基胍可抑制这种交联）。将 RNA 酶 A 与主流香烟烟雾接触 0, 5, 8, 24 和 72 小时。为了估测形成的二聚物，将样品在还原条件下进行 SDS - PAGE，随后使用一种与 HRP 共轭的兔抗 RNA 酶 A 抗体将上述样品转而进行硝酸纤维素和蛋白质印迹法。圆圈 = 单独的 RNA 酶 A；正方形 = 用香烟烟雾培养后的 RNA 酶 A；三角形 = 用香烟烟雾和 5mM 氨基胍培养后的 RNA 酶 A；菱形 = 用香烟烟雾和 50 mM 氨基胍培养后的 RNA 酶 A。

（D）糖化毒素（glycotoxins）具有自身荧光。将 RNA 酶 A 与主流香烟烟雾接触 0, 5, 8, 24 和 72 小时，然后通过 370nm 激发时在 440 nm 处测定发射情况来检测糖化毒素（glycotoxins）的特异性荧光。圆圈 = 单独的 RNA 酶 A；正方形 = 与香烟烟雾培养后的 RNA 酶 A；三角形 = 与香烟烟雾和 5mM 氨基胍培养后的 RNA 酶 A；菱形 = 与香烟烟雾和 50 mM 氨基胍培养后的 RNA 酶 A。

附图 7 是证明诱变糖化毒素（glycotoxins）是的示意图。以通过氨基胍的香烟烟雾为对照（白色条），用连续稀释的香烟烟雾冷凝物将沙门菌属菌株 TA98 培养 1 小时（黑色条），然后进行平板固定。48 小时后对每个平板上的菌落数进行计数。每个条框代表三个平板的平均值 + / - 标准偏差。

附图 8 是表示吸烟导致体内 apoB-AGE 和血清 AGE 的水平增加的一系列示意图。在工作于 Picower Institute 的健康非糖尿病吸烟者和健康的、非糖尿病的非吸烟者中测定血清 apoB-AGE (A) 和总 AGE 水平 (B)。吸烟者中的 apoB-AGE 水平 (324 ± 140 U/ml, $n = 9$) 显著高于 ($p < 0.01$, 非配对 Student 氏 t 检验) 非吸烟者 (177 ± 33 , $n = 10$)。[糖尿病病人中 apoB-AGE > 300 U/ml] 吸烟者中的血清 AGE 水平 (202 ± 76 AGE U/ml, $n = 23$) 显著高于 ($p < 0.02$) 非吸烟者中的血清 AGE 水平 (146 ± 31 AGE U/ml)。(糖尿病患者中血清 AGE 水平 = 200 - 400)。以 AGE - BSA 标准为基准表示 AGE 单位。受试者的年龄、性别或吸烟年数不受限制。

附图 9 是表示通过使用一定范围浓度的氨基胍进行喷雾而处理的烟草的检验结果的示意图, 目的是确定对 AGEs 形成的这类处理方法的效果。这种检验参照附图 6 所述的体外 AGE 形成测定法来进行。

本发明的具体描述

本发明来源于消耗烟草与改进这类个体中高级糖基化终产物水平增加之间已确定的关系。最初的观察结果来自对特殊试验群体中高级糖基化终产物水平的研究且特别是这类群体中 apoB-AGE 水平的增加与冠心病同时发生以及对表现出这样增加的水平个体一般是烟草产品消费者这样一个事实的相关性或关系的发现。最初的观察结果促使了对烟草产品本身的研究, 这产生了这样一个发现, 即这类产品、包括燃烧副产物(烟雾)含有高浓度的高级糖基化终产物和促使它们形成的糖化毒素(glycotoxins)。这些最初发现的结果已经促进了进一步的研究并已经导致了涉及依据烟草、烟雾、吸烟者、和 AGEs 的测定和处理方式的本发明各方面的进展。

更具体地说, 本发明在第一个方面中涉及对有吸烟史的受试者进行检验以便更好地确定他们的吸烟史, 这一过程通过以下方式进行: 以来源于在其他方面具有类似或相同医学状况的非吸烟群体的定量为基准来测定高级糖基化终产物的增加。通过检验试验受试者的各种身体组织和体液(诸如血液、尿和粪便)可以实施这类方法。此外, 测定 AGEs 和糖化毒素(glycotoxins)的存在和水平对帮助



预测试验受试者对至少部分以 AGEs 和糖化毒素 (glycotoxins) 的公知致突变特性为基础的疾病的敏感性是有用的。

在类似的方式中，可以检验并评价烟草产品本身以确定它们在烟草使用者中促进 AGE 和糖化毒素 (glycotoxins) 水平增加的潜能。在这种情况下，可以对烟草产品本身及其燃烧副产物检验这类高级糖基化终产物和/或形成它们的糖化毒素 (glycotoxins) 的存在。在一个相关的方面中，可以检验相同的产品并标记高级糖基化终产物的水平以便测定所得烟草作物的储存稳定性和潜在的气味。作为可能的情况，根据取自类似样品或群体的某些基准或标准来改进这类测定方法。

在这方面，蛋白质褐变测定法的各种特殊装置和捕捉 AGE 的滤器可以根据本发明来制造，它们提供并例举了主要的部件，要求这些部件是便于测量个体与环境烟雾（特别是烟草的烟雾）接触的烟雾接触剂量器，基于检测将与蛋白质的氨基或其它敏感性化学糖化靶物交联的 AGEs。申请人认为使用为利用发生在与烟草烟雾相关的糖化毒素 (glycotoxins)、AGEs 和蛋白质或其它带有游离氨基或其它起糖化靶分子作用的取代基的分子间的共价反应而制造的剂量装置可以估测空气中烟草烟雾的稀释度，由此所述的糖化靶分子对与和烟草相关的 AGEs 和糖化毒素 (glycotoxins) 的化学反应是敏感的，导致所述的 AGEs 和糖化毒素 (glycotoxins) 与所述的糖化靶分子以共价键方式进行交联并因此可通过本文所述的方式检出。

使用本发明的剂量器可以估测接触环境烟草烟雾的危害，所述本发明的剂量器可将糖化靶分子与需要监测烟雾含量的大气环境接触，其中所述的剂量器用于来源于烟草烟雾的所述反应性气载 AGEs 和糖化毒素 (glycotoxins) 的自发性与呈现在基质上的 AGE 靶分子的结合，由此构成了剂量器的收集部件。通过本领域众所周知的任意许多识别 AGE 的方法、包括（但不限于）应用上文所述抗 AGE 抗体的 AGE ELISA 法、按照构成剂量器显示部件的步骤可以定性地、半定性地或定量地观察到与剂量器显示氨基的基质结合的 AGEs。用于引入剂量器显示部件的合适靶分子不仅包括众所周知为 AGE 敏感性靶分子的各种蛋白质、诸如 BSA、RNA 酶、胶原和聚赖氨酸，而且

包括带有对与 AGEs 反应敏感的氨基的任意其它生物分子或有机化合物。

优选将这类糖化靶分子固定化在有助于将它们递呈至所监测空气中的底物的表面上；诸如一种为显示氨基而衍生的纸表面，一种类似衍生的硝酸纤维素膜的表面，一种同样为提供氨基作为糖化靶物而衍生的聚苯乙烯滤膜的表面，或提供糖化靶分子且放置于与所监测环境空气相互作用的任何其它相对惰性的基质。通过促使空气流过收集部件的任何方式（诸如使用一种风扇）可以被动地（例如通过对流）、或主动地影响待测烟雾的空气与基质固定的糖化靶分子之间的接触过程以及所述空气流过所述收集部件的循环过程。另一方面，可以将提供氨基的靶分子分散在一种液体中，且可以将来自所监测环境的空气抽过所述的液体、例如通过发泡。在两种情况中，均通过任何合适的 AGE 检测法、诸如上文公开用于检测 AGEs 的普通 AGE ELISA 测定法的特殊装置来检验已经与需监测的环境空气接触的糖化靶分子（无论是放置在基质上还是在液相中），使得对与糖化靶分子反应的 AGEs 或糖化毒素（glycotoxins）的检测表明了带有烟雾的环境空气的污染程度。这类剂量器的应用相应地表明个体接触了环境中的间接烟雾。

可以将类似的测定方法用于监测烟草产品中糖化毒素（glycotoxins）的存在和量，并由此评价和判断它们对同样的烟草消费者和旁观者有害作用的倾向性。例如，对于这类目的来说，可以使用本文所列的体外 AGE 形成测定法来测定烟草提取物中的糖化毒素（glycotoxins）。

可以将上述剂量器和相应的测定方法用于一定的治疗范围，以便监测和评价特殊病人的治疗过程，这些特殊病人疾病的特征在于体液和组织中的 AGEs 水平升高。因此，可以将取自病人的样品进行检验以确定存在于样品中的 AGEs 的反应程度（例如通过 AGE ELISA 或类似检验方法来进行），以便通告主治医生病人在治疗中的进展。然后医生可以选择谨慎地修改治疗方式，但要以检验结果为基础。同样相关的是，对取自病人的样品和病人绝大部分时间处于其中的环境空气的测定结果提示应对环境进行改造以减少病人与 AGEs 或糖化毒素（glycotoxins）的其它来源、不管是来自烟草的烟雾还

是其它外界的来源的接触，因此，这种结果进一步帮助医生护理病人。

伴随上述内容，通过制备定向于在烟草和烟草副产物中发现的高级糖基化终产物和糖化毒素 (glycotoxins) 的抗体，可以制定各种诊断试验法、制成试剂盒和类似物，它们在本发明中是特别有用的。由此可生成这类抗体并将它们用作诊断试验中以及与烟草相关的 AGE 和糖化毒素 (glycotoxins) 化学结构特征中的标准。

就本发明涉及的治疗策略和试剂而论，高级糖基化终产物的增加与发烟物质的应用之间的相关性促使应用已依据所治疗疾病而确定的治疗方法，在所述的疾病中，认为高级糖基化终产物的增加起一定的作用。所以，如果特殊个体有烟草产品的消费史、且如果因此治疗方法包括对这类个体给予高级糖基化终产物的抑制剂，那么在这种情况下上述这类方法是可以应用的。

合适的高级糖化抑制剂已经在以前确定，且它们包括、例如氨基胍 (Pimagedine)，其类似物，拮抗剂，同类物，同源物和模拟物，和其中合适的它们的混合物。其它合适的抑制剂可以选自活性醛、或具有相应活性醛取代基的化合物 (如上文所确定的，它们与美拉德反应的早期 Amadori 和 Heyns 产物的糖基-氨基部分反应)、和其中合适的它们的混合物和组合。另外合适的抑制剂可以选自上文确定的那些噻唑衍生物和其它化合物及其组合物 (它们与存在的 AGEs 中的 α -二羰基片段反应)，特别是在自动再生、催化方式中促使或引起所述 α -二羰基片段在所述存在的 AGEs 中裂解的这类化合物。给药的确切方式要由有经验的医生来决定。

另一个针对吸烟者的策略是直接处理所消耗的发烟物质。这类物质可以通过类似的抑制剂来处理，使得接受这样处理的烟草产品具有的 AGEs 的数量降低 (且特别是糖化毒素 (glycotoxins) 和反应 AGEs 的数量降低)、或使得促进消费者体内形成这类 AGEs 的能力降低。

另一方面，本发明涉及制备烟草产品、诸如香烟包含的过滤物质，使得这种过滤物质本身能够抑制、捕捉、或者中和可促使高级糖基化终产物 (例如糖化毒素 (glycotoxins)) 的形成和传播增加的与烟草相关的 AGEs 或相关的化学本体。过滤物质是那些按常规

提供的物质且用于香烟的，且它们通常是相互成束状的纤维质材料并在最终制成的香烟中为圆筒形。这类纤维质材料（其中有代表性的是纤维素纤维）在其表面上可以含有用作捕捉 AGEs 或结合或中和其它糖化产物、诸如糖化毒素（glycotoxins）的一种合适的抑制剂或反应剂，以便防止在使用时形成 AGEs。

在另一个实施方案中，可以制备起到抑制、捕捉、或另外中和可促使高级糖化终产物形成和传播增加的与烟草或烟雾有关的 AGEs 或相关本体的作用的滤器而用于一般的或环境空气的净化，例如减少或消除环境空气的 AGEs 和/或糖化毒素（glycotoxins），它们以非直接的、被动的或“间接的”吸烟方式被不需要地吸收。无论是通过接触环境空气、还是通过直接对样品（生物的或其它形式的）施用这类物质或底物，制备这类滤器或类似物质以便能够对环境进行抽样检验，其中 AGEs 或可形成它们的糖化毒素

（glycotoxins）的浓度受到怀疑；目的是制定降低这类 AGE 水平的测定方法。这类测定方法可以包括对环境进行合适的处理以改造 AGE 水平不期望升高的区域、或制定或调整处于那种环境中的个体的治疗方法以降低这类个体体内 AGE 的水平或含量。特殊的这类疗法包括给予诸如本文所涉及的试剂，它们起到 AGE 形成的抑制剂的作用、或起到促使或实现 AGEs 从身体中去除的作用。

在一般方式和各种具体的实施中，本发明的蛋白质褐变测定法和抑制 AGE、捕捉 AGE 或中和 AGE 的滤器还提供并例举了主要的部件，要求这些部件是便于估测个体与环境烟雾（特别是烟草的烟雾）接触的烟雾接触剂量器，基于检测与蛋白质的氨基或其它敏感性化学糖化靶物交联的 AGEs。申请人认为通过为利用发生在与烟草烟雾相关的 AGEs 和/或糖化毒素（glycotoxins）、以及蛋白质或其它带有游离氨基或其它起糖化靶分子作用的取代基的分子间的共价反应而制造的剂量装置可以估测大气中烟草烟雾的稀释度，由此所述的糖化靶分子对与和烟草相关的 AGEs 的化学反应是敏感的，导致所述的 AGEs 与所述的糖化靶分子以共价键方式进行交联并因此可通过本文所述的方式检出。

