



(12) **BẢN MÔ TẢ SÁNG CHẾ THUỘC BẰNG ĐỘC QUYỀN SÁNG CHẾ**

(19) **Cộng hòa xã hội chủ nghĩa Việt Nam (VN)**
CỤC SỞ HỮU TRÍ TUỆ

(11) 
1-0020304

(51)⁷ **A01H 05/00, 01/00**

(13) **B**

(21)	1-2006-00429	(22)	18.08.2004		
(86)	PCT/US2004/026815	18.08.2004	(87)	WO2005/018307A1	03.03.2005
(30)	60/496,290	19.08.2003	US		
(45)	25.01.2019	370	(43)	25.01.2007	226
(73)	22ND CENTURY LIMITED, LLC (US) 125 Virgil Avenue, Buffalo, NY 14216				
(72)	PANDOLFINO, Joseph (US)				
(74)	Công ty Cổ phần Hỗ trợ phát triển công nghệ Detech (DETECH)				

(54) **THUỐC LÁ CHỨA PHẦN CÂY NICOTIANA TABACUM CHUYỂN GEN CÓ HÀM LƯỢNG NICOTIN CAO**

(57) Sáng chế đề cập đến thuốc lá chứa phần cây *Nicotiana tabacum* chuyển gen có hàm lượng nicotin cao. Sáng chế cũng đề cập đến các phương pháp, bao gồm việc sử dụng thuốc lá cải biến di truyền (GM), để phát triển và sản xuất PREPs được người tiêu dùng chấp nhận bao gồm: 1) tạo ra thuốc lá có tỷ lệ nhựa với nicotin thấp, cho phép người hút thuốc có được các lượng nicotin đủ thoả mãn hơn thuốc lá thông thường trong khi giảm toàn bộ lượng khói nhận; nhờ đó giảm "sự đền bù" cho người hút thuốc, vấn đề vẫn tồn tại với thuốc lá thông thường hiệu suất thấp; 2) giảm nitrosamin riêng có hại trong thuốc lá bằng phương pháp di truyền và bằng cách chiết nicotin từ thuốc lá và kết hợp với thuốc lá chứa lượng nicotin giảm được cải biến gen; 3) tạo ra thuốc lá giãn nở cải thiện bằng cách sử dụng thuốc lá chứa lượng nicotin tăng được cải biến gen; và 4) tạo ra thuốc lá hoàn nguyên bao gồm loại bất kỳ trong các loại dưới đây: thuốc lá chứa lượng nicotin tăng được cải biến gen, thuốc lá chứa lượng nicotin giảm được cải biến gen, các phần lá thuốc lá, và thuốc lá làm khô ở nhiệt độ thấp mới thu hoạch.

Lĩnh vực kỹ thuật được đề cập

Sáng chế đề cập đến các sản phẩm thuốc lá có độ phơi nhiễm giảm, bao gồm nhưng không giới hạn ở các điều thuốc lá chứa sợi thuốc lá cải biến di truyền và các phương pháp tạo ra các điều thuốc lá này.

Tình trạng kỹ thuật của sáng chế

Việc sử dụng thuốc lá được coi là nguyên nhân gây ra chứng bệnh nguy hiểm và tử vong có thể ngăn chặn được ở Mỹ (U.S. Department of Health and Human Services (U. S. DHHS), January 2000, Healthy People 2010). Trong một vài thập kỷ qua, cộng đồng sức khỏe chung đã nhiều lần nêu rõ hậu quả của việc hút thuốc lá đối với sức khỏe. Các bệnh tim mạch, các bệnh đường hô hấp và các bệnh ung thư được cho là do hút thuốc đã phát triển rộng rãi và gia tăng, như được chứng minh bởi hầu hết báo cáo tổng quát ngoại khoa gần đây nhất (The Health Consequences of Smoking, Surgeon General's Report, 2004). Trung tâm kiểm soát bệnh tật (The Center for Disease Control) đã dự đoán rằng có hơn 440.000 trường hợp chết yếu mỗi năm ở Mỹ có thể được cho là do hút thuốc lá (Center for Disease Control, Targeting Tobacco Use, 2004).

Trong khi tỷ lệ hút thuốc ở thế giới phát triển đã chững lại vào cuối các năm 30, và thậm chí đã giảm ở một số nước, tỷ lệ hút thuốc và tỷ lệ tiêu thụ thuốc lá ở thế giới phát triển đã tăng trong cùng khoảng thời gian này và dường như sẽ tiếp tục phát triển như vậy trong tương lai thấy trước. Các dự đoán hiện tại chứng tỏ rằng số lượng người nghiện thuốc trên toàn thế giới sẽ tăng từ 1,3 tỉ hiện tại lên đến hơn 1,7 tỉ vào năm 2025 (một phần do dân số toàn cầu tăng) nếu sự thịnh hành của thuốc lá trên toàn cầu vẫn không thay đổi (World Health Organization, 2004).

Tổng mức tiêu thụ thuốc lá trên toàn cầu vẫn tiếp tục gia tăng. Về mặt số lượng, mức tiêu thụ thuốc lá trên thế giới tăng 4 phần trăm từ năm 1995 đến năm 1999, từ 4,763 nghìn tỷ điếu đến 4,953 nghìn tỉ điếu. Thị trường các sản phẩm—sợi thuốc lá chế biến bị chi phối bởi thuốc lá điếu, đó là nguyên nhân tạo ra 96 phần trăm giá trị thị trường toàn cầu (*The World Market for Tobacco Products*, published by Euromonitor International, 2000 Edition, p.2). Vào năm 2002, thị trường toàn thế giới đã phát triển đến 5,322 nghìn tỷ điếu (*Action on Smoking and Health*, Factsheet No: 18; January, 2004).

Xét về tầm quan trọng và tốc độ phát triển của các số lượng này, chúng tỏ rằng tình trạng người sẽ hút thuốc kéo dài sẽ xảy ra. Dự đoán rằng hút thuốc lá có thể là nguyên nhân gây ra tới một nghìn tỷ cái chết yểu trên toàn thế giới vào cuối thế kỷ 21. Các số liệu thống kê hiện tại chứng minh rằng có khoảng một người chết vì ung thư phổi khi sử dụng 3 nghìn điếu thuốc lá (*Nature Cancer Reviews*, Oct. 2001).

Giải pháp lý tưởng để giải quyết tình thế khó xử đối với việc chăm sóc sức khoẻ cho tất cả những người nghiện thuốc là bỏ thuốc. Tuy nhiên, giải pháp này dường như là không tưởng. Chính sách của những người ủng hộ việc chống thuốc từ nhóm người vận động chống thuốc phần lớn đã không thành công căn cứ vào mức tiêu thụ các sản phẩm thuốc lá trên toàn thế giới gia tăng. Các chính sách này ở phương Tây, nơi mà chúng phổ biến nhất, thì tỷ lệ hút thuốc đã hầu như không giảm trong hai mươi năm qua. Một tỷ lệ đáng kể những người nghiện thuốc không muốn bỏ thuốc. Thậm chí dù hàng chục nghìn người chỉ riêng ở Mỹ đã bỏ hút thuốc, phần lớn trước khi có nhiều dạng liệu pháp thay thế nicotin (NRTs), thì một nhóm người nghiện thuốc đã không thành công khi cố gắng từ bỏ thuốc. Cách hữu hiệu để giảm các tác dụng phụ của việc hút thuốc cho hai nhóm đó đã không khả thi.

Báo cáo mới đây của Institute of Medicine (IOM) of the National Academy of Sciences, với lời yêu cầu của U.S. Food and Drug Administration, đã đặt nền móng cho biện pháp khắc phục hữu hiệu tình trạng bế tắc hiện nay. Báo cáo dài 656

trang thu được với tiêu đề Clearing the Smoke: Assessing The Science Base For Tobacco Harm Reduction (IOM Report), thể hiện nhu cầu khẩn cấp về sức khỏe chung đối với các sản phẩm có độ phơi nhiễm giảm hữu hiệu ("PREPs"), đặc biệt là thuốc lá (Institute of Medicine, Washington, DC: National Academy Press, 2001).