所提供的下列实施例用于对确定这种关系和促进上述发明的实施方案实现的实验进行解释。

实施例 1

为了确定 AGEs 是否存在于烟草产品中, 在 0.02M 磷酸盐缓冲液 (pH 7.4) 中制备来自几种市售可得的香烟牌号的烟草样品, 烟草的浓度为 66.7mg/ml。在室温下培养过夜后, 通过离心使烟草沉淀并将烟草的水提取物进行无菌过滤, 按 1:800 进行稀释, 并用于分析 AGE 的含量。应用抗 AGE 单克隆抗体、按照标准化竞争性 AGE 免疫测定法对稀释的烟草水提取物的 AGE 含量进行检测 (参见下述内容), 该检测试验可测定 AGE 免疫反应性的单位, 以 AGE 修饰的牛血清白蛋白 (AGE-BSA) 参比标准竞争剂制剂为基准。从该检测结果中可以看出, 将总 AGE 单位/香烟计算为烟草 AGE 含量的指标, 并且如附图 1 中所示, 所提取的这些烟草样品的 AGE 含量在约 50,000 - 150,000 AGE 单位/香烟的范围。从这一证据中, 申请人得出结论: 烟草的水提取物中存在极高的 AGE 类免疫反应性。这一结论提示申请人烟草产品、包括 (例如) 鼻烟和咀嚼烟或来自可燃形式的烟、诸如雪茄烟、香烟或烟斗烟的消费者通过他们消费烟草可以与大量 AGEs 接触。此外, 由于公知 AGEs 以温度和糖依赖性方式蓄积了一段时间, 且由于公知 AGEs 具有味道和气味, 所以这一信息还提示申请人将烟草在商业上加工成各种消费产品和随后的销售过程中特殊批量的烟草或作物的 AGE 含量可以是烟草潜在气味以及贮存和加工史的一种有用的指示剂。

根据本领域常规的普通免疫测定法程序来进行对 AGEs 的竞争性 ELISA。简要地说, 通过在 37°C 下、封闭管内的 0.5 M 葡萄糖中按 50 mg/ml 将 BSA 培养 (经过 SDS-PAGE, Calbiochem, Cat. #12657, 级分 V, 纯度 >99%) 8 周来制备 AGE 修饰的 BSA (AGE-BSA) 的主原料 (Master Stock), 其中所述的 0.5 M 葡萄糖在含有 1.0 mM EDTA、pH 为 7.4 的磷酸盐缓冲液 (PBS) 中制备并向其中通氮气。用标准抗原包被市售可得的 96 孔微量滴定检测平板 (NUNC Maxisorp), 这一过程通过以下方式进行: 4°C 下, 在每个孔内的包被缓冲液 (0.1 M NaHCO_3 /0.02% 叠氮化物, pH 9.6) 中按 30 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 的浓度培养 100 μl AGE-BSA 溶液过夜、并覆盖。然后使用

自动 ELISA 平板洗涤器、用 200 μ l 洗涤缓冲液（含有 0.05% 吐温 20 的三氨基甲烷缓冲盐水）将检测孔冲洗 6 次、反转并吸干。每个孔装入 200 μ l 封闭缓冲液（PBS/2% 正常山羊血清/0.2% BSA/0.02% 叠氮化物，pH 7.4）并在 37 $^{\circ}$ C 时将平板进行培养、覆盖 1 小时。在如上所述进行冲洗后，即准备好用于竞争性 ELISA 的标准 AGE - BSA 修饰的检测平板。

通过向 AGE - BSA 包被的检测平板的每个孔中添加 50 μ l 等份的样品或 AGE - BSA 标准竞争剂而开始进行本实施例的检测方法，随后立即添加 50 μ l 适当滴定的抗 AGE 抗体制剂。然后在室温下将平板进行培养、覆盖 2 小时，在此期间试验样品（或 AGE - BSA 标准物）中的 AGEs 与抵抗固定在形成 AGE - BSA 的检测平板上的 AGEs 的初级或抗 AGE 抗体竞争结合。最终，在这种竞争性的免疫测定形式中，样品中较高量的 AGEs 反应出对带有最终读出信号相应减少的包被 AGE - BSA 具有较高的竞争性，其强度反应出初级抗 AGE 抗体与 AGE - BSA 包被的孔的结合程度。本实施例中，在不含竞争剂的孔中与显色底物最终培养 2 小时后，将抗 AGE 单克隆抗体（命名为 4G9）在具有约 1.5 光密度（OD）单位的稀释度下使用。通过将 AGE - BSA 主原料（Master Stock）稀释成具有范围在约 0.1 - 2 μ g AGE - BSA/孔的系列浓度来制备一系列稀释的 AGE - BSA 标准竞争剂，且从这种标准竞争曲线中可以内推符合每个样品孔的最终 OD 的 AGE - BSA 标准竞争剂的相应浓度。在使用上将一个 AGE 单位定义为要求在这种竞争性 AGE ELISA 形式中有 50% 抑制作用的标准竞争剂 AGE - BSA 的浓度（以 BSA mg/ml 计）。

在初级抗体与竞争剂（样品或标准物）的这种培养后，将孔用洗涤缓冲液洗涤 6 次、反转并吸干。然后根据生产者的建议添加并培养市售可得的二级抗体 - 酶共轭物（例如，山羊体内升高的抗鼠 IgG 抗体与碱性磷酸酶偶合）制剂，一般是在 37 $^{\circ}$ C 下将 100 μ l 等份样品按 1:1200 稀释 45 分钟。当然，根据本领域众所周知的一般免疫测定机理，在这一过程中可以替换各种初级（抗 AGE）抗体（多克隆或单克隆或其混合物）以及各种检测这些初级抗体结合的方法。

在本实施例中，如上所述冲洗平板并按照由生产者建议的浓度

添加 100 μ l 等份的底物发色团（在这种情况下是对硝基苯磷酸（PNPP））并将它们进行培养（一般是在 37 $^{\circ}$ C 下 1-2 小时），从而在没有任何竞争剂的情况下在所检测的对照孔中具有 OD 为 1.5 - 1.7 单位。使用商品微量滴定平板读数器可以简便地读出每个孔中的吸收度（OD），在这种情况下，确定在 410nm 处读取，以参考波长 570 nm 为对照。然后将任何样品中的 AGE 水平从标准竞争曲线中内推为相应浓度的标准竞争剂 AGE - BSA（以 BSA mg/ml 计），并一般将该值转化成 AGE 单位，其中 1 个 AGE 单位是在这种竞争性 AGE ELISA 法中产生 50% 抑制作用的标准竞争剂 AGE - BSA 的浓度。

实施例 2

为了确定存在于烟草烟雾中的糖化毒素（glycotoxins）（反应糖，AGEs 等）是否与身体的蛋白质反应，使用一种由小玻璃侧颈烧瓶构建的“水烟筒”或水管发烟装置将香烟烟雾抽过 1ml 正常人血清样品，所述的小玻璃侧颈烧瓶不仅用于或使通过所含血清样品的烟流发泡、而且可使烟雾蓄积在上述样品上并与之接触，这种接触在接触的自动“发烟”相以后的培养期间受到维持。将滤嘴从所用香烟中去除，并将香烟装在穿过烧瓶塞使管头末端浸入血清样品中的巴斯德吸管上。一旦安装完毕，则通过使用连接在侧颈上的注射器的吸取而将这种装置反复用于将来自五支（5）香烟的烟雾抽过血清样品。对于对照反应来说，除香烟烟雾不通过侧颈以外，使用同样的装置将约相同体积的空气抽过单独的血清样品。然后通过上述标准化竞争性 AGE ELISA（参见实施例 1）来测定这些经实验处理的血清样品中的 AGE 水平。将本实验独立地进行两次，每次情况中的比较结果如附图 2 中所示。因此，当对照血清样品的平均值为小于 25AGE 单位/ml 时，与烟雾接触的血清样品表现为约 150 AGE 单位/ml。从这一证据中，申请人得出结论：在吸烟期间（主动的或被动的）存在于烟草烟雾中的 AGEs 是反应性的并且可能与人体蛋白质结合，这增加了吸烟者和旁观者的 AGE 含量，并以来自非吸烟群体的合适对照样品为参照而提供了近期吸烟活动、或近期在环境中与烟草烟雾接触的强度的简易标记物。

实施例 3

在进一步的试验中，为了确定反应糖、糖化毒素 (glycotoxins) 等是否存在于烟草的烟雾中且为了确定这类糖化毒素 (glycotoxins) 是否可以与蛋白质反应而形成 AGEs，如下所述来评价烟草烟雾冷凝物的反应 AGE 的含量。给侧颈烧瓶安上与连有一短段橡皮管的巴斯德吸管连接的塞。将装在侧颈上的注射器反复用于将来自总计 3-5 支香烟的烟雾抽入该烧瓶中，在收集烟雾的冷凝物期间将该烧瓶浸入丙酮/干冰浴中。香烟的烟雾在冷却的烧瓶壁上凝聚，并通过用 5mls、0.02 M 的磷酸盐缓冲液冲洗烧瓶内部而将这种冷凝物增溶并将他们萃取入温热的中性水溶液中。将这种冷凝提取物进行无菌过滤并用另外的磷酸盐缓冲液按 1:5 进行稀释。

然后按照使用抗 AGE 抗体检测与固定的胶原层共价结合 AGEs 的 AGE 形成测定法来评价这些提取物中糖化毒素 (glycotoxins) 的存在。简单地说，在室温下将含有固定在孔表面上的鼠尾腱胶原的市售可得的 96 孔微量滴定平板 (合作研究) 与上述稀释的烟雾冷凝提取物进行接触并培养过夜、覆盖。按照上述概括的用于竞争性 AGE 检测的免疫度量程序来检测通过与鼠尾腱胶原相互作用而固定在表面上的 AGEs: 依次冲洗烟雾提取物处理的胶原包被的平板、使它们与 4G9 单克隆抗 AGE 抗体接触、冲洗、与市售可得的山羊抗鼠 IgG/碱性磷酸酶共轭物接触、冲洗、并用合适的显色底物 (例如 PNPP) 补充，从而产生由 410 nm 处的光密度确定的信号，该信号定量地反映出以不用烟雾冷凝提取物处理的对照品为基准、通过与烟草烟雾的冷凝提取物接触而蓄积在平板上的 AGE 类免疫反应的量。

如附图 3 所示，孔中有更多 AGE 类免疫反应的量与烟草烟雾的冷凝提取物接触，并且来自这些与烟雾有关的 AGEs 的信号与稀释的提取物一起衰变，这一过程严格依照体外形成、稀释的葡萄糖诱导的 AGEs 作为这类比较的标准物来进行。这提示申请人接触烟草烟雾会相应地使受试者接触与天然蛋白质反应的糖化毒素

(glycotoxins)。

在一系列补充实验中，在鼠尾腱胶原处理的平板内烟草烟雾冷凝提取物的过夜培养过程中包括不同浓度的在其它情况中起抑制 AGE 交联形成作用的 Pimagedine (氨基胍) (一种 AGE 抑制剂)。如附图 4 中所示，Pimagedine 减少了在约 50 mM Pimagedine 处具有 50% 抑制作用的剂量依赖性方式中按免疫度量检测的 AGEs 的量。作为存在的这种抑制 AGE 药理剂结果的最终 AGE 信号的抑制或减弱是进一步的证明，即用烟雾冷凝物对尾腱胶原进行实验性处理后明显的 AGE 类免疫反应性在分子详图上与体外和体内接触还原糖而在蛋白质上自发形成的 AGEs 类似，即来自所有这些来源的 AGEs 可共用免疫化学决定子且它们的形成和/或交联活性受到 Pimagedine 的特别抑制。存在于烟草烟雾中的反应 AGEs 可以受到 Pimagedine 抑制这一证据还提示申请人通过处理烟草、烟草烟雾、或治疗吸烟者而产生的相应抗 AGE 措施可用于降低吸烟者通过消费烟草而自身接触的过量的 AGE 含量。

实施例 4

进行一系列的实验以进一步研究并证明烟草及其燃烧副产物 (烟草烟雾) 与形成的 AGEs 升高的发生率之间的关系。特别是、且作为本文所列的，这些实验证实烟草及其副产物含有显著量的可溶性反应糖化中间产物 (本文称作糖化毒素 (glycotoxins))，该中间产物可促进 AGE 的形成并产生与衰老和糖尿病中 AGE 蓄积相关的全部二级分子和生理性并发症，并且它们是诱变的，且随后它们可以参与引起疾病、诸如癌症。这一方案和随后的实验如下。

材料和方法

烟草水提取物的准备

在 PBS 中按 360 mg/ml 的浓度通过振摇将烟草样品提取 1 小时并通过 0.45 μ m Millex-HA 滤器装置 (微孔, Bedford, MA) 进行无菌过滤。

香烟烟雾冷凝物的制备

将“水管”发烟装置用于并操作以使烟流与水溶液接触。将水溶液（3mls）放入 25ml 带有侧颈的玻璃爱伦美氏（erhlemeyer）烧瓶中，将香烟装在穿过烧瓶塞中的孔的 500 μ l 吸管管头上。将 500 μ l 吸管头部向下延续到通过烧瓶侧颈的开口，但不要进入水溶液。一旦将装置安装完毕则将真空（约 20mm Hg）通入烧瓶的侧颈并点燃香烟。在某些实验中改变吸管的管头：将一片 2 \times 2mm 的商品香烟滤嘴用于塞住吸管头部，然后将 500mg 氨基胍氢氯化物或硫酸钠放在小片滤嘴与香烟之间或在它们之间不放任何物质。在任何实验中从香烟中去除预先连接的商业上制备的滤嘴。将 5 支香烟点燃并将烟雾吸入 3ml 等份的 PBS 中。使用前将香烟烟雾的水冷凝物通过 0.45 μ m Millex-HA 滤器装置（微孔）进行过滤。

体外 AGE 形成的检测

将含有固定的鼠尾腱胶原的微量滴定平板（合作研究，Cambridge, HA）用 TBS（PBS/0.05% 吐温-20）培养 1 小时，然后在 37 $^{\circ}$ C 下用连续稀释的烟草提取物或烟雾接触的 PBS 溶液培养 18 小时，用 TBS 洗涤 5 次，用兔多克隆抗 AGE 血清（在 TBS/0.1% 山羊血清中稀释的 pAb RU 9.9.93）培养 1 小时、用 TBS 洗涤 5 次并用与碱性磷酸酶（Sigma）共轭的抗兔 IgG 培养并用 TBS 洗涤 5 次。随后，通过在 100mM、pH 为 9.5 的二乙醇胺中用 250mg/ml 对硝基苯磷酸培养 45 分钟而使结合的 AGEs 显色并且在 ELISA 平板读数器（Dynatech, MR 5000）上在 405nm 处对平板进行读数。将 Biolynx 2.0 用于生成标准曲线和数据外推法。

糖化毒素（glycotoxins）交联活性

如上所述将含有 2 mM EDTA 的 PBS 溶液与烟草烟雾接触。将溶于含有 0、5 或 50 mM 氨基胍的 PBS/EDTA 的 40mg RNA 酶 A 与相同的 8 支香烟接触并于 37 $^{\circ}$ C 时在暗处培养 0、5、8、24、48 和 72 小时。使用 Centricon 10 浓缩器（Amicon, Beverly, MA）去除未结合的和低分子量的物质。为了评价 RNA 酶二聚物的形成，使用 5%

的积层胶和 12% 的分离胶 [《自然》227: 680-685, 1970]、在还原条件下将样品进行不连续的 SDS-PAGE 并将它们转移到硝酸纤维素纸上。在 20℃ 下, 用封闭溶液 (PBS/5% 不含脂肪的牛奶/1% BSA/0.2% 吐温-20) 将印迹封闭 1 小时、用与在封闭溶液中稀释的辣根过氧化物酶共轭的兔抗核糖核酸酶 A 抗体 (Biodesign International, Kennebunkport, ME) 培养 45 分钟、用 PBS/0.2% 吐温-20 彻底地洗涤并根据生产者的说明书将它展开。使用 Adobe Photoshop 和用 NIH 图象程序测定的图象 (平滑的, 尖锐的和反差增强的) 的光密度测定法将所得的荧光显影图进行加工处理。

荧光检测

为了评价 AGE 特异性荧光, 在接触香烟烟雾冷凝物 (如上所述制备) 的 RNA 酶样品中测定用 LS 50B 荧光分光计 (Perkin-Elmer) 在 370 nm 处激发时在 440 nm 处的发射情况。以 0.5mg/ml 的蛋白浓度测定荧光值。

致突变性研究

如 Ames 等 [] 所述进行致突变性检测试验。简单地说, 在 Oxoid 营养肉汤 (Difco) 中于 37℃ 下将沙门菌属菌株 TA98、TA100、TA1535 和 TA1537 (由 B. N. Ames 博士提供的赠品) 培养过夜, 将它们在 0.1M 磷酸钠缓冲液 (pH 7.4) 中用连续稀释的香烟烟雾冷凝物培养 1 小时、平行做三份, 然后将它们按 0.1ml/平板的浓度固定在最小葡萄糖平板上。在 37℃ 下将该平板培养过夜并对每个平板上的回复突变体数进行计数。

血清 AGE - apoB 的测定

使用如上所述的单克隆抗 AGE 捕捉抗体和抗 apoB-HRP 共轭物 (JBC, 267: 5133-5138, 1992)、通过夹心式 ELISA 在人体血清中测定 AGE 修饰的 apoB (AGE- apoB) 的量。从标准曲线上给予样品一个值并以 apoB-AGE U/ml 血清为单位来表示。将一个单位的 apoB-AGE 定义为 1μg apoB (LDL) 的活性。

AGE 的测定

使用如 (*PNAS USA* 90: 6434 - 6438 和上文) 中所述产生葡萄糖衍生的 AGE 表位的 AGE 特异性单克隆抗体 (IgG1 亚类)、通过竞争性 ELISA 来测定人体血清中的 AGEs。对于连续稀释成属于本检测试验线性范围的样品的孔来说, 以平行做三份的方式来测定 AGE 免疫反应性。以合成的 AGE - BSA 标准物为基准计算 AGE 单位。本试验的敏感度为 5 U AGE/ml 且试验内和试验间的变异系数分别为 5% 和 8%。

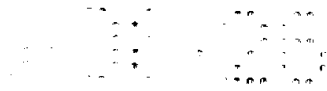
结果

含有促进体内 AGE 形成的糖化毒素 (glycotoxins) 的烟草和香烟烟雾的水提取物

开始, 通过浸入 PBS 的方式从香烟烟草样品中提取水溶性反应糖化毒素 (glycotoxins)。为了检测烟草中的糖化毒素

(glycotoxins) 是否能够诱导 AGE 形成, 将该水提取物添加到胶原包被的平板中、持续 18 小时。使用特异性抗 AGE 多克隆抗体检测胶原分子上最新形成的 AGEs 的存在。附图 5A 表示由 8 种牌号的美国香烟诱导的 AGE 形成的比较情况。来自所有接受检测牌号的提取物促使了 AGE 部分的形成。值得注意的是牌号 E (“柔和”量的香烟牌号 D) 比牌号 D 具有更高的这类形成 AGE 的活性。这一发现 (当将其它“普通”和“柔和”牌号的进行配对比较时持续重现) 很可能反应出烟草加工过程中的差异并表明焦油的含量和香烟“强度”的其它测定方法不依赖于糖化毒素 (glycotoxins) 含量。

为了确定是否可以将烟草衍生的糖化毒素 (glycotoxins) 挥发, 我们在 AGE 形成试验中检测了香烟烟雾冷凝物。为了收集任何挥发性糖化毒素 (glycotoxins), 我们安装了一种发烟装置, 其中将来自燃烧香烟的烟雾抽入装有 PBS 溶液的烧瓶中。在一种更接近地模拟将肺组织接触香烟烟雾的方式的尝试中, 使实验的烟雾在烧瓶底部与 PBS 接触, 但是不通过溶液发泡。制备后立即将烟雾接触的 PBS (香烟烟雾冷凝物) 添加到用胶原包被的微量滴定孔中并使它们反应过夜。象烟叶提取物一样, 香烟烟雾冷凝物能够快速诱导由兔抗 AGE 多克隆抗血清识别的 AGEs 的形成。由香烟烟雾产生的



AGEs 依赖于浓度 (附图 5B) 和时间 (未列出数据), 且通过将可溶性 AGE 抑制剂 (氨基胍) 直接添加到孔中 (未列出数据) 或借助于使烟雾通过氨基胍结晶柱 (附图 5C) 可以在剂量依赖性方式中抑制由香烟烟雾产生的 AGEs。通过硫酸钠对照柱的烟雾对烟雾含有的烟草衍生的糖化毒素 (glycotoxins) 在靶物上形成 AGEs 的能力没有影响 (附图 5C)。香烟烟雾冷凝物在促使 AGE 形成上的活性比烟草水提取物低 10 倍, 这提示通过燃烧过程会使某些糖化毒素

(glycotoxins) 受到破坏或用于捕捉挥发性糖化毒素

(glycotoxins) 和 AGEs 的系统是无效的。在烟叶提取物和香烟烟雾冷凝物中发现的 AGE 形成活性是不稳定的: 如果在 -20°C 时冷冻该溶液并在检测前融化、或遗留在冰上或在室温下保持 5 小时以上, 则 AGE 形成活性是无法检测的。

通过在接触香烟烟雾冷凝物的 RNA 酶 A 上测定 AGEs 特征性荧光样式也可以评价香烟烟雾糖化毒素 (glycotoxins) 诱导 AGE 形成的能力。如附图 6A 所示, 对于增加的时间来说, 接触香烟烟雾冷凝物的 RNA 酶 A 表现出 AGE 型荧光依赖于时间增加, (即在 370nm 处激发后在 410nm 处发射), 这种增加在 24 小时后达到饱和并且在培养过程中受到存在的氨基胍的抑制。

糖化毒素 (glycotoxins) 可以交联蛋白质

反应还原糖的特征之一是它们可促使敏感性官能基之间分子内和分子间交联的形成。为了证明烟草和烟雾中的反应性糖化毒素

(glycotoxins) 也具有这一特性, 我们检测了糖化毒素

(glycotoxins) 与 RNA 酶交联的能力。用香烟烟雾冷凝物将 RNA 酶 A 的样品培养不同的时间, 通过 SDS - PAGE 凝胶上的分子量将它们分离, 然后用抗 RNA 酶 A 抗血清使它们显色。使用这种技术, 申请人能够确定 RNA 酶 A - RNA 酶 A 二聚物的形成依赖于时间并在 24 小时内达到饱和。在一种剂量依赖性方式中, 二聚物的形成可以受到氨基胍的抑制, 这表明交联过程取决于含有羰基的糖化毒素 (glycotoxins) (附图 6B)。

糖化毒素 (glycotoxins) 是诱变的

上述研究已经证明还原糖可以在体外与 DNA 反应并在细菌和哺乳动物细胞中诱导突变。大肠杆菌中高胞内浓度的还原糖（葡糖-6-磷酸）导致突变率增加。同样，接触因母体糖尿病而导致的高血糖的鼠胎表现出加倍的突变率。

在本实验中，将大量鼠伤寒杆菌菌株（TA98, TA100 和 TA1537）在典型的 Ames 诱变试验方式中与香烟烟雾冷凝物接触。在菌株 TA98 中注意到了活泼的突变活性，但在其它菌株中没有发现。如附图 7 中可观察到的，TA98 与最新制备的增加量的香烟烟雾冷凝物接触导致剂量依赖性的突变增加。当 TA98 与能够在组氨酸操纵子中导致移码突变并由此使原始突变回复的诱变剂接触时，它会在缺乏组氨酸的培养基上生长。在与 PBS 接触前通过氨基胍干燥柱的烟雾（显著去除或中和了含有羰基的糖化毒素（glycotoxins）分子）减少了回复突变体的数量。在 DNA 与上述还原糖的反应中已经观察到了类似的诱变活性。这是本申请人意识到香烟烟雾中的诱变活性不需要通过 P450 系统进行代谢性激活的首次报导。在过去可能还没有观察到这种活性，例如以前的工作者主要在有机溶剂中制备了烟雾提取物并在值得注意的时间期限后分析了诱变活性。水提取物中糖化毒素（glycotoxins）的不稳定性要求快速分析诱变活性。要求在室温下或冰上培养 5 小时以上的水香烟烟雾冷凝物不再是诱变性的。

糖化毒素（glycotoxins）在体内促使 AGEs 在血清蛋白质上形成

下面研究在接触香烟烟雾后将反应糖化毒素（glycotoxins）或 AGEs 在体内吸收的可能性，这一过程通过检验在作为总体含量的替代标记物的血清蛋白质上形成的 AGEs 的量来进行。

来自另外健康吸烟者和非吸烟者的血液样品

在本研究中，检测 AGE 血清蛋白质水平和蛋白 apoB-AGE。吸烟者中 AGE- apoB 水平（ 324 ± 140 U/ml, $n = 9$ ）显著高于（ $p < 0.01$, 非配对 Student 氏 t-检验）非吸烟者（ 177 ± 33 , $n = 10$ ）且吸烟者中的血清 AGE 水平（ 202 ± 76 AGE U/ml, $n = 23$ ）显著高于（ $p < 0.02$ ）非吸烟者中的血清 AGE 水平（ 146 ± 31 AGE U/ml）。吸烟组中的所有个体每天吸 1 包以上的烟，但不限定他们的吸烟

史。类似的研究涉及与存在于血液中 apoB 或其它血清蛋白结合的 AGE 的量与接触香烟烟雾程度的关系。这种接触的总数要可用于直接和间接接触烟雾情况的分析。实际上，这种试验类似于接触前 30 天期限得到的血液葡萄糖总量的血红蛋白 A_{1c} 试验。值得注意的是吸烟者中 AGE 血清蛋白和 AGE- apoB 的水平几乎与在患糖尿病的病人中观察到的情况相同[AGE 血清蛋白 200 - 400 U/ml; AGE- apoB 300 U/ml]。

实施例 5

为了确定在所明确的接触烟草烟雾后是否可以测定 AGE 类免疫反应性的提高，从习惯吸烟的受试者中取血液样品，首先在间隔吸烟行为 18 小时后取血液样品，然后在 18 小时间隔结束时受试者又连续不断地吸 5 支香烟后取血液样品。使用标准化夹心型 ELISA 程序在来自这些血液样品的 LDL 级分中比较 apoB 的 AGE 修饰程度以便检测 AGE- apoB。在进行这种标准化检测试验中，将抗 AGE 抗体固定在检测孔的表面上以捕捉样品的 AGE 修饰成分，并将市售可得抗 apoB 单克隆抗体/辣根过氧化物酶 (HRP) 共轭物用于检测通过与所固定的抗 AGE 抗体的特异性相互结合而固定的任何 AGE 修饰的 apoB。