Kết luận đầu tiên của báo cáo IOM Report là: "đối với nhiều bệnh do sử dụng thuốc lá, có thể giảm nguy cơ của bệnh bằng cách giảm mức độ phơi nhiễm với các chất độc của thuốc lá. Kết luận này dựa vào các nghiên cứu chứng tỏ rằng đối với nhiều bệnh, việc giảm mức độ phơi nhiễm do hút thuốc có thể dẫn đến giảm tỷ lệ mắc bệnh bằng cách kiêng hút thuốc hoàn toàn tạo ra hiệu quả rất lớn." (IOM Report Executive Summary, pg. 4).

Vì vậy PREPs là chính sách sức khỏe chung cần thiết nếu tính đến tất cả các động lực kinh tế và chính trị. Sự tiếp thị và điều chỉnh của PREPs dựa vào khoa học cần là nhiệm vụ của bất kỳ biện pháp chính sách chung hoàn chỉnh nào đối với thuốc lá. Toàn bộ mục đích giảm sử dụng thuốc lá, bao gồm hạn chế tiếp thị thuốc lá hợp lý với người trưởng thành, cấm nghiêm ngặt việc bán và tiếp thị thuốc lá với trẻ em, và giáo dục về tác hại của việc hút thuốc lá, phải kết hợp chặt chẽ với lợi ích của PREPs với người hút thuốc để giảm toàn bộ thiệt hại của thuốc lá đối với xã hội.

Khói thuốc lá được tạo ra từ hai pha: pha hạt, pha này thường được gọi là "nhựa" hoặc toàn bộ nguyên liệu hạt; và pha khí, pha này chứa các khí và các hợp chất gần như bay hơi. Định nghĩa chung về "nhựa" là "khói khô không chứa nicotin" hoặc "nguyên liệu hạt khô không chứa nicotin" (NFDPM). Cụ thể hơn, "nhựa" là toàn bộ nguyên liệu hạt được tách từ khói, bao gồm nước và các hợp chất alkaloit, nhưng không giới hạn ở nicotin. Gần 4 phần năm khối lượng khói thuốc được tạo ra từ không khí môi trường, không khí này bao gồm cacbon monoxit, cacbon dioxit, nước, hydro, metan, khí nitơ và oxy. Một phần năm còn lại bao gồm pha hạt và các hợp chất gần như bay hơi. Nhựa chiếm ít hơn 10 phần trăm trọng lượng khói thuốc. Nó còn là thành phần nhựa chiếm phần lớn trong các hợp chất gây hại nhất.

Khối thuốc là hỗn hợp phức chất rất cao của các hợp chất hoá học. Bản phân tích hoá học trong các năm về khối thuốc thể hiện trên 6000 thành phần (nhựa cùng với các khí). Khoảng 4800 hợp chất được nhận dạng trong phần nhựa của khối thuốc (Green and Rodgman, Recent Advances in Tobacco Science, 22: 131-304, 1996). Các phương pháp phân tích kết hợp với thử nghiệm sinh học đã nhận dạng ra 69 chất gây ung thư trong khối thuốc lá (The Changing Cigarette: Chemical Studies and Bioassays, Dietrich and Ilse Hoffman, Chapter 5, Smoking and Tobacco Control Monograph No. 13, NIH Pub. No. 02-5074, October 2001).

Đã trở nên rõ ràng từ các nghiên cứu, tuy nhiên, không phải tất cả các thành phần của khối thuốc có độ độc như nhau. Đặc biệt là, báo cáo đầu tiên của U.S. Surgeon General về việc hút thuốc vào năm 1964 đã đi đến kết luận rằng nicotin hầu như chắc chắn không độc ở các mức mà người nghiện thuốc hút vào, với hàm ý là nguồn phần thưởng được lý chính cho những người không trực tiếp hút thuốc (Gori, p.3, Virtually Safe Cigarettes-Reviving an Opportunity Once Tragically Rejected. 2000). Thực tế, báo cáo của Surgeon General cho biết, "không có dấu hiệu nào có thể chấp nhận rằng phơi nhiễm kéo dài với nicotin tạo ra hoặc các thay đổi chức năng nguy hiểm thuộc bản chất đối tượng hoặc các bệnh suy biến" (U. S. Surgeon General Report 1964, pg.74). Thực vậy, hiện nay U.S. Food and Drug Administration cho phép bán các miếng chứa nicotin và kẹo cao su như là các thiết bị tạm ngừng hút thuốc có thể chứa nicotin nhiều hơn một gói thuốc lá.

"Alkaloid" là các hợp chất chứa nitơ, phức hệ tự nhiên có trong thực vật, và có các tác dụng dược lý với con người và động vật. "Nicotin" là alkaloid tự nhiên quan trọng nhất trong sợi thuốc thương phẩm và chiếm khoảng 90 phần trăm hàm lượng alkaloid trong *Nicotiana tabacum*. Các alkaloid chính khác trong sợi thuốc lá bao gồm cotinin, normicotin, myosin, nicotyrin, anabasin và anatabin (J. C. Leffingwell, Chapter 8 Leaf Chemistry, Tobacco: Production, Chemistry and Technology, pg.275, 1999). Các alkaloid thứ yếu trong sợi thuốc lá bao gồm nicotin-n-oxit, N-metyl anatabin, N-metyl anabasin, pseudooxynicotin, 2,3 dipyrídyli và các loại khác

("Biosynthesis and Metabolism of the Tobacco Alkaloids", Edward Leete in *Alkaloids: Chemical and Biological Perspectives*, Volume I, S. William Pelletier, Ed. 1983). Một số các tác dụng thông thường của nicotin với con người là làm tăng huyết áp và nhịp tim và cải thiện mức độ tập trung và trí nhớ trong thời gian ngắn. Các chất tương tự nicotin và các hợp chất là đối tượng của nhiều sự nghiên cứu gần đây do chúng thể hiện khả năng điều trị một số bệnh như bệnh Alzheimer và Parkinson. Các alkaloid khác trong sợi thuốc lá là như nhau nhưng có hoạt tính kém so với nicotin.

Các số đo thông thường nhất về lượng khói thuốc lá được đề cập tới là nhựa và nicotin. Hiệu suất nhựa và nicotin của thuốc lá được thể hiện trong tất cả các quảng cáo thuốc lá cho người tiêu dùng ở Mỹ và nhiều nước khác. Ở nhiều nước, hiệu suất (trên một điếu thuốc) đối với nhựa, nicotin và thậm chí với cacbon monoxit là cần thiết được in trên vỏ bao thuốc. Trong một vài thập kỷ qua, các đổi mới về loại thuốc lá tập trung phần lớn vào việc giảm lượng nhựa và nicotin, trên cơ sở tin tưởng rằng "ít hơn chắc là tốt hơn" được chấp nhận bởi cộng đồng sức khỏe chung và U.S. Surgeon General (Xem Fig.1).

Ở Mỹ, các hiệu suất nhựa, nicotin, và cacbon monoxit thu được nhờ sử dụng phương pháp kiểm tra bằng thiết bị hút thuốc Federal Trade Commission (FTC), nó xác định rõ số lượng hiệu suất nhựa như đó là nguyên liệu bị giữ bởi miếng đệm Cambridge khi một điếu thuốc lá được hút bằng máy, trừ đi nicotin và nước (Pillsbury, et al., 1969, "Tar and nicotine in cigarette smoke". *J. Assoc. Off. Analytical Chem.*, 52, 458-62). Đặc biệt, phương pháp thử nghiệm thuốc lá FTC thu gom các mẫu khói thuốc bằng cách tái tạo khối gồm 35ml khói thuốc lá phụt ra trong 2 giây mà thường là trong 58 giây, không có các lỗ thông gió màng lọc bị ngăn chặn (nếu có), cho tới khi vạch đường đốt cháy chạm tới phần giấy đầu ngậm của điếu thuốc lá trên 2mm, hoặc đường vẽ 23mm từ đầu mút của điếu thuốc lá không đầu lọc. Phương pháp thử nghiệm bằng máy hút thuốc FTC này đã được sử dụng ở Mỹ từ năm 1967 để xác định các hiệu suất đối với nhựa và nicotin của thuốc

lá. Quá trình xác định các hiệu suất cacbon monoxit ở khói thuốc được bổ sung vào phương pháp này vào năm 1980.