简单地说，通过以下步骤来制备低密度脂蛋白 (LDL) 富集的血清级分：用 900 μ l 6.66% 的聚乙二醇 (分子量为 8000) 将 100 μ l 血清样品处理 15 分钟，离心 (14,000 rpm, 10 分钟) 并在 0.5% SDS 中将所得沉淀增溶过夜。为了构建试验平板，通过在所滴定的稀释度下培养而将抗 AGE 抗体 (在这种情况下是单克隆抗体 4G9) 固定在微量滴定平板的表面上，此后通过用 1% 的 BSA 溶液取代捕捉抗体溶液来阻断非特异性结合。然后以缓冲液中的最终浓度为 0.05% 的 SDS 在试验平板中将 LDL 富集的血清级分 (或适当滴定的 LDL 标准物稀释液) 平行培养三份并将它们培养 1 小时，此时将平板进行冲洗并添加市售可得抗 apoB 单克隆抗体/酶的共轭物 (在这种情况下是购自并按 1:500 稀释使用的 Biodesign International 的抗 apoB/辣根过氧化物酶 (HRP) 共轭物) 以检

测任何结合的 apoB。经 1 小时的培养后洗涤平板并添加合适的显色 HRP 底物（诸如邻苯二胺（o-phenylene diamine）（OPD）），且在适当的培养期后以 570nm 的参考波长为对照在 450nm 处读取 OD。一般根据本领域众所周知的原理，将各种试剂（例如包被抗体和检测抗体）的最佳浓度和最佳 pH、去污剂浓度、缓冲液组成、培养期、和其它特殊的特性彼此对照着进行改变以便在这种用于 apoB 的 AGE 修饰的夹心型免疫度量测定法中使样品信号最大化并将干扰的非特异性背景“噪声”降到最低限度。在本实验中，吸烟前的 AGE- apoB 值为 218 ± 1 且吸烟后的值为 241 ± 3 apoB- AGE 单位/mg apoB（其中将 apoB- AGE 单位定义为 $1\mu\text{g/ml}$ 市售可得的 LDL 标准物（例如购自 Cappel）的活性）。申请人研究了这一证据、即吸烟可以剧烈地增加特殊血液成分（LDL 的 apoB）的 AGE 修饰。这提示样品成分上 AGE 水平的测定可以提供有关受试者近期吸烟史的信息。此外，由于 LDL 的 AGE 修饰与有害影响人体健康的病理学机理相关，所以这进一步提示申请人吸烟者可以得益于限制作为烟草消费结果发生的过量接触的 AGE 的措施。

实施例 6

为了发现易抽样的组织或液体区是否反应出吸烟史，申请人检验了来自在 North Shore University Hospital, Manhasset, NY 筛选的预先进行了手术的顺序病人。这些病人中的某些（偶然）是吸烟者（第 1 组），其它人是非吸烟者（第 2 组）。在这种观察试验中，将病人的群体分成几个层次或另外对可以导致血清 AGE 水平的某些可变性的吸烟强度、性别、年龄、健康情况、或其它特征进行控制。使用单克隆抗 AGE 抗体、通过竞争性 AGE ELISA 法来测定血清 AGE 水平，以便以 AGE- BSA 标准化制剂为基准检测 AGEs（如上述实施例 1 中具体所述）。第 1 组（N=16）的平均血清 AGE 水平为 200 ± 80 ，与此对比的第 2 组（N=13）为 150 ± 30 。这些数据的比较结果经独立方法的 t-检验表明在 0.05 的概率水平上有显著性差异。

实施例 7

烟草和烟草产物、包括(例如)烟草烟雾的 AGEs 还用作抗原或半抗原,以便引导抗体特别定向于与烟草相关的 AGE 结构。这类抗体(与本发明相同)依次用于识别和抑制与依次与烟草相关的 AGE 结构。例如,通过构建应用本发明抗烟草相关 AGE 抗体的免疫测定法,可以测定由与烟草相关的 AGEs 修饰蛋白质的程度。如上述所讨论的,并且取决于如此修饰的蛋白质的半衰期,AGE 表位在蛋白质样品(诸如血清蛋白)上的免疫化学测定提供了近期烟草消费(例如通过吸烟)的指标。同样,可以将 AGE 表位在循环和/或组织蛋白上的免疫化学检测用于监测用本发明试剂的治疗过程,通过与烟草或烟草烟雾中的 AGEs 反应,这些试剂涉及抑制通过使用烟草而产生的 AGEs 的过量蓄积。

通过从烟草中或从烟雾中分离与烟草相关的 AGEs、例如通过制备烟草或烟草烟雾冷凝物的含有 AGE 的水提取物(如上所述),可以简便地制备符合本发明与烟草相关的 AGEs 的各种半抗原、抗原、和共轭的免疫原。可以将这种提取物用作一种可增加识别特异性表位或其分子特征的抗体的各种免疫原,该免疫原可在一个优选的实施方案中,将提取物的 AGEs 看作半抗原,根据本领域广泛使用的方案、使用任意大量众所周知的二价偶合试剂、诸如象 EDC 这样的碳二亚胺,将这些半抗原相应地与任意几种优选的载体蛋白偶合,所述优选的载体蛋白包括、例如匙孔蛾血蓝蛋白(KLH),甲状腺球蛋白,且最优选牛血清白蛋白。不管来源如何,可以将与烟草相关的 AGEs、无论是单独的还是与载体蛋白偶合的且无论是纯的还是部分纯的形式用于确认良好的免疫方案,从而生成在大量应用中是有用的抗体和相关的免疫试剂,这归因于用于与烟草相关产物的分子特征的抗体的特异性。

下面是一个优选的方案,对任意几种动物种类进行免疫接种以产生定向于与烟草相关的 AGE 的蛋白质共轭物的多克隆抗血清,所述的动物包括、例如小鼠,大鼠,仓鼠,山羊,家兔,和鸡。上述动物种类的前三种是特别需要的选择,因它们可用于随后产生可分泌半抗原特异性单克隆抗体的杂交瘤。通过本领域普遍实施的任意

几种方案可以简便地完成来自免疫接种动物脾细胞的所述杂交瘤的产生，且所述的方案描述了适于通过与合适的细胞系（例如骨髓瘤细胞系）融合产生的免疫接种脾细胞的无限增殖化的条件。用于产生杂交瘤的所述方案还提供了一些方法，这些方法可用于选择和克隆免疫脾细胞/骨髓瘤细胞的杂交瘤且用于识别稳定地分泌定向于所需表位的抗体的杂交瘤克隆。将诸如家兔和山羊这样的动物种类更普遍地用于生成多克隆抗血清，但不管最终是否需要多克隆抗血清或单克隆抗体，一般开始将半抗原修饰的载体蛋白与一种佐剂、诸如完全 Freund's 佐剂 (Complete Freund's Adjuvant) 一同进行给药。通过任何途径可以给予免疫接种，一般通过腹膜内、肌肉或真皮内的途径；在本领域中根据所免疫接种的种类和最终产生抗体的类型来优选某些途径。随后，一般与一种佐剂、诸如矾或不完全 Freund's 佐剂 (Incomplete Freund's Adjuvant) 一起给予加强免疫。在原始免疫接种后每隔一段时间给予加强免疫；一般1个月是合适的间隔，在每次加强免疫后的1-2周之间取血液样品。另一方面，有时将各种所谓的超免疫方案（一般以及时的相互间隔较近的加强免疫为特征）用于产生优于抗载体蛋白抗体内的抗半抗原抗体的一种尝试。

对于在任意几种简便的方式、包括（例如）Ouchterlony 扩散凝胶和直接 ELISA 方案中的半抗原特异性免疫滴度来说，可以比较血液样品中升高后的抗体滴度。在一种典型的直接 ELISA 中，将一种确定的抗原固定在检测孔的表面上（一般在 96 孔或微量滴定平板中），随后通过冲洗检测孔而分离一系列培养物以去除未结合的结合配体。作为非限制性的实施例，检测平板的孔可以容纳一种半抗原/载体共轭物的稀释、缓冲的水溶液，优选的情况是其中载体蛋白不同于用于免疫接种所检测的产生抗体动物的所用蛋白；例如可以对用免疫接种的与烟草相关的 AGE/BSA 共轭物修饰的检测孔检测来自与烟草相关的 AGE/KLH 共轭物免疫接种动物的血清。另一方面，通过单独用半抗原培养可以修饰检测表面。一般来说，将检测孔的表面与一种无关蛋白质（诸如酪蛋白）的溶液进行接触以封闭塑料表面上未占用的部位。在用一般含有一种将非特异性相互作用减至最低程度的盐和去污剂的中性缓冲溶液冲洗后，将孔与由有意义的

血液样品制备的连续稀释的一系列抗血清之一进行接触（初级抗血清）。再次冲洗后，通过用市售可得的酶-抗体共轭物培养可以估测通过与所需半抗原或半抗原/载体共轭物相互作用而固定在检测孔上的检测抗体的数量，其中这种二级共轭物的抗体部分直接定向于用于产生初级抗血清的种类；例如，如果初级抗血清在家兔体内增加，那么可以将山羊体内增加并与几种酶（诸如辣根过氧化物酶）共轭的抗兔抗体的商品制剂作为二级抗体使用。在生产者规定的程序后，在比色检测法中通过相关共轭酶的活性可以定量地估测这种二级抗体的量。可以任意调换许多相关的 ELISA 或放射免疫度量方案（诸如竞争性 ELISAs 或夹心式 ELISAs），所有这些均是本领域众所周知的，从而确定所需高滴度的抗血清；即特殊的抗血清在高稀释度时提供正确的阳性结果（例如大于 1/1000 且更优选大于 1/10,000）。

可以将类似的免疫度量方案用于估测来自免疫接种动物脾细胞制备的杂交瘤的培养物上清液。在如此特性化的抗血清或杂交瘤上清液中，要求使用相关而结构不同的半抗原或抗原的各种对照培养物（例如与不同的载体蛋白一起），且省略免疫度量过程中的各种试剂以便将检测试验中的非特异性信号减至最低并识别来自错误阳性结果和错误阴性结果的抗体特异性和滴度的可靠的测定结果。在这方面使用的对照培养物的种类是众所周知的。此外，将相同的普通免疫度量方案随后与由上述过程所识别的抗血清一起使用（即所发现的抗体是具有高滴度且涉及与烟草相关的 AGEs 的特异性结构决定因素）。可以将这类后者应用的所需抗烟草相关 AGE 抗体（无论是多克隆的还是单克隆的）与说明书并任意与其它有用的试剂（包括、但不限于一组与烟草相关的 AGEs 的分子标准物）和稀释剂一起装入方便操作者的试剂盒剂型中。

如上所述生成的抗烟草相关 AGE 抗体（且特别是这类单克隆抗体）还可用于识别、分离、富集和纯化与烟草相关的 AGE 表位。这一过程可以通过本领域公知的技术来完成，例如通过以下步骤：将公知含有有意义表位的制剂与特别用于所述表位的固定抗体接触、冲洗掉未结合的物质、然后洗脱特异性结合的物质并分析其化学结构以便测定与烟草相关的 AGEs 的特异性分子形式。

实施例 8

为了进一步证明应用本发明 AGE 抑制剂和 AGE 回复剂防止蛋白质在一种表面（诸如发生在吸烟者的牙齿表面上或皮肤或粘膜表面）上脱色这一情况，进行下面的表面褐变实验。作为一种皮肤、粘膜或菌膜覆盖的牙齿表面的替代物，将未曝光并展开的照相纸用于承载一种简易纸裱褙材料上的固定蛋白（明胶，即胶原）表面。将这类照相纸打成 5mm 的圆片物，并将这些圆片物中的几个浸入烟草提取物或烟草烟雾冷凝物的溶液（如上所述制备）中，已经用或不用本发明的 AGE 抑制剂或 AGE 回复剂将所述的烟草提取物或烟草烟雾冷凝物在一种合适的水缓冲液（如上所述）中进行了适当地稀释。一般通过在暗处、控制的温度在 20℃ - 60℃ 之间将这类实验培养物维持合适的时间期限，该期限可以在几小时至几周的范围。在培养开始后不同的时间处，回收圆片物，观察褐变的颜色并拍照以用于保存记录。在一种类似于烟草使用者的皮肤、粘膜表面或牙齿菌膜的染色的方式中，来自烟草或烟雾提取物的反应 AGEs 的吸附作用导致蛋白质表面变成带有黄色和褐色的 AGE 色素的颜色。作为由以未用检测试剂培养的对照圆片物为参照的黄色/褐色色素蓄积防止法所证明的，AGEs 蓄积的防止法确定 AGE 抑制剂可用于本发明的范围。

在另一个用于 AGE 回复活性的检测试验中，通过用上文所述的稀释烟草提取物或烟草烟雾冷凝提取物培养将蛋白质覆盖的圆片物进行“预褐变”，并将本发明选择的 AGE 回复剂添加到培养溶液中另一个时间期限。以未用检测试剂培养的对照圆片物为参照，由本发明检测试剂产生的黄色/褐色色素蓄积的抑制和回复作用确定了特别适于用作本发明范围内的 AGE 回复剂的选择物。如此确定的 AGE 抑制剂和 AGE 回复剂特别适用于配成口腔冲洗剂或牙粉，它们可防止和回复其它口腔表面的不需要的牙齿染色和色素形成，所述不需要的牙齿染色和色素形成与使用烟草一起发生，无论是口腔使用的是咀嚼烟和鼻烟还是通过吸香烟、雪茄和烟斗。还可以将这种蛋白质褐变测定法中带有活性的检测试剂配制成用在吸烟者染色的手和

手指上的乳油、乳化剂或类似物。本方法还作为用于监测接触环境烟雾的剂量测定法的范例。

实施例 9

尽管普遍接受吸烟是导致心脏、肺、血管、肿瘤及其它疾病的一种危害因素这一事实，但是构成这种因果关系基础的分子机理仍然没有完全了解。已经提示慢性和急性过程先于对使用烟草的病理反应，但申请人第一次证实烟草消费（特别是通过吸烟）可以导致血液和组织中 AGE 水平升高。在使用抗 AGE 抗体的免疫化学染色的实验中注意到的情况显示 AGEs 密集地布满了患有血管疾病的吸烟者的冠状动脉，申请人还试图证实体内慢性接触烟雾可以导致控制良好的动物模型体内血液和组织 AGEs 升高。

使用全身吸入接触室，将生长 6 周的雄性和雌性大鼠（例如实验室菌株 F344）与载有经稀释主流烟雾产生的固定含量的香烟烟雾微粒的过滤空气的气体接触几周至 2 年范围内不同的时间期限。例如，按照 250mg 总微粒物质（TPM）/立方米的水平接触这类携带烟草烟雾的空气，每天接触 6 小时，每周接触 5 天，这一过程导致烟草烟雾沉积物与每天吸 5 包香烟的人的气道中的物质相同。如公开程序中更完整描述的（例如 J. Chen 等，1989，《吸入毒理学》（*Inhalation Toxicol.*）1:331-347），使用连续发烟机、从类型为 IR3 的无滤嘴研究用香烟（烟草健康研究院（Tobacco Health Research Institute）；Lexington, KY）中产生主流烟雾。将同样的对照动物装入而仅接触过滤的气流（不含香烟烟雾）。通过参照取自接触室的过滤样品的重量分析来测定烟雾接触的水平。已经具体地描述了这种接触烟雾空气的化学和物理特征（参见上文和 J. Chen 等，1992，《气溶胶药剂》（*Aerosol Med.*）5:19-30）。

在所要求的接触期限后，处死试验动物并收集各种器官和组织、包括（例如）全血并将它们抽样用于解剖、显微、和诸如 AGE 水平定量这样的生物化学分析。在一种优选的方法中，将血清在磷酸缓冲盐水中按 1:5 进行稀释并将蛋白酶 K 添加至样品中总血清蛋白量的 1/100。然后在 37℃ 时通过培养使血清蛋白消化，并通过生

温至 70℃ 1 小时而将蛋白酶 K 灭活。在简单离心使之澄清后，收集上清液并在通过上文所述 AGE ELISA 来分析 AGE 含量前将其移至 1mM 苯甲基磺酰氟 (phenylmethylsulfonyl fluoride) (PMSF) 中。

在根据这种程序进行的初步研究中，来自与香烟烟雾接触 6-85 周期限大鼠的血清蛋白消化物显示出采集的平均 (± 标准偏差) AGE 水平为 22.0 ± 4.9 AGE 单位/ml 血清 (N=13)，而没有与香烟烟雾接触的对照大鼠表现出的平均血清蛋白 AGE 水平为 13.5 ± 2.9 AGE 单位/ml 血清 (N=7)。上述方法还提供了一种简便的测定法，使用该测定法估测本发明试剂和过滤装置在抑制、防止或回复因消费烟草导致的 AGEs 蓄积上的活性，例如按照本发明，可以处理烟草本身、原始或主流的烟草烟雾、载有烟雾的空气、或接触烟雾的动物，并检验试验动物的组织和血液以便测定通过与未处理或未接触的对照样品比较已由此减少、防止或回复的 AGE 蓄积的程度。

实施例 10

下面的实施例证明去除糖化毒素 (glycotoxins) 的滤嘴还增加了香烟的器官感觉潜能，且特别是去除了来自产生“较柔和烟雾”的香烟烟草烟雾味道的“刺激”。

为了安装用于本试验的香烟，将下列物质放入一种标准手动烟草滚压机中：一种标准商品滤嘴 (从 Marlboro 柔和型香烟中截下)，500mg 氨基胍或等量的氯化钠以及在其原始纸上的 3cm 长的商品香烟。使用一张滚压纸将这些物质包在一起。通过观察或触摸难以相互区分带有另外过滤物质的再滚压的香烟。

为了进行本试验，实验者配对安装、包括每类香烟之一 (即氨基胍或盐) 并用黄色斑点标注该对中的一个。然后将香烟放入 #10 包装以及含有标记 (即香烟带有黄色斑点) 的更小密封包装中。将包装内的一半带有氨基胍内置滤嘴的香烟用黄色斑点标注并将另一半带有氯化钠内置滤嘴的香烟用黄色斑点标注。

对 10 个受试者 (包括大量吸烟者和偶然吸烟者) 的每一个体给予上述包装之一的香烟并要求他们陈述两种香烟的感觉。由实验者

记录受试者的反应，然后实验者打开内部包装以显示标记。

所有 10 个受试者均认为两种香烟“品起来象一种香烟”。10 个受试者中的 8 个能够区分出两种香烟间细微的差异且所有的人均感觉含有氨基胍内置滤嘴的香烟产生的烟雾几乎不带有“刺激”或是一种“柔和烟雾”。1 个受试者描述到：“柔和得就象陈年红酒比新酒还柔和一样”。所有能够区分出两种香烟间差异的 8 个受试者均更喜欢带有氨基胍内置滤嘴的香烟。

实施例 11

本实施例证明糖化毒素 (glycotoxins) (AGE) 去除滤嘴能够防止香烟烟雾染色蛋白包被表面。在本实施例中，使用由胶原包被的微量滴定平板，而将发现的结果用于任何蛋白包被的表面，诸如牙齿、指甲或皮肤。

在实施例 4 中描述了 10 只带氨基胍或氯化钠过滤嘴的香烟的制备，在设备中发烟。5 毫升 PBS 加入 25 毫升带侧臂的玻璃烧杯中，20 只带有两种过滤嘴之一的香烟顺次放入插在瓶塞的孔中的 500 微升吸头中，且点燃。向烧瓶的侧臂施加 20 毫米汞柱，以将烟雾吸入烧瓶，与 PBS 接触。20 只香烟燃烧完后，加入 5 毫升新鲜的 PBS，将 2 毫升混合物加入到 6 孔板的每 3 孔中。每一 6 孔板有 3 孔有暴露于带氨基胍过滤嘴香烟烟雾的 PBS，3 孔有暴露于带氯化钠过滤嘴香烟烟雾的 PBS。板避光于 37 度温孵 48 小时。用含有 0.05% 吐温 20 的 PBS 洗涤 6 遍，比较孔底的颜色。孔中残存的颜色是着色的 AGE，它是糖化毒素和或反应性 AGE 与胶原包被的孔反应的结果。

实施例 12

用氨基胍喷雾烟草可消除糖化毒素 (glycotoxins)

在本实施例中，将烟叶用氨基胍（一种 AGE 形成抑制剂）处理，并观察到糖化毒素 (glycotoxins) 不能够促使体内 AGE 分子的形

成。用含有下列浓度氨基胍的 5mls 溶液喷雾与 5 支香烟的量相等的疏松烟叶: 10 mg/ml, 1 mg/ml, 0.1 mg/ml。喷雾后, 将烟叶用铝箔捆扎并在 37°C 下培养 7 天。然后将烟叶滚压成香烟并在实施例 3 和 4 的水管装置中点燃(上文所述)。使用上文所述体外 AGE 形成测定法测定糖化毒素(glycotoxins)含量。如附图 9 中所示, 观察到了糖化毒素(glycotoxins)含量的剂量依赖性降低。

讨论

上述公开内容和实施例证明了先前阐明的蛋白质糖化的生物和化学关系和作用, 依据的是器官感觉特性和烟草处理和消耗的药物动力学。因此, 由于在具有高循环和组织结合 AGE 水平的糖尿病病人中还观察到了与吸烟有关的许多血管并发症, 所以本文研究了吸烟促使 AGE 形成的可能性。更具体地说, 本文所列数据包括最新的内容, 该内容证明并例举了本文定义为糖化毒素(glycotoxins)的一组试剂的存在和活性。烟草和香烟烟雾的水提取物含有糖化毒素(glycotoxins)、显著反应性的还原糖或糖化中间产物, 它们在体外和体内可以快速诱导 AGE 在蛋白质上形成并在体外产生 DNA 突变。通过使烟雾经过氨基胍(一种 AGEs 形成的有效和特异性抑制剂)干燥柱可以从样品中去除这些活性。

来自香烟烟雾的糖化毒素(glycotoxins)具有许多独特的特性, 这些特性可将糖化毒素(glycotoxins)与上述研究的还原糖、葡萄糖和葡糖-6-磷酸区分开。最主要的是它们的极端反应性: 与所记录的已报导服用葡萄糖或葡糖-6-磷酸数天至数周以诱导可测定的 AGE 形成相反, 烟草衍生的糖化毒素(glycotoxins)可以在数小时内诱导 AGE 形成。当多数还原糖(诸如葡萄糖)需要转运进入细胞质时, 可认为糖化毒素(glycotoxins)轻易地通过细菌细胞的细胞膜。此外, 在健康人中, 来自香烟烟雾的糖化毒素(glycotoxins)可以通过肺被吸收并依次与血清蛋白反应。尽管我们没有测定糖化毒素(glycotoxins)的化学结构, 但是我们可以推断它们带有羰基并可能带有二羰基, 这是因为用氨基胍可以去除它们或使它们骤冷。糖化毒素(glycotoxins)可能是烟草处理

过程中引发的美拉德反应中形成的产物重排的一种产物。分离过程中糖化毒素 (glycotoxins) 的不稳定性意味着当处理烟草且当它老化时, 可恒定地形成并消耗它们和其它美拉德产物 (可能是导致烟雾香味的原因)。

体内由烟草糖化毒素 (glycotoxins) 形成的 AGEs 可以部分导致吸烟者中动脉粥样硬化的发病率增加。体外和体内有大量证据表明 AGEs 在动脉粥样硬化的病理上起一定作用: (1) 已经证明 AGEs 与用于增加相关组织刚性的相关组织胶原交联。(2) 胶原交联的 AGEs 用作以共价键方式捕捉循环血清蛋白、诸如脂蛋白的反应“病灶”。(3) 内皮细胞 AGE 受体的结合会增加血管的通透性、减少抗促凝剂凝血调节蛋白的合成并增加前促凝剂组织因子的合成。(4) 组织结合的 AGEs 可以以化学方式使细胞衍生的氧化氮骤冷, 由此抑制氧化氮依赖性血管舒张。(5) 已经证明含有胺的磷脂的 AGE 修饰可引起脂的氧化。细胞 LDL 受体不会识别氧化的 LDL, 且巨噬细胞清除剂受体可去除氧化的 LDL。脂载的血管壁巨噬细胞是通常在脂肪划线和其它类早期动脉粥样硬化损害中发现的特征性泡沫细胞。(6) 显著升高的血管组织的和循环的 AGEs 与糖尿病肾衰竭疾病末段的加速血管病相关。(7) 经血管内注入正常未成熟大鼠和家兔的外源 AGE 修饰的白蛋白可产生类似于在患有与衰老和糖尿病相关的血管疾病的动物体内观察到的血管改变。用外源 AGE 白蛋白注射的动物表现出血管壁通透性增加、内皮下和动脉周

(periarteriolar) 空间内单核细胞迁移活性和在用乙酰胆碱和硝化甘油攻击后检测的血压反应增加。[Vlassara 等 *PNAS* 89:12043 - 12047, 1992]。理想的是期望通过糖化毒素 (glycotoxins) 与血清和组织蛋白反应形成的 AGEs 具有与上述 AGEs 相同的活性。

糖化毒素 (glycotoxins) 还可以使吸烟者中癌症的发病率增加。除与蛋白质和脂上的氨基反应外, 还原糖还可以与核酸的氨基反应。体外用还原糖培养 DNA 或单核苷酸可产生类似于对与蛋白质和脂结合的 AGE 化合物所观察到的吸收度和荧光改变。用葡萄糖或葡糖-6-磷酸培养的细菌质粒 DNA 或哺乳动物穿梭载体 DNA 的培养表现出值得注意的突变率增加。(Bucala 等, 1984, *PNAS*, 81:105 - 109; Bucala 1985, *PNAS* 82:8439 - 8442; Lee AT 和 Cerami, A.