Vào năm 1967, khi FTC giới thiệu phương pháp thử nghiệm của nó, nó đưa ra các tin tức mới và giải thích rằng mục đích của thử nghiệm “không phải để xác định lượng nhựa và nicotin được hút vào bởi bất kỳ người hút thuốc nào, mà đúng hơn là để xác định lượng nhựa và nicotin phát sinh khi thuốc lá được hút bằng máy theo phương pháp được mô tả. "Tuy nhiên, phương pháp đáp ứng được vai trò quan trọng là tạo ra cách chính xác để xếp loại và so sánh thuốc lá theo hiệu suất nhựa, nicotin và cacbon monoxit.

International Standards Organization (ISO) đã triển khai phương pháp thử nghiệm hút thuốc bằng máy tương tự về hiệu suất nhựa, nicotin, và cacbon monoxit của thuốc lá (ISO, 1991 "Các điều thuốc lá-xác định tổng và nguyên liệu hạt khô không chứa nicotin bằng máy hút thuốc phân tích thông thường" ISO: 4387: 1991).

Các phương pháp hút thuốc FTC và ISO không giống nhau ở 8 phạm vi dưới đây.

- Phương pháp FTC định rõ các điều kiện môi trường phòng thí nghiệm là $75^{\circ}\text{F} \pm 1^{\circ}\text{F}$ ($23,8^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$) và độ ẩm tương đối là $60\% \pm 2\%$ cả đối với quá trình cân bằng và thử nghiệm. Thời gian cân bằng tối thiểu là 24 giờ và tối đa là 14 ngày. Nó được so sánh với các yêu cầu kỹ thuật ISO là $22^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ và độ ẩm tương đối là $60\% \pm 2\%$ để cân bằng, $22^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$ và độ ẩm tương đối là $60\% \pm 5\%$ để thử nghiệm. Thời gian cân bằng tối thiểu là 48 giờ và tối đa là 10 ngày.

- FTC xác định chiều dài mẫu thuốc lá hút còn lại tối thiểu là 23mm hoặc phần giấy đầu ngậm của điếu thuốc lá trên 3mm, bất cứ chiều dài nào dài hơn. ISO xác định chiều dài mẫu thuốc lá hút còn lại dài nhất là 23mm hoặc phần giấy đầu ngậm của điếu thuốc lá trên 3mm hoặc đầu lọc là trên 8mm. Cả hai phương pháp

này chỉ rõ chiều dài mẫu thuốc lá hút còn lại là 23mm đối với thuốc lá không đầu lọc.

- ISO xác định vị trí của tro ở 20-60mm dưới điều thuốc trong máy hút thuốc. FTC không định rõ vị trí.

- ISO định rõ kẹp có hai phần cùng với đót lọc có thể dùng lại được. Đót lọc này chứa miếng đệm Cambridge và sử dụng vòng đệm đục lỗ bằng cao su tổng hợp để che một phần cuối của mẫu thuốc lá hút còn lại. Phương pháp FTC xác định việc sử dụng miếng đệm lọc Cambridge nhưng không định rõ bộ phận lắp ráp đót đệm lọc.

- Phương pháp ISO định rõ dòng khí qua điều thuốc lá ở mặt điều thuốc lá. FTC định rõ việc sử dụng điều thuốc lá giám sát để điều chỉnh dòng khí.

- Phương pháp ISO xác định quy trình làm sạch nguyên liệu hạt tổng dư (TPM) trong đót lọc đã sử dụng. Các bề mặt bên trong của đót lọc được làm sạch bằng hai phần tư riêng biệt của miếng đệm lọc chưa sử dụng. Phương pháp FTC sử dụng phần sau (cạnh đối diện của TPM giữ) để làm sạch bề mặt trong của đót lọc.

- ISO định rõ nhờ sử dụng 20ml dung dịch chiết trên mỗi miếng đệm Cambridge để phân tích nicotin và nước trong TPM. Phương pháp FTC xác định 10ml trên mỗi miếng đệm Cambridge.

- ISO xác định các tiêu chuẩn trong để xác định sắc ký khí nicotin và nước. Phương pháp FTC không định rõ các tiêu chuẩn trong.

Các khác biệt này thường dẫn đến hiệu suất đo thấp hơn không đáng kể của phương pháp ISO so với phương pháp FTC. Các giá trị xác định giữa các phương pháp FTC và ISO nằm trong giới hạn dò của thử nghiệm hoặc gần như không lớn hơn 0,4mg nhựa và khoảng 0,04mg nicotin đối với thuốc lá mà được tạo ra trên 10mg.

Sự chỉ trích chủ yếu nhất của các phương pháp thử nghiệm bằng máy hút thuốc FTC/ISO ("FTC/ISO Method" hoặc "FTC hoặc ISO Method") là ở chỗ chúng không dự đoán chính xác mức phơi nhiễm của từng người hút thuốc với nhựa, nicotin hoặc cacbon monoxit do hút thuốc riêng biệt (National Cancer Institute Smoking and Tobacco Control Monograph 13, "Risks Associated with Smoking Cigarettes with Low Machine-measured Yields of Tar and Nicotine"). Các phương pháp này thu được các kết quả thử nghiệm trong các điều kiện chuẩn. Tuy nhiên, thói quen hút thuốc của mỗi cá người có thể, và trong hầu hết các trường hợp thay đổi rất nhiều so với cách mà máy chuẩn hút thuốc.

Người hút thuốc có thể bị phơi nhiễm nhựa, nicotin và cacbon monoxit trên mỗi điếu thuốc lá ở các mức độ rất khác nhau (đối với loại nhãn thuốc lá giống hệt nhau) so với các giá trị thu được từ phương pháp FTC/ISO Method tùy thuộc vào các nhân tố khác nhau, bao gồm tần suất hút thuốc và lượng hơi thuốc hít vào của người hút thuốc, khoảng thời gian khói thuốc hít vào được giữ trước, số lượng thuốc lá được hút trong khoảng thời gian xác định, và phần thuốc lá được hút (cách bao xa cho đến phần thuốc lá được hút).

Hai người nghiện thuốc hút cùng một loại thuốc và số lượng thuốc hút một ngày là như nhau không nhất thiết phải phơi nhiễm với cùng một lượng nhựa, nicotin, và cacbon monoxit. Ngoài ra, cá nhân người nghiện thuốc bị phơi nhiễm các mức nhựa, nicotin và cacbon monoxit khác nhau trên mỗi điếu thuốc vào các thời điểm khác nhau. Chẳng hạn, nếu một người nghiện thuốc trên chuyến bay qua Đại tây dương và không hút thuốc trong 8 giờ, ông ấy hoặc cô ấy hầu như sẽ hút liên tiếp và bị phơi nhiễm ở các mức nhựa, nicotin, và cacbon monoxit cao hơn so với mức thuốc lá trung bình mà ông ấy hoặc cô ấy đã sử dụng. Nói cách khác, nếu người nghiện thuốc sử dụng thuốc lá nhiều hơn mức thông thường trong một khoảng thời gian ngắn, thì các điếu thuốc lá tiếp theo có thể được hút ít mạnh mẽ hơn do đó độ phơi nhiễm của người hút thuốc với nhựa, nicotin, và cacbon monoxit ít hơn (trên cơ sở từng điếu thuốc lá) mức trung bình của người nghiện thuốc đó.

Các nhân tố khác, bao gồm stress, tác động bao lâu và người hút thuốc mạnh như thế nào. Stress thường làm tăng mức tiêu thụ nicotin của người hút thuốc (IOM Report p.254).

Thuốc lá đầu lọc có thể được dự kiến để tạo ra lượng nhựa, nicotin, và cacbon monoxit ít hơn theo phương pháp FTC/ISO Method. Điều này có thể đạt được bằng cách giảm các hiệu suất của các phần khối thuốc mỗi lần hút từng hơi. Đã biết rằng có thể thu được thuốc lá có lượng nhựa, nicotin và cacbon monoxit thấp hơn bằng cách kết hợp bất kỳ hoặc nhiều trong các cải biến dưới đây ("Cigarette Design", Lynn T. Kozlowski, et al., NCI Monograph 13, Chapter 2, pg. 15):

- Làm cho đầu lọc hữu hiệu hơn sao cho có thể lọc ra nhiều khói thuốc hơn;
- Sử dụng giấy cuộn thuốc lá có độ xốp cao hơn;
- Đặt hoặc làm tăng số lượng các lỗ thông khí (kể cả làm tăng kích cỡ của chúng) xung quanh nguyên liệu bít-đầu lọc sao cho khi người hút thuốc lá thì nhiều không khí đi vào hỗn hợp khói, nhờ đó làm loãng lượng khói hít vào;
- Làm tăng tốc độ đốt cháy thuốc bằng các phụ gia hoá học trong giấy cuộn thuốc hoặc đầu lọc;
- Sử dụng phần lá thuốc lá hoàn nguyên cao hơn được tạo ra từ các mảnh nhỏ thuốc lá bao gồm cọng và bụi thuốc lá;
- Sử dụng thuốc lá giãn nở, loại này tạo ra lượng nhựa và nicotin trên mỗi điếu thuốc lá giảm do khối lượng toàn bộ lá thuốc lá nhồi đầy điếu thuốc giảm;
- Giảm đường kính của điếu thuốc lá do giảm trọng lượng chất độn; và
- Tăng chiều dài giấy cuộn đầu ngậm điếu thuốc do đó làm thay đổi chiều dài mẫu thuốc còn lại.

Fig.1 đặt các phương pháp này trong một hình phối cảnh có trật tự và thể hiện mức độ giảm thu được ở các hiệu suất nhựa và nicotin.

“Thuốc lá hoàn nguyên” (recon) là phần quan trọng của chất độn thuốc lá được tạo thành từ bụi thuốc lá và nguyên liệu thuốc lá mảnh nhỏ khác, xử lý thành dạng lá và cắt thành các mảnh tương tự với sợi thuốc lá. Ngoài việc tiết kiệm chi phí, sợi thuốc lá hoàn nguyên là rất quan trọng vì sự đóng góp của nó cho vị của điếu thuốc lá do sử dụng hương liệu xử lý nhờ các phản ứng giữa amoniac và đường.

“Thuốc lá giãn nở” là một phần quan trọng khác của chất độn thuốc lá, nó được xử lý nhờ làm giãn nở các khí thích hợp sao cho sợi thuốc lá được “phồng” lên làm giảm mật độ và khả năng nhồi lớn hơn. Nó làm giảm trọng lượng sợi thuốc lá sử dụng trong các điếu thuốc. Có lợi là thuốc lá giãn nở làm giảm lượng nhựa, nicotin và cacbon monoxit và giải quyết được vấn đề sử dụng, chẳng hạn làm cho điếu thuốc lá có lượng nhựa, nicotin, và cacbon monoxit thấp.

Hàm lượng nicotin và, ở mức độ ít hơn, lượng nhựa mà khói thuốc lá tạo ra, còn tùy thuộc vào loại và giống thuốc lá sử dụng để tạo ra thuốc lá. Ba loại thuốc lá thường được sử dụng trong các loại thuốc lá ở Mỹ là loại được sấy bằng không khí nóng, burley và oriental. Trộn các sản phẩm loại được đề cập tới như thuốc lá "pha trộn Mỹ". Nói chung, burley có lượng nicotin cao nhất, tiếp sau là loại được sấy bằng không khí nóng và theo kiểu phương Đông. Hầu hết các giống thuốc lá được xử lý ở 15 phần trăm độ ẩm chứa khoảng một đến ba phần trăm nicotin theo trọng lượng. Hàm lượng alkaloit trong các điếu thuốc lá thành phẩm ít hơn lượng trong lá thuốc lá vừa thu hoạch sử dụng để sản xuất thuốc lá vì các hao hụt xuất hiện trong quá trình xử lý, bảo quản và các quy trình sản xuất.

"Xử lý" là quy trình làm cho chín để giảm độ ẩm và tạo ra sự phá hủy chlorophyl làm cho thuốc lá có màu vàng và bằng cách đó tinh bột được chuyển hoá thành đường. Vì vậy thuốc lá xử lý có hàm lượng đường khử cao hơn và hàm lượng tinh bột thấp hơn so với lá xanh vừa thu hoạch. "Thuốc lá sấy khô bằng không khí nóng" đề cập đến phương pháp làm khô cây thuốc lá trong kho có thông gió bằng nhiệt và khác biệt bởi có màu sắc duy nhất, hàm lượng đường khử cao, các tính chất

hút trung bình đến nặng trong cơ thể và cá biệt là có vị dễ chịu (Bacon, E. W., Wenger, R. & Bullock, J. F. (1952), các thay đổi hoá học ở thuốc lá trong quá trình sấy khô bằng không khí nóng, Ind. Eng. Chem., 44, 292).

Đã biết rằng bằng cách thay đổi loại của bất kỳ thành phần nào của thanh thuốc lá, như được đề cập ở trên - đối với hầu như tất cả các chất độn thuốc lá thương phẩm—các lượng nhựa và nicotin được xác định bằng phương pháp FTC/ISO Method có thể được thay đổi đối với thuốc lá có đầu lọc khoảng từ gần 1mg nhựa và 0,05mg nicotin đến 20mg nhựa và 1,8mg nicotin.

Nếu các điều thuốc lá được tạo ra “nhẹ hơn”, thì các lượng nhựa, nicotin, và cacbon monoxit, như được xác định bằng phương pháp FTC/ISO, được giảm ở các tỷ lệ khác nhau không đáng kể. Tuy nhiên, lượng nhựa và cacbon monoxit không giảm ở bất kỳ tỷ lệ khá lớn nào mà không có sự giảm tương ứng ở lượng nicotin theo tỷ lệ gần tương tự và ngược lại. Thậm chí các lượng nhựa và nicotin theo phương pháp FTC/ISO đã giảm vào cuối các năm 50, "tỷ lệ hiệu suất nhựa-đối với-nicotin" ("TNR") của các điều thuốc lá vẫn hoàn toàn ổn định, như biểu thị trong Fig.1 và Fig.2.