1987, *PNAS*84:8311-8314)。由于上述研究的还原糖能够通过细菌细胞膜，所以尽管可将它们添加到细菌生长培养基中，但是它们不会产生细菌内的突变。然而，已经证明葡糖-6-磷酸可诱导大肠杆菌（DF40和DF2000）糖酵解突变体内的突变，所述的突变体可在其细胞质内蓄积葡糖-6-磷酸。所有这些研究结果中的普遍特征在于由还原糖产生的大部分突变是插入体或缺失体。

哺乳动物中还原糖致突变性的最令人信服的证据来自 Lee 等所做的工作（（1994）*FASEB*杂志 8:545-550），即母体高血糖环境对小鼠体内胚胎生长的影响。象眼睛的晶状体和红细胞一样，胚胎细胞不需要胰岛素将葡萄糖转移通过其膜。将含有细菌基因（*lacI*，一种特征明显的诱变标记物）整合复制物的转基因鼠胚胎植入链尿菌素诱导的糖尿病和对照替代母体中。在来自植入糖尿病母体的胚胎的 DNA 中，*lacI* 突变率显著高于来自植入对照小鼠的情况。

尽管患有糖尿病的哺乳类动物具有升高的血清葡萄糖水平，但是没有可证实的证据证明任何类癌症在它们体内增加。葡萄糖不会自由地进入哺乳动物细胞；它需要胰岛素存在以刺激其迁移。因此在成熟哺乳类动物体内，胞内葡萄糖浓度依赖于血清葡萄糖水平。然而，重要的是要注意糖化毒素（glycotoxins）远比葡萄糖更有效。象葡萄糖和葡糖-6-磷酸一样，它们可以在一种氨基胍依赖性方式中产生插入和/或缺失突变体，但不象这些其它的还原糖，糖化毒素（glycotoxins）可以轻易地通过细胞膜。

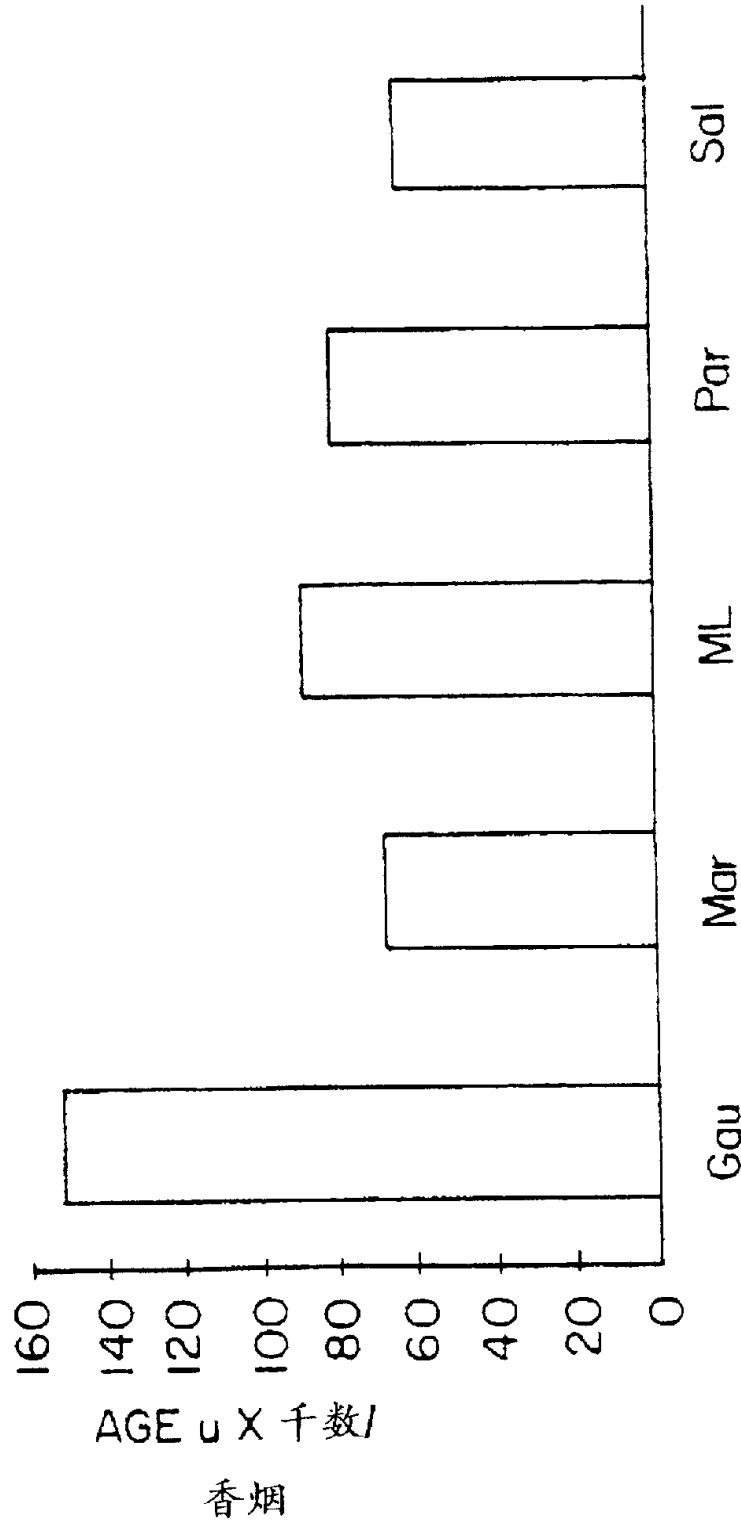
总之，我们的发现表明糖化毒素（glycotoxins）（在香烟烟雾中发现的）可部分导致吸烟者中观察到的动脉粥样化血管疾病和癌症的增加率。在吸烟过程中，将高浓度的糖化毒素（glycotoxins）吸入肺泡，在肺泡中，可以将它们吸入血流并吸入肺实质细胞。一旦处于血流中，则糖化毒素（glycotoxins）可以诱导在血清和血管壁蛋白上形成 AGE 的部分并由此加速动脉粥样硬化的发展。糖化毒素（glycotoxins）还可以与肺实质细胞核中的核酸反应，从而诱导突变和可能的癌症。

本发明可以概括在其它形式中或以其它方式进行而不会脱离其实质或基本特征。因此将本说明书的公开内容在所有方面看作是说



明性的而非限制性的，本发明的范围由所附的权利要求来表示，且在相同的目的和范围内的所有改变均包括在其中。

说明书附图



香烟牌号

图 1

1993
1993
1993
1993

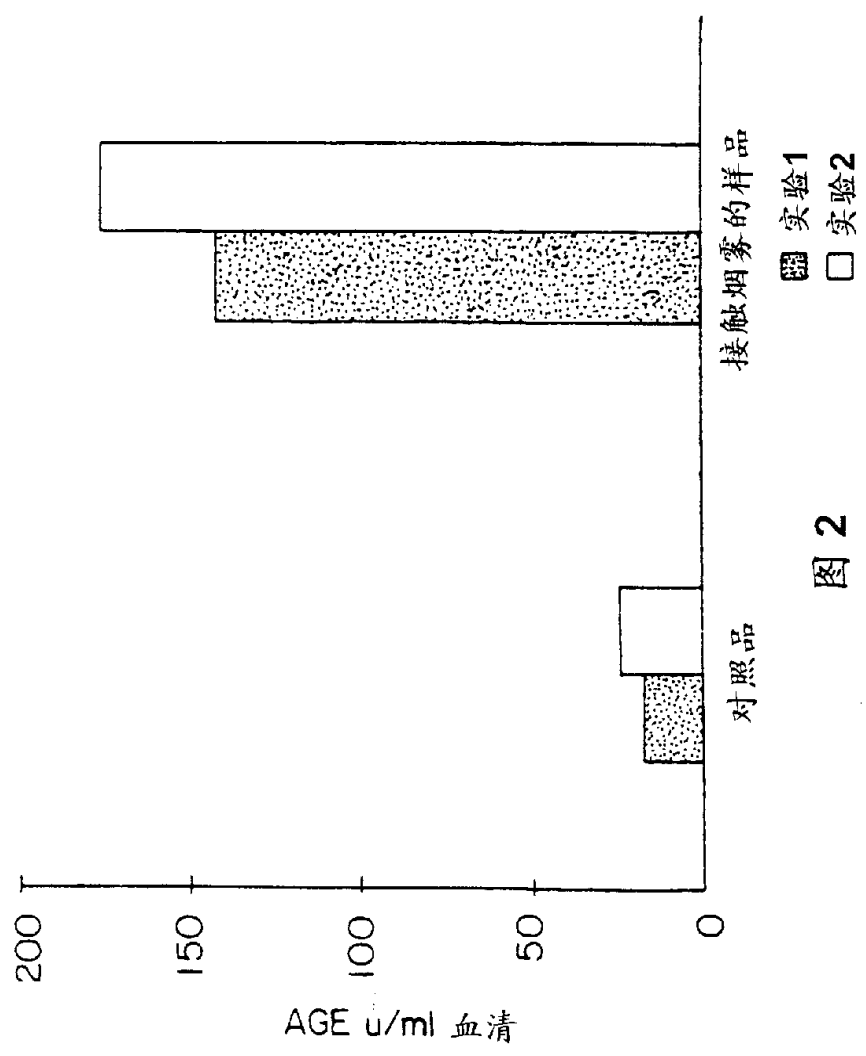


图 2

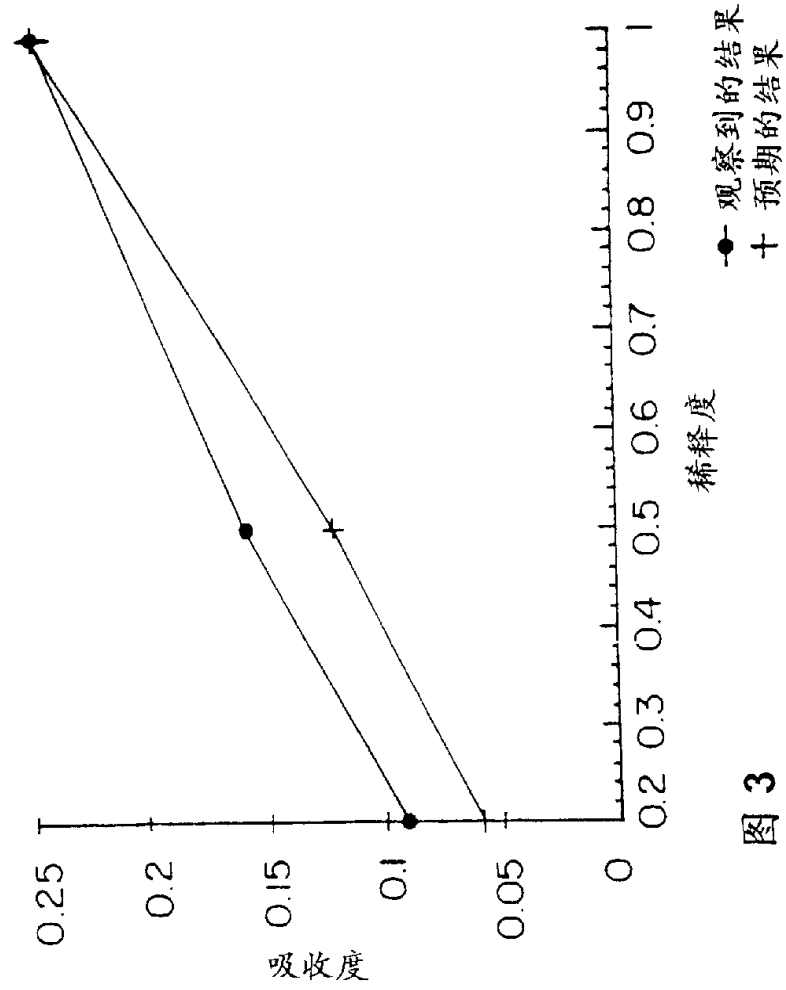


图 3

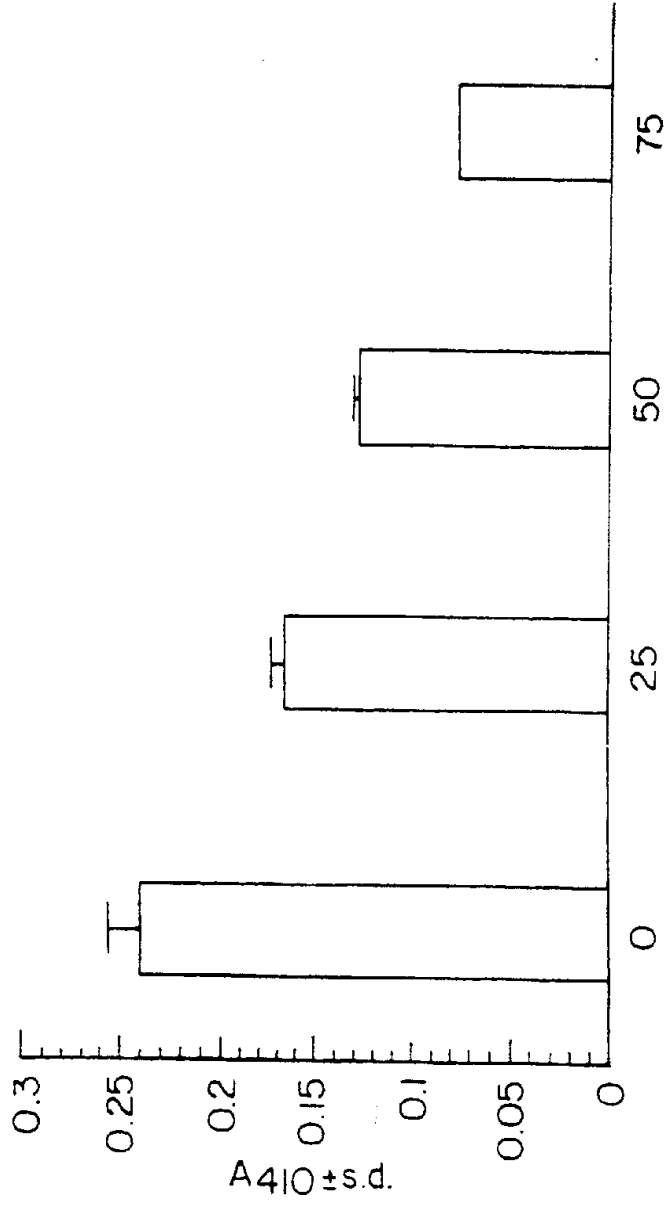
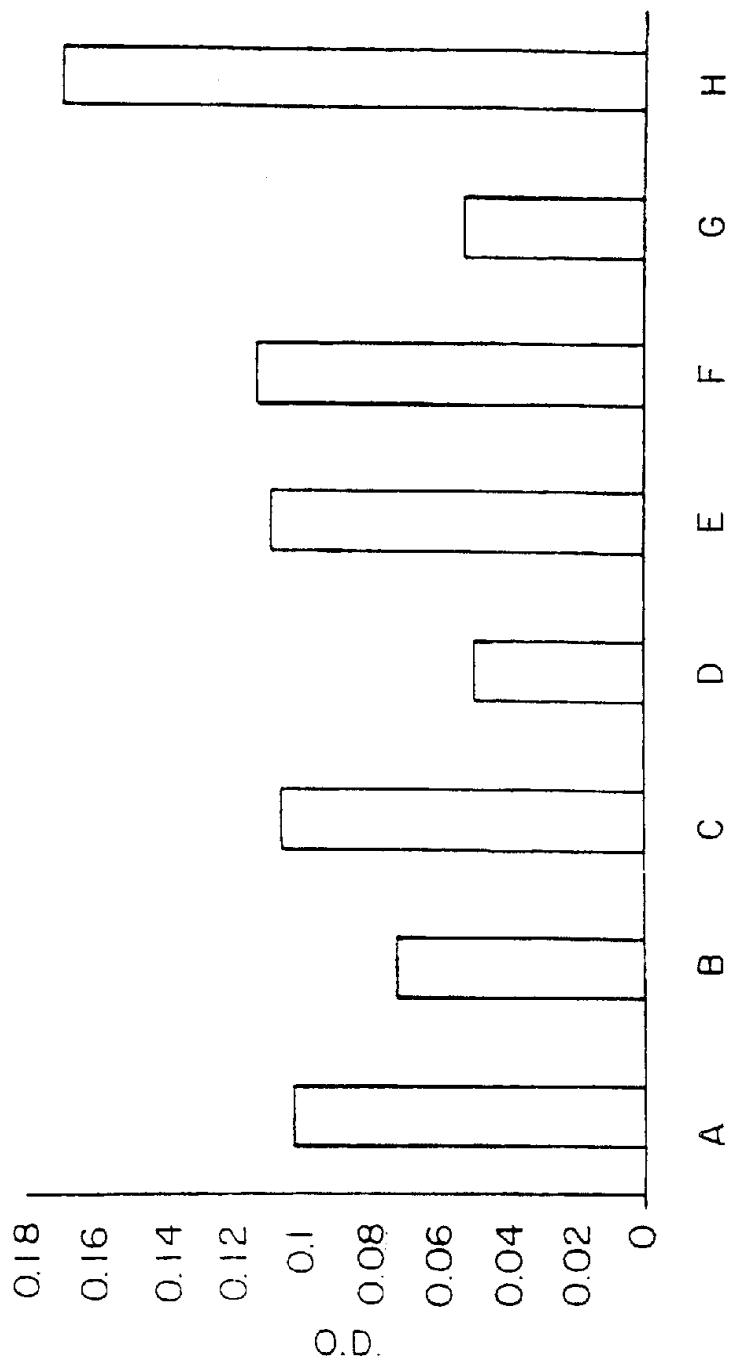