Thuật ngữ "điều thuốc lá" như được sử dụng ở đây được xác định là "thanh" cùng với "chất độn". Phần “thanh” thuốc lá bao gồm giấy cuốn thuốc, đầu lọc, bọc nút (sử dụng để chứa các nguyên liệu lọc), giấy cuốn đầu ngậm điều thuốc lá giữ giấy cuốn thuốc lá (kể cả chất độn) đến đầu lọc, và toàn bộ keo hồ giữ các thành phần này với nhau. Chỉ các thành phần của thanh của “điều thuốc lá không đầu lọc” là gồm giấy cuốn thuốc lá và hồ gắn nó. Phần “chất độn” bao gồm (1) toàn bộ thuốc lá, bao gồm nhưng không chỉ giới hạn ở thuốc lá hoàn nguyên và thuốc lá giã nhỏ, (2) các thành phần thay thế không phải là thuốc lá (bao gồm nhưng không chỉ giới hạn ở cỏ, nguyên liệu thực vật không phải là thuốc lá và các loài khác có thể cùng với thuốc lá cuộn trong giấy cuốn thuốc lá), (3) bao, (4) hương liệu, và (5) tất cả các chất phụ gia khác (được trộn trong sợi thuốc lá và các thành phần thay thế và cuộn thành điều thuốc lá). Thuật ngữ "điều thuốc lá" như được sử dụng ở đây cũng được

xác định là (A) bất kỳ cuộn thuốc lá nào được bọc trong giấy hoặc bất kỳ chất nào khác không chứa sợi thuốc lá, và (B) bất kỳ cuộn thuốc lá nào được bọc trong bất kỳ chất nào chứa sợi thuốc lá đó, vì vẻ bề ngoài của nó, loại thuốc lá được sử dụng làm chất độn, hoặc vỏ bao và nhãn của nó, có thể được đề cập tới, hoặc do người tiêu dùng mua như thuốc lá được mô tả ở phần đoạn dưới (A) (1967 Federal Cigarette Labeling And Advertising Act, U.S. FTC).

Thuật ngữ "thanh thuốc không đầu lọc," "thanh thuốc có hương vị đậm", "thanh thuốc nhẹ" và "thanh thuốc cực nhẹ" như được sử dụng ở đây được xác định tương ứng là điều thuốc lá không đầu lọc trừ chất độn của nó, điều thuốc lá có hương vị đậm trừ đi chất độn của nó, điều thuốc lá nhẹ trừ đi chất độn của nó, và điều thuốc lá cực nhẹ trừ đi chất độn của nó.

Như được sử dụng ở đây, thuật ngữ "tỷ lệ hiệu suất nhựa-đối với-nicotin" hoặc "TNR" của điều thuốc lá được xác định bằng cách chia nhỏ hiệu suất nhựa theo hiệu suất của nicotin, cả hai hiệu suất này được xác định bằng phương pháp FTC hoặc ISO.

Các loại thuốc lá ở Mỹ và hầu hết các nơi trên thế giới là khác nhau bởi các thứ bậc như loại hương vị đậm, loại nhẹ, và loại cực nhẹ. Các dấu hiệu đó thường xuất hiện trên các vỏ bao thuốc lá hoặc quảng cáo. Các thứ bậc này thông báo nồng độ thuốc lá, nó là chức năng của lượng nhựa và nicotin được xác định bằng phương pháp FTC hoặc ISO. Thuốc lá có vị đậm đặc hoặc hương vị mạnh có hiệu suất nhựa và nicotin cao hơn. Các thứ bậc hoặc "nồng độ của thuốc lá thường được công nhận ở Mỹ như bằng phương pháp FTC dưới đây:

- "thuốc lá có hương vị đậm" (15mg hoặc nhiều nhựa hơn trên mỗi điều thuốc lá)
- "thuốc lá nhẹ" (7 đến 14mg nhựa trên mỗi điều thuốc lá)
- "thuốc lá cực nhẹ" (6mg hoặc ít nhựa hơn trên mỗi điều thuốc lá).

Các quyết định của người tiêu dùng về việc có hút thuốc hương vị đậm so với thuốc lá nhẹ hay không chỉ dựa vào các lượng nhựa và nicotin thu được từ phương pháp FTC/ISO là mơ hồ ("Public Understanding of Risk and Reasons for Smoking Low-Yield Products", Neil Weinstein, NCI Monograph 13, Chapter 6). Vì người và máy hút thuốc cảm nhận thuốc khác nhau, nên người tiêu dùng có thể rất hy vọng về thuốc lá được đề cập tới là có lượng nhựa thấp ("Consumer Perception of Cigarette Yields: Is the Message Relevant?", Gio Gori, Regulatory Toxicology and Pharmacology volume 12, 64-68 1990). Người hút thuốc sẽ không nhầm lẫn tin rằng chuyển từ thuốc lá hương vị đậm (thuốc lá Marlborot® hương vị đậm tạo ra 15mg nhựa và 1,1mg nicotin) sang thuốc lá nhẹ (Marlboro® nhẹ có hiệu suất 11mg nhựa và 0,8mg nicotin) sẽ là tất yếu để giảm các nguy cơ có liên quan đến hút thuốc.

Khi người hút thuốc lá nhẹ được so với người hút thuốc lá có hương vị đậm (và người hút thuốc lá cực nhẹ so với người hút thuốc lá nhẹ và người hút thuốc lá cực nhẹ so với người hút thuốc lá có hương vị đậm), và/hoặc nếu từng cá nhân hút thuốc mà thường hút thuốc lá có hương vị đậm hoặc thuốc lá nhẹ chuyển sang hút thuốc lá có hiệu suất giảm, hoặc đôi khi hút thuốc lá có hiệu suất giảm, thì một số hoặc tất cả các thói quen hút thuốc dưới đây có thể xuất hiện trong một chừng mực nào đó:

- Nhiều hơi thuốc lá ngắn được hút hơn trên mỗi điếu thuốc;
- Các hơi thuốc lá ngắn riêng hoặc lượng hơi thuốc lá lớn hơn (ví dụ, 55ml khói có thể được hút so với 35ml);
- Sự thay đổi về khoảng thời gian của các hơi thuốc lá ngắn riêng biệt (ví dụ, 4 giây so với 2 giây), vì vậy tạo ra nhiệt độ hình nón nóng hơn, nó có liên quan đến tính gây đột biến của khói tăng*;
- Giữ khói thuốc ở phổi trong khoảng thời gian dài hơn trước khi thở ra;
- Hít vào phổi sâu hơn;

- Những người hút thuốc lá loại nhẹ có thể chặn các lỗ thông đầu lọc bằng các ngón tay và môi; và

- Hút nhiều thuốc lá hơn trong khoảng thời gian nhất định

*("Hiệu quả của nhiệt độ nhiệt phân đối với tính gây đột biến của phần khói thuốc lá ngưng tụ", White, J. L., et al., Food and Chemical Toxicology 39, pg. 499-505 (2001)). Như nêu trong IOM Report: "Để duy trì lượng nicotin lấy vào mong muốn, nhiều người hút thuốc đổi sang các sản phẩm hiệu suất thấp ngoài ra còn thay đổi cả cách họ đã hút theo cách đã mô tả trước đó. Vì vậy, độ phơi nhiễm của họ với độc tố của thuốc lá cao hơn được dự đoán bằng các thử nghiệm chuẩn và những người vẫn tiếp tục sử dụng các sản phẩm đó không giảm đáng kể nguy cơ mắc bệnh của họ nhờ chuyển đổi chúng" (IOM Report p. 2).

Các khác biệt ở thói quen hút thuốc được quan sát trong số những người hút thuốc lá hương vị đậm, nhẹ, và thuốc lá cực nhẹ được gọi chung là "sự đền bù" ("Compensatory Smoking of Low Yield Cigarettes", Neal Benowitz, NCI Monograph 13). "Đền bù" là hút thuốc mạnh mẽ hơn do lượng nicotin có mặt trong khói thuốc lá giảm. Người hút thuốc bù lại bằng cách hút thuốc lá có hiệu suất thấp hơn (so với thuốc lá có hiệu suất cao hơn) mạnh hơn để đạt được tác động nicotin mong muốn của họ và cảm giác khói thuốc ở miệng, đó là các đặc tính cảm giác quan trọng (Jed E. Rose, "The role of upper airway stimulation in smoking, "Nicotine Replacement: A Critical Evaluation, p95-106, 1988).

Nhóm Wilcox đã kết luận rằng những người hút thuốc chuyển sang hút thuốc có lượng nhựa và nicotin thấp bù lại bằng cách tăng lượng thuốc lá tiêu thụ mỗi ngày so với nhóm đối chứng. Thông số thu được từ bốn nhóm thất bại khi thể hiện lợi ích đáng kể theo thống kê đối với thuốc lá có lượng nhựa thấp dưới dạng nguy cơ ung thư phổi, thậm chí giữa các mức hút khác nhau (Tang et al., 1995b), như đã nghiên cứu ở nhóm khác lớn hơn (Sidney et al., 1993). Lee and Garfinkel cung cấp một bảng tóm tắt về nguy cơ ung thư phổi và loại thuốc lá đã hút (Lee and

Garfinkel, 1981) đã không thể chứng minh được việc giảm đáng kể nguy cơ gây bệnh dựa vào hàm lượng nhựa (IOM Report p. 401). Số lượng ung thư tuyến gia tăng gần đây vì sự thông gió kém của những người hút thuốc được giả thuyết là do hút bù bằng những sản phẩm hiệu suất thấp. Người hút các sản phẩm đó hít khói thuốc lá vào sâu hơn làm gia tăng liều lượng nicotin của họ (IOM Report p. 285).

Cho nên, người tiêu dùng trong ba thập kỷ qua có xu hướng hướng tới thuốc lá “nhẹ hơn” có thể không có lợi cho sức khỏe người nghiện thuốc. Nói chung, bằng cách bù lại, người hút thuốc lá nhẹ hút vào lượng nhựa và nicotin đúng bằng những người hút thuốc lá hương vị đậm. Tất nhiên, thuốc lá nhẹ có vị khác nhiều với thuốc lá hương vị đậm và sự khác biệt về vị đó thường là lý do tại sao hầu hết người nghiện thuốc chọn các loại nhãn thuốc mà họ hút. Tuy nhiên, riêng ở Mỹ, hàng triệu người đang hút thuốc lá nhẹ và cực nhẹ là người đã hút thuốc có hiệu suất cao hơn chuyển sang.

Fig.2 thể hiện các lượng nhựa và nicotin từ phương pháp FTC Method đối với một số loại nhãn hiệu thuốc ở Mỹ. "(Các) loại nhãn" là các kiểu hoặc loại thuốc lá khác nhau trong một họ nhãn (ví dụ, thùng loại lớn thuốc lá đầu lọc Marlboro® cực nhẹ). Fig.2 cũng thể hiện TNRs thu được của các loại nhãn đó. Dù các loại thuốc lá có kích cỡ lớn (thường dài 85mm), 100's (dài 100mm), hương vị đậm, nhẹ, hoặc cực nhẹ, thì TNRs thu được của chúng cũng gần tương đối giá trị. Thuốc lá cực nhẹ có xu hướng có TNRs thấp hơn một chút, chủ yếu vì thực tế là sự thông gió thêm vào ở loại thuốc lá này làm giảm hiệu suất (từ phương pháp FTC/ISO Method) của nhựa ở tỷ lệ cao hơn không đáng kể với nicotin. TNR trung bình đơn giản của Fig.2 là 14,22.

Hiệu suất nhựa và nicotin trung bình có tác dụng mong muốn trong báo cáo FTC 1998 là 12,0mg nhựa và 0,88mg nicotin, nó tạo ra TNR là 13,64. Fig.1 thể hiện rằng vào năm 1950 TNR trung bình là khoảng 14,44 (khoảng 39mg

nhựa/2,7mg nicotin). Các số này chứng tỏ rằng TNRs trung bình của thuốc lá Mỹ từ khoảng năm 1950 đến nay khá ổn định.

Báo cáo 1998 FTC Report công bố vào năm 2000, bao gồm các loại thuốc lá của năm 1998, và năm cuối mà FTC quyết định đưa ra công khai các hiệu suất nhựa, nicotin và cacbon monoxit của thuốc lá. Trong số 1294 loại nhãn thuốc lá được đánh giá, chỉ có 3 loại có TNR được xác định dưới 8. Thực tế, toàn bộ chỉ có 8 loại nhãn thuốc lá được xác định có TNRs nhỏ hơn 10. Bao gồm 1 Rothmans®, 3 Canadian Players®, 2 Old Gold®, 1 Now®, và 1 Carlton®. Trong khi chỉ các số lượng nhựa, nicotin và cacbon monoxit được nêu trong báo cáo, TNRs có thể dễ dàng được xác định từ các số lượng đó bằng cách chia hiệu suất của nhựa theo hiệu suất của nicotin. Hai loại nhãn thuốc Carlton® có hiệu suất <0,5 nhựa và 0,1 nicotin. Do các số lượng nguyên chất thực tế của nhựa không thể xác định được và vì có ảnh hưởng lớn do làm tròn ở các mức đó, nên số lượng của hai loại nhãn thuốc lá đó dường như không được phản ánh trong giải pháp đã biết.

2 trong số 3 loại thuốc lá có TNR's nhỏ hơn 8 (gói thuốc lá đầu lọc mềm Carlton® 100 và gói thuốc lá đầu lọc mềm Now®) được nêu trong 1998 FTC Report tạo ra 1mg nhựa và 0,2mg nicotin, nhờ đó có TNR là 5. Tuy nhiên, TNRs của 2 loại thuốc lá đó phần lớn là do tính chất của các số nhỏ làm tròn. Từ báo cáo 1998 FTC, "Lượng nhựa và cacbon monoxit được làm tròn gần như đến miligam (mg.); lượng bằng 0,5mg hoặc lớn hơn được làm tròn lên, trong khi lượng bằng 0,4mg hoặc nhỏ hơn được làm tròn xuống. Các số liệu về nicotin được làm tròn đến gần một phần mười miligam. Lượng bằng 0,05mg hoặc lớn hơn được làm tròn lên; lượng bằng 0,04mg hoặc nhỏ hơn được làm tròn xuống". Do đó, thuốc lá cực nhẹ có lượng nhựa là 1,4mg và nicotin là 0,15mg sẽ được đề cập tới là 1mg nhựa và 0,2mg nicotin (TNR là 5), cho dù TNR trên thực tế bằng 9,33. Thuốc lá có lượng nhựa là 1mg và 0,1mg nicotin có sự chấp nhận của khách hàng ít hơn do hút thuốc nhẹ hơn (thiếu vị) và chịu được sự hít vào quá nhiều. Vào năm 2000, thị phần các loại thuốc lá có hiệu suất nhựa là 1-3mg theo phương pháp FTC chỉ có thị phần ở Mỹ là 1,3

phần trăm. Chín hai phần trăm các loại thuốc lá có hiệu suất nhựa là 3mg hoặc lượng nhựa ít hơn in lượng nhựa và nicotin theo phương pháp FTC của chúng trên các bao gói của chúng. Điều này trái với các loại thuốc lá có lượng nhựa là 12mg hoặc nhiều hơn, trong đó chỉ 0,1 của một phần trăm in lượng nhựa và nicotin theo phương pháp FTC của chúng trên các bao gói của chúng (FTC Cigarette Report for 2000, 2002, p. 15).

Chúng có khác là phương pháp làm tròn của FTC chịu trách nhiệm về TNRs bằng 5 của hai loại thuốc lá trong báo cáo 1998 FTC Report và dường như không được phản ánh chính xác trong giải pháp đã biết đó là kiểu bao gói cứng của loại thuốc đầu lọc bao gói mềm Carlton® 100 đưa ra lượng nhựa bằng 1mg và nicotin bằng 0,1mg (TNR=10). Có thể suy ra rằng số lượng "0,2"mg nicotin được làm tròn của loại bao gói mềm thực tế gần với dạng số lượng chưa làm tròn 0,15mg nicotin. Cũng vậy, loại menthol của thuốc đầu lọc bao gói mềm Now® có lượng nhựa đưa ra là 1mg và nicotin là 0,1, thì cũng có nghĩa là số lượng "0,2"mg nicotin được làm tròn của loại menthol hầu như gần với dạng số lượng chưa làm tròn 0,15mg nicotin. Ngoài ra, loại thuốc Carlton® chuẩn (thuốc đầu lọc bao gói mềm 100) được nêu trong các báo cáo FTC năm 2000, 2001, và 2002 có lượng nhựa là 1mg và nicotin là 0,1mg (TNR=10), chứ không phải là 1mg nhựa và 0,2mg nicotin (TNR=5) như nêu trong báo cáo FTC 1998.