图 4 氨基胍浓度 (mM)

0.1
0.2
0.3
0.4
0.5
0.6
0.7
0.8
0.9
1.0



香烟牌号

图 5A

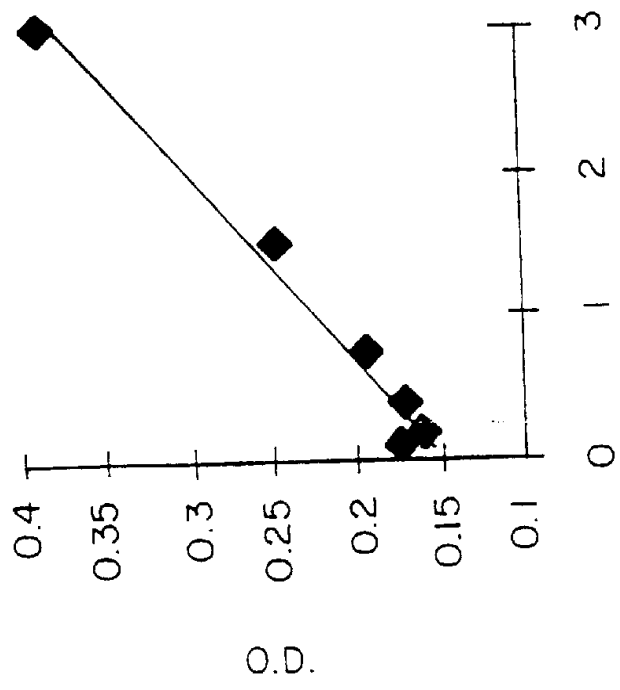


图 5B 克烟草/ml

1.1.1.1
1.1.1.2
1.1.1.3
1.1.1.4
1.1.1.5
1.1.1.6
1.1.1.7
1.1.1.8
1.1.1.9
1.1.1.10

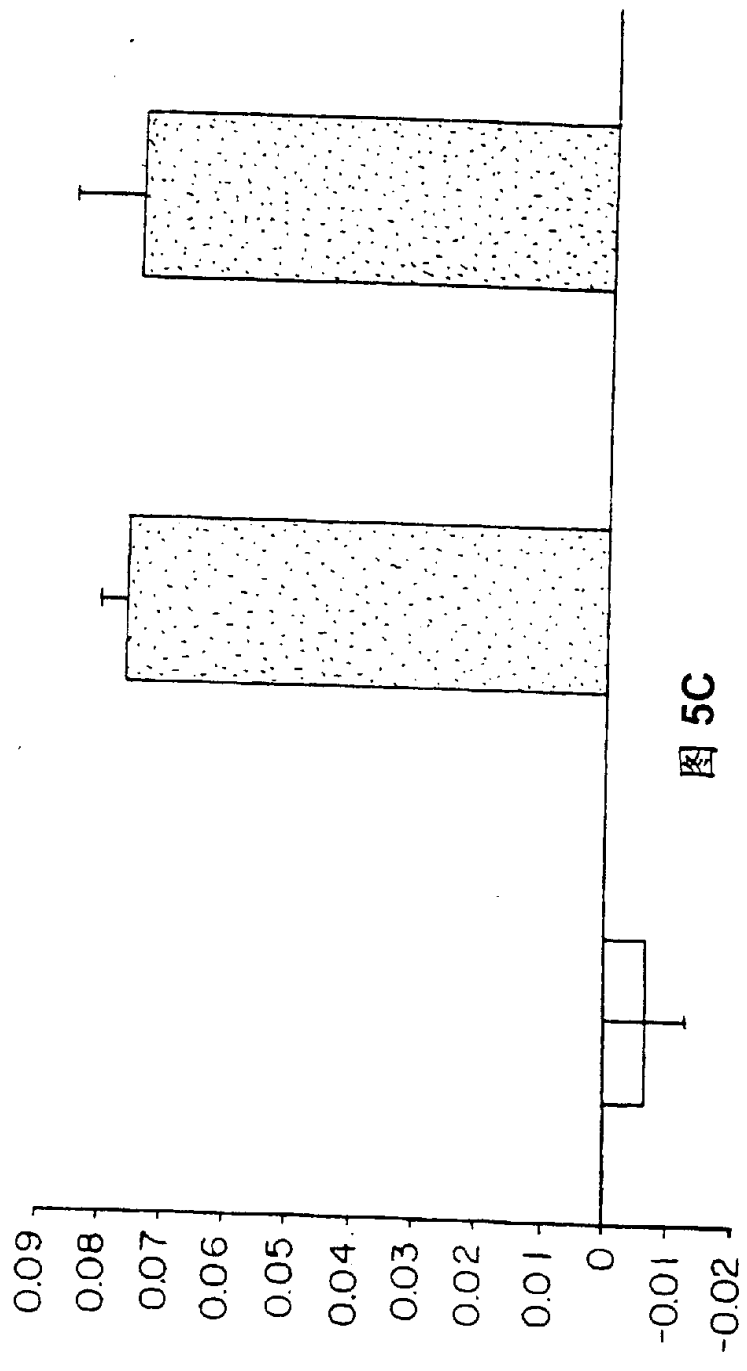


图 5C

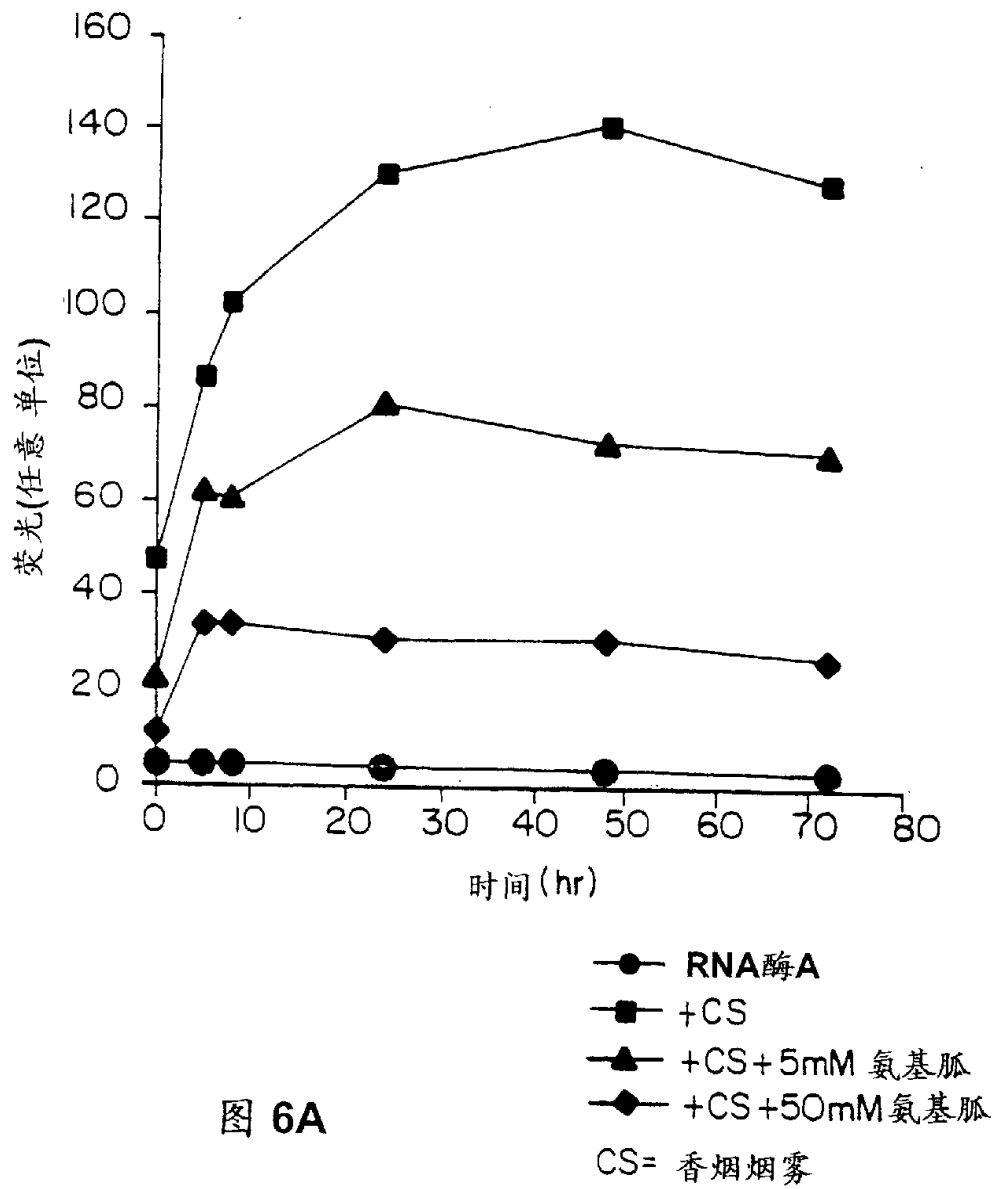


图 6A

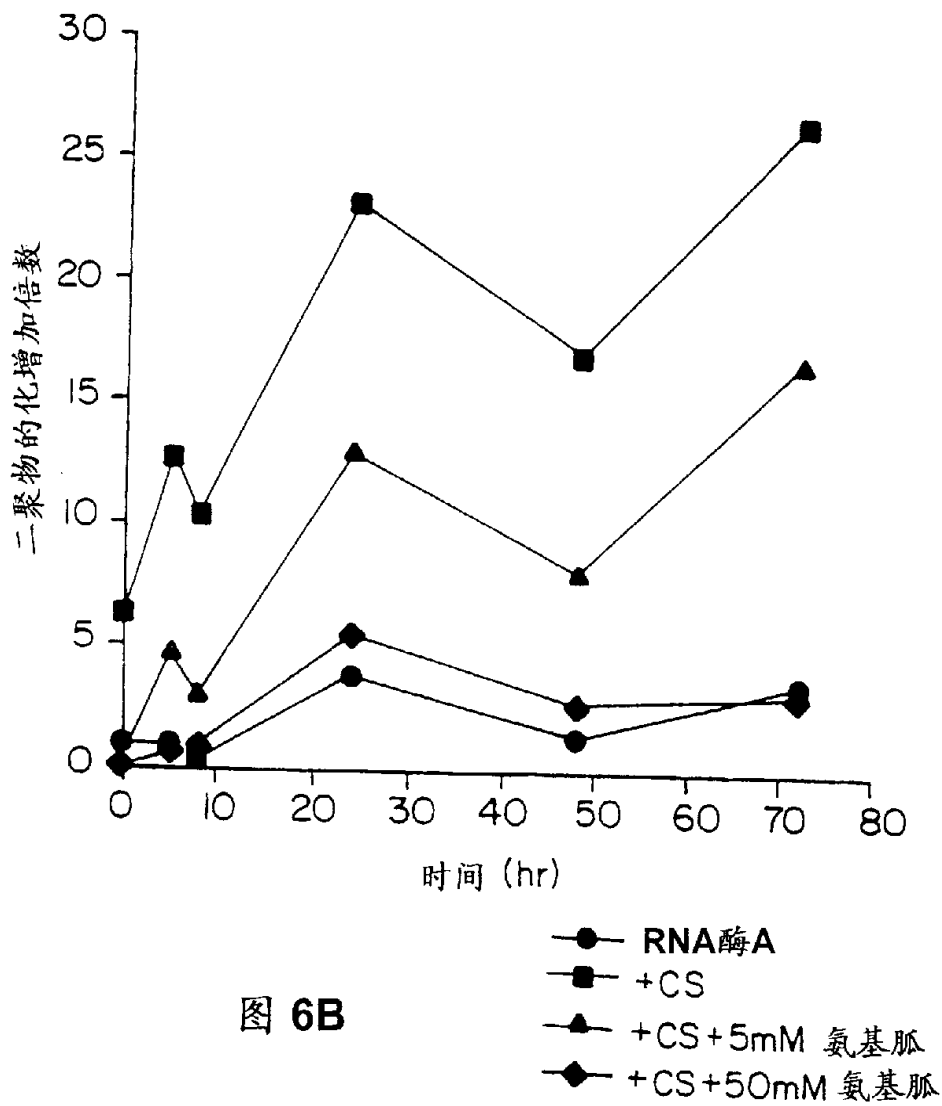


图 6B

2000
2000
2000
2000
2000
2000
2000
2000
2000
2000

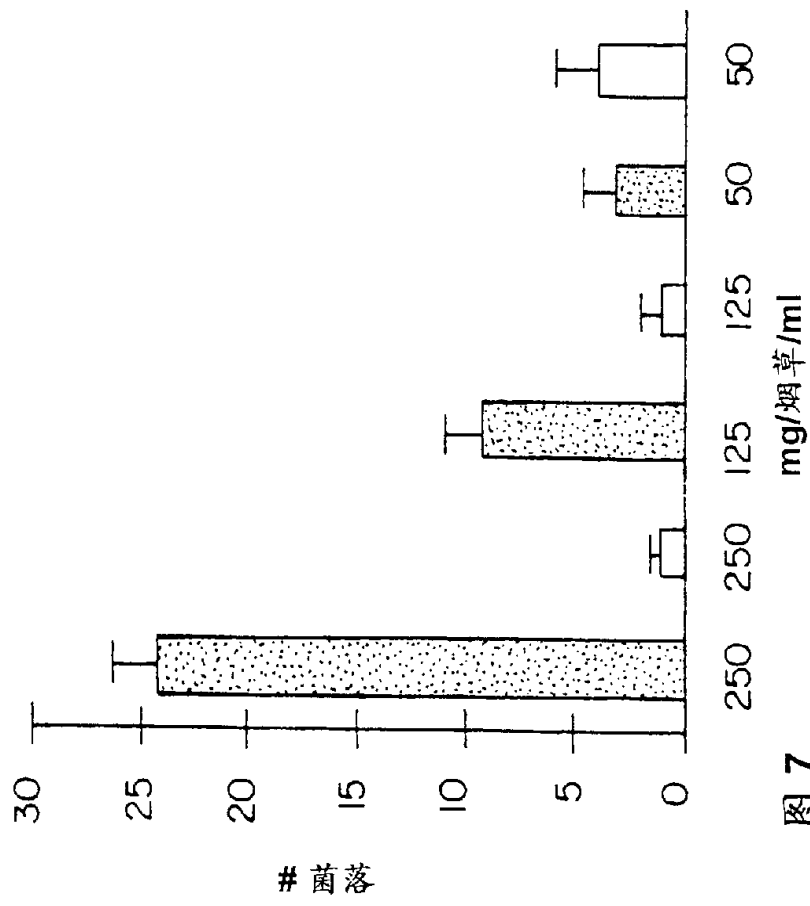


图 7

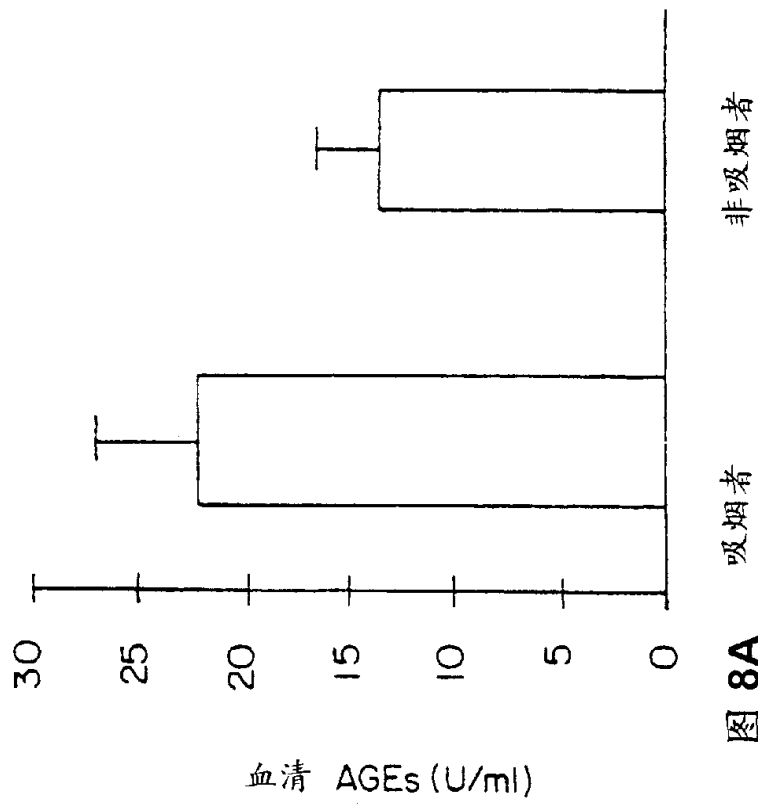


图 8A

2000
1999
1998
1997
1996
1995
1994
1993
1992
1991
1990
1989
1988
1987
1986