10 loại trong số 12 loại thuốc lá (ngoài lượng tổng 1294) có lượng nhựa là 1mg cũng có lượng nicotin là 0,1mg (TNR=10). 2 loại khác được đề cập ở trên (loại thuốc đầu lọc bao gói mềm Carlton® 100 và loại thuốc đầu lọc gói to mềm Now®). Phương pháp làm tròn của FTC đối với phần nhựa có thể, và hầu như góp phần vào việc làm giảm TNRs của hai loại thuốc lá có hiệu suất rất thấp đó. Có khả năng là các nhà sản xuất nhằm tăng các lượng của các loại thuốc lá 1mg nhựa đến khoảng 1,4 mg nhựa và 0,14mg nicotin, nó tương xứng để có thể quảng cáo mức 1mg nhựa trên bao bì của thuốc lá và các lý do vị bị từ chối vì có hiệu suất thực tế của thuốc (không làm tròn) là 1mg nhựa hoặc thấp hơn. Điều đó là lý do tại sao các loại thuốc

lá cực kỳ giống nhau (thuốc lá bao gói cứng như tương phản với thuốc lá bao gói mềm và thuốc lá tương phản với thuốc lá không menthol) dù theo cách này hoặc cách khác (có $TNR=5$ so với 10) do làm tròn. Vì vậy, hai loại thuốc lá đó dường như không được phản ánh trong giải pháp đã biết.

Loại thuốc lá thứ ba có TNR nhỏ hơn 8 trong báo cáo 1998 FTC là loại thuốc lá không đầu lọc bao gói cứng Old Gold®, có $TNR=5,55$ (10mg nhựa và 1,8mg nicotin). Danh sách này đối với loại thuốc lá không đầu lọc dường như không đúng. Có 72 loại thuốc lá không đầu lọc được nêu trong báo cáo 1998 FTC. TNR s thấp nhất của các loại đó, sau loại thuốc lá không đầu lọc bao gói cứng Old Gold®, là loại thuốc lá không đầu lọc, bao gói cứng English Ovals®, có $TNR=13$ (26mg nhựa và 2,0mg nicotin). Trên thực tế, lượng nhựa thấp nhất của nhóm không đầu lọc gồm 72 loại đó, bên cạnh loại thuốc lá không đầu lọc bao gói cứng Old Gold®, là loại thuốc lá không đầu lọc bao gói cứng hương vị đậm, chuẩn Picayune®. Lượng nhựa của loại thuốc lá này là 18mg nhựa và 1,2mg nicotin ($TNR=15$).

Do quyền tự do yêu cầu thông tin với FTC, vào tháng 10, 2003 FTC đã đưa ra các báo cáo tương tự của các năm 1999-2002. Loại thuốc lá không đầu lọc bao gói cứng Old Gold® không có trong bất kỳ loại nào của các báo cáo FTC trong bốn năm đó hoặc trong báo cáo năm 1997 FTC. Chỉ loại thuốc lá không đầu lọc bao gói cứng Old Gold® được nêu trong năm báo cáo FTC (1997, 1999, 2000, 2001 và 2002) là loại thuốc lá không đầu lọc bao gói mềm Old Gold®, có các lượng nhựa là 25mg và nicotin là 1,8mg ($TNR=13,8$) vào năm 1997, 26mg nhựa và 1,9mg nicotin ($TNR=13,68$) vào năm 1999, 27mg nhựa và 1,9mg nicotin ($TNR=14,2$) vào năm 2000, 27mg nhựa và 2,0mg nicotin ($TNR=13,5$) vào năm 2001. Không có lý do nào cho loại thuốc lá không đầu lọc bao gói mềm có các lượng nhựa về cơ bản khác (hoặc thậm chí không đáng kể) hẳn loại thuốc lá bao gói cứng. Không có các loại Old Gold® được nêu trong báo cáo 2002 FTC.

Đối với báo cáo 2002 FTC Report, chỉ có bốn loại thuốc lá dưới đây, trong số 1250 loại, có TNRs tính toán nhỏ hơn 8:

- Thuốc lá đầu lọc gói to Merit® cuối cùng: 1mg nhựa, 0,2 nicotin (TNR=5);
- Thuốc lá đầu lọc menthol bao gói to mềm, cực nhẹ Now® :1mg nhựa, 0,2nicotin (TNR=5);
- Thuốc lá đầu lọc bao gói to mềm, cực nhẹ Now®: 1mg nhựa, 0,2 nicotin (TNR=5);
- Thuốc lá đầu lọc bao gói mềm, cực nhẹ Now® 100: 2mg nhựa, 0,3 nicotin (TNR=6,66).

Cũng có một loại thuốc lá giống chính xác khác được nêu như thuốc lá đầu lọc gói to Merit cuối cùng, còn loại này có lượng nhựa là 1mg và nicotin 0,1mg (TNR=10). Được cho rằng TNRs thấp của các loại thuốc lá đó là như bởi vì các lý do tương tự như nêu trong báo cáo 1998 FTC, và dường như không được phản ánh chính xác trong giải pháp đã biết. Chỉ tổng số 5 loại thuốc lá (trong số 1250) có TNRs được xác định lớn hơn 8 và nhỏ hơn 10 trong báo cáo 2002 FTC. Chúng bao gồm 3 loại Canadian Players®, 1 loại Carlton®, và 1 loại Merit® khác.

Xu hướng mới đây về thuốc lá PREPs là giảm có chọn lọc carcinogen trong khói thuốc lá. Hai loại thuốc lá PREPs mới được giới thiệu ở Mỹ: Advance®, do Brown & Williamson Tobacco Company sản xuất, và Omni®, do Vector Tobacco, Inc sản xuất. Advance® đạt được các mức nitrosamin riêng trong sợi thuốc lá giảm (TSNAs) bằng các công nghệ xử lý lá thuốc lá kết hợp với công nghệ lọc đặc hiệu đã được cấp bằng patent (Xem các patent Mỹ No: 5.803.081, 5.845.647, 6.135.121, 6.202.649, 6.311.695, 6.338.348, 6.350.479, 6.425.401, RE38.123, và 6.569.470) và đang xem xét cấp patent (Xem công bố các đơn Mỹ No 20020174874 và 20030018997).

Omni® giảm lượng hydrocacbon thơm đa vòng (PAHs), TSNA, và catechol nhờ sử dụng hệ xúc tác paladi (Xem công bố U.S. No. 20030000538) thêm vào đầu lọc và lọc bằng than hoạt tính. Thuốc lá Omni®, loại gói to hương vị đậm có 15mg nhựa và 1,0mg nicotin (TNR=15). Thuốc lá loại nhẹ bao lớn Advance® có 10mg nhựa và 8mg nicotin (TNR=12,5).

Vấn đề khó xử lý chủ yếu để tạo ra PREP là các nghiên cứu lâm sàng hàng năm có thể cần nắm được các nguy cơ giảm bớt, nếu có, của PREP so với các loại thuốc lá thông thường. Điều này là đặc biệt chính xác vì PREPs, tương tự với Advanced® và Omni® không làm giảm toàn bộ lượng khói thuốc mà chỉ giảm một số hoá chất trong khói thuốc.

Các hydrocacbon thơm đa vòng (PAHs) là do sự đốt cháy không hoàn toàn các lipid và terpen tự nhiên trong sợi thuốc lá. Cộng đồng khoa học coi các hợp chất đó là các carxinogen mạnh trong khói thuốc lá. Các nitrosamin riêng trong sợi thuốc lá được tạo ra trong quá trình xử lý sợi thuốc lá và trong quá trình hút (Hoffman, D., Dong, M., & Hecht, S. S. (1977), Origin in tobacco smoke of N-nitrosornicotine, a tobacco-specific carcinogen. Brief communication, J. Natl. Cancer Inst., 58, 1841-4). Các hợp chất đó cũng được coi là các carxinogen mạnh. TSNA được tạo thành bằng phản ứng giữa chất nitrosat hoá và các alkaloid tự nhiên trong sợi thuốc lá và cũng là các tác nhân gây ung thư trong khói thuốc lá. (Công bố đơn U.S. No. 20040144397).

Ngay cả khi giảm các tác nhân gây ung thư mạnh đó, thì nhiều tác nhân gây ung thư khác trong khói thuốc lá vẫn tồn tại, các công nghệ đó không được quan tâm. Ngoài ra, nhiều hợp chất khác có thể không gây ra ung thư nhưng có hại tới các mặt khác của sức khoẻ con người, như các bệnh tim mạch và bệnh đường hô hấp, không bị giảm bớt.

Eclipse® và Accord® làm cho người hút thuốc cảm thấy có thể chấp nhận gần như hút điếu thuốc lá thông thường nhưng với sự đốt cháy tối thiểu hoặc không đốt cháy sợi thuốc lá (nhiệt phân). Lợi ích mong muốn của các sản phẩm đó là làm giảm đáng kể sự hình thành các hợp chất sinh ra từ quá trình đốt cháy sợi thuốc lá trong các điếu lá thông thường. Các hợp chất đó thường được thừa nhận là có hại cho người hút thuốc. Vì hai loại thuốc lá đó không được hút như các loại thuốc lá thông thường nên chúng không được thực sự chấp nhận ở thị trường.

Trải nghiệm hút thuốc ở cả hai loại sản phẩm đó dựa vào các khái niệm dưới đây. Sol khí khói thuốc ở cả hai sản phẩm được tạo ra bằng cách gia nhiệt các nguyên liệu thuốc lá chứa hàm lượng glyxerin cao thay vì đốt cháy sợi thuốc lá. Glyxerin khi được gia nhiệt, bốc hơi nhanh, tạo ra sol khí có thể hít vào rất giống với sự xuất hiện và tạo cảm giác như khói thuốc lá. Ngoài ra, việc gia nhiệt các nguyên liệu thuốc lá chứa trong các sản phẩm có sẽ giải phóng các hương liệu dễ bay hơi gốc của sợi thuốc lá cũng như nicotin. Bất kỳ hương liệu dễ bay hơi nào được bổ sung vào sợi thuốc lá có thể cũng được giải phóng vào sol khí khói thuốc.

Eclipse® và Accord® sử dụng các phương pháp khác nhau để gia nhiệt cho các nguyên liệu thuốc lá chứa trong các sản phẩm tương ứng của chúng. Accord® dựa vào thiết bị đã biết như bật lửa chứa bộ pin, sơ đồ điện và các bộ phát nhiệt sẽ tạo nhiệt cho điếu thuốc lá gắn trong thiết bị. Nó được thiết kế kiểu như thế để phân chia sáu hơi thuốc lá ngấm từ mỗi điếu thuốc gắn trong thiết bị. Các điếu thuốc lá được chế tạo đặc biệt cho thiết bị này phải được sử dụng với năng suất thích hợp.

Eclipse® dựa vào đầu ngấm cacbon dễ cháy là, khi đốt cháy, sẽ cung cấp nguồn nhiệt để tạo ra sol khí khói thuốc từ các nguyên liệu thuốc lá chứa trong sản phẩm. Sản phẩm Eclipse® có vẻ ngoài tương tự với thuốc lá thông thường, ngoại trừ là nó không phá huỷ tàn thuốc như so với thuốc lá thông thường.

Cả hai loại sản phẩm đó được đem thử nghiệm khi thử xác định lượng nhựa và nicotin bằng phương pháp FTC. Quá trình xác định chiều dài mẫu thuốc lá là vô nghĩa với cả hai sản phẩm khi nó được hút từng hơi ngắn. Số lượng hơi thuốc lá đối với từng sản phẩm bị giới hạn bởi bản chất thiết kế của chúng. Với Eclipse® số lượng hơi thuốc lá được điều chỉnh bởi nguồn nhiệt cacbon. Accord® bị giới hạn bằng điện tử ở sáu hơi. Cuối cùng, Accord® không "nhẹ" như được mô tả bằng phương pháp FTC.

Đã biết rằng *Nicotiana rustica* là cao trong hàm lượng nicotin mà thường không được cải biến, có thể lai với *Nicotiana tabacum* để tạo ra thực vật mới (Wernsman, E. A., et al., Principles of Cultivar Development, Volume 2, Crop Species, Ed. W. R. Fehr, Macmillan, New York 1987). Thuốc lá Y-1, ban đầu và một phần được phát triển bởi U.S. Department of Agriculture, là một ví dụ về sự lai chéo này. Tuy nhiên, giống này phải trải qua nhiều năm để tạo ra thuốc lá có lượng nicotin tăng như vậy bằng cách chuyển gen. Các tiện lợi khác của việc tạo ra thuốc lá có lượng nicotin tăng bằng cách chuyển gen so với kỹ thuật lai thực vật là các quy trình chuyển gen đó có thể được tiến hành với bất kỳ loại thuốc lá thương phẩm nào (được sấy bằng không khí nóng, burley, và theo kiểu phương Đông) hoặc cây thuốc lá (hoặc loại) thuốc lá, nhờ đó giữ được phần rất lớn các tính trạng của dòng thuốc lá gốc trước khi cải biến gen. Các đặc tính thương phẩm mong muốn của loại *N.tabacum* sẽ bị ảnh hưởng xấu khi nó được lai chéo với *N.rustica*.

Fig.3 biểu thị rằng chỉ 36,4 phần trăm số người chết có liên quan đến hút thuốc ở Mỹ là do ung thư gây ra, chưa có nhận thức chung nào rằng ung thư là tác động bất lợi nhất cho sức khỏe của việc hút thuốc. Thực tế, các bệnh tim mạch gây ra 42,4 phần trăm và các bệnh hô hấp gây ra 21,2 phần trăm số người chết đó. Các nghiên cứu bệnh dịch thể hiện sự giảm đáng kể nguy cơ khi lượng khói thuốc tổng hít vào giảm (U.S. Surgeon General, 1964, 1979, 1989). Vì không biết nó gồm nhiều độc tố gây ra các tác động có hại đặc biệt, sẽ là có lợi khi giảm toàn bộ các lượng

khói thuốc lá cho người hút thuốc để tạo ra PREP hữu hiệu-không chỉ một chút ít các thành phần khói là carxinogen.

Báo cáo IOM kết luận rằng "Nicotin là một trong các nhân tố chủ yếu tạo ra thành công của sản phẩm thuốc lá" (p. 29). Vì vậy, giữ được nicotin ở các mức thú vị, trong khi giảm được nhiều hơn các thành phần độc tố của thuốc lá, sẽ là một cách chung khác để giảm thiệt hại (IOM Report p. 29). Bằng cách giảm toàn bộ liều lượng khói thuốc được hít vào từ mỗi điếu thuốc và/hoặc giảm số lượng điếu thuốc lá hút mỗi ngày, tất cả carxinogen và các khí có hại sẽ được giảm tới các tỷ lệ tương tự. Cách hữu hiệu nhất để đạt được các mức giảm ở toàn bộ lượng khói thuốc lá, căn cứ vào xu hướng của người nghiện thuốc là hút bù, để giảm TNR của các điếu thuốc lá. Với các điếu thuốc lá có TNR giảm, mức trên mỗi hơi thuốc lá của toàn bộ lượng khói thuốc lá mà người hút thuốc hít vào, bao gồm nhựa và cacbon monoxit, sẽ giảm ở nhiều trường hợp trong khi giữ được mức nicotin cần thiết của người hút thuốc.

Theo chứng cứ nghiên cứu bệnh học, nguy hiểm liên quan trực hệ tới lượng thuốc đã hút. Bằng chứng của liều lượng giảm