1985
1984
1983
1982
1981
1980
1979
1978
1977
1976
1975
1974
1973
1972
1971
1970
1969
1968
1967
1966
1965
1964
1963
1962
1961
1960
1959
1958
1957
1956
1955
1954
1953
1952
1951
1950
1949
1948
1947
1946
1945
1944
1943
1942
1941
1940
1939
1938
1937
1936
1935
1934
1933
1932
1931
1930
1929
1928
1927
1926
1925
1924
1923
1922
1921
1920
1919
1918
1917
1916
1915
1914
1913
1912
1911
1910
1909
1908
1907
1906
1905
1904
1903
1902
1901
1900

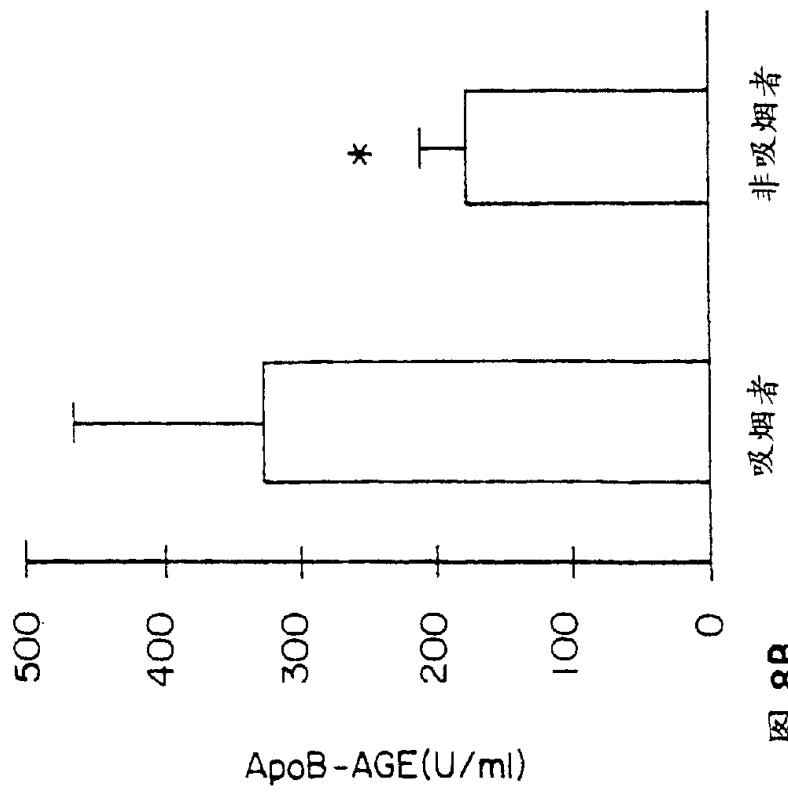


图 8B

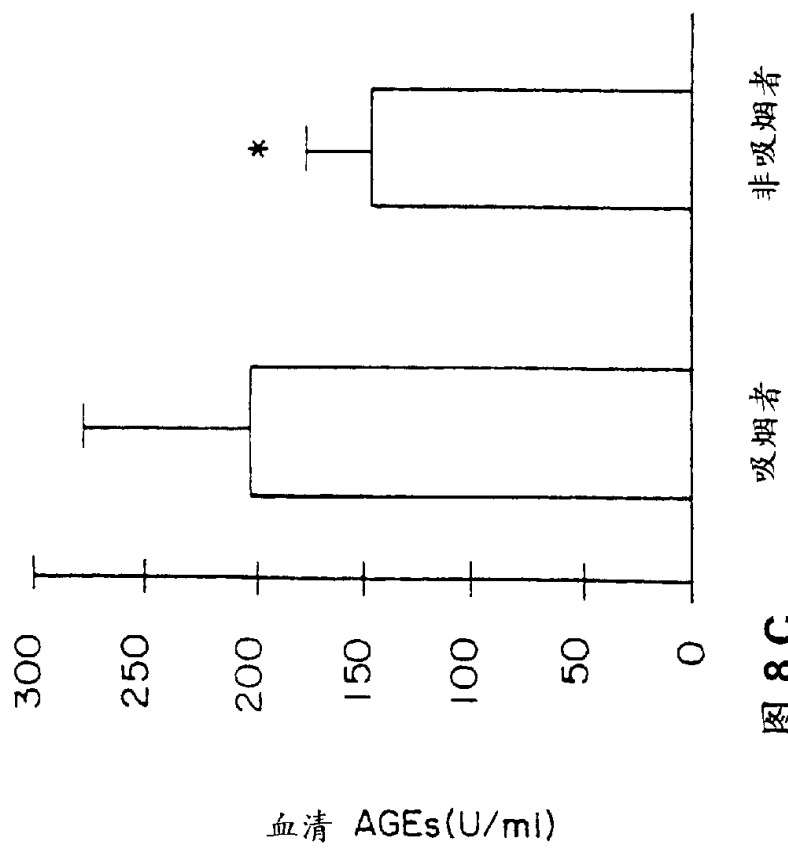


图 8 C

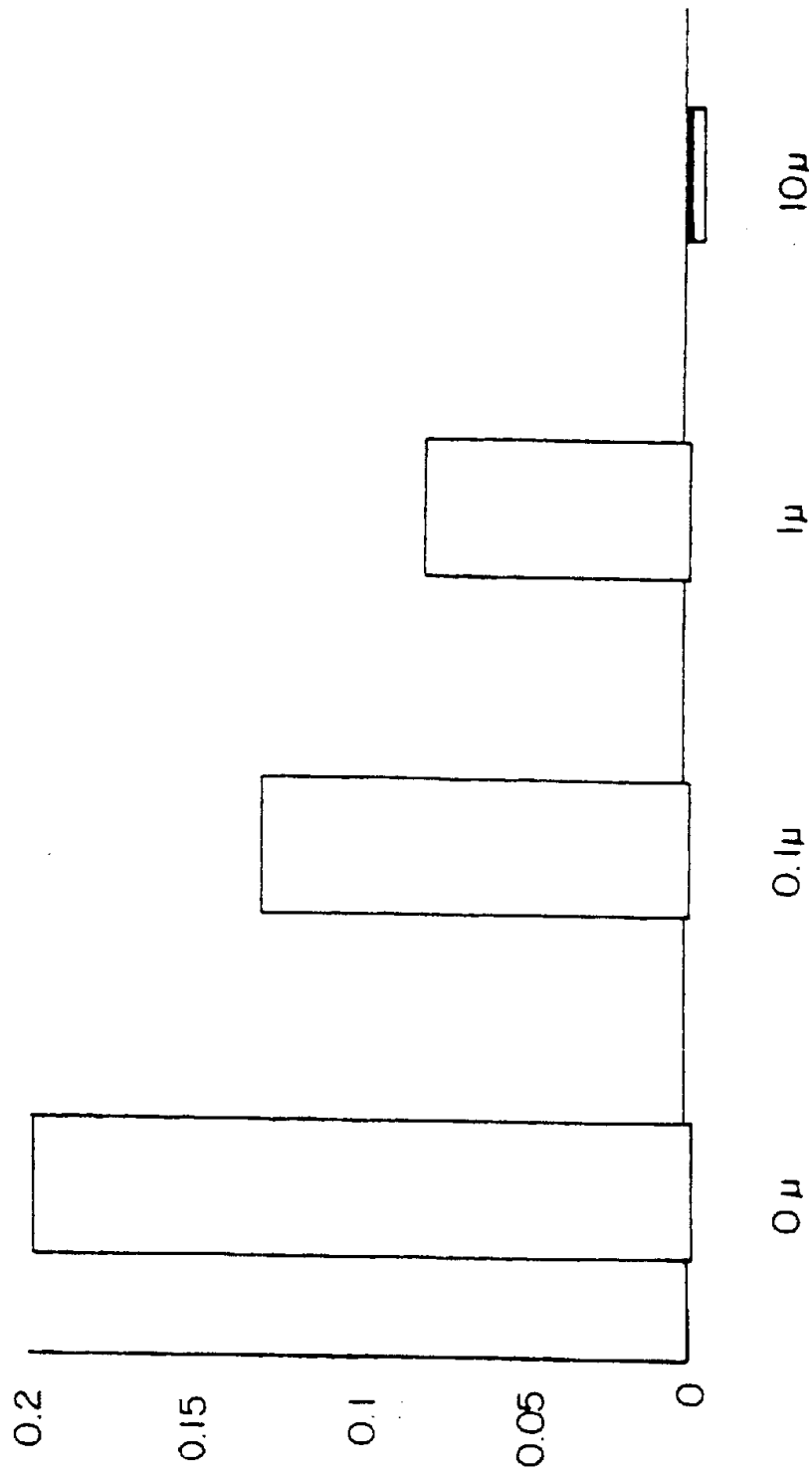


图 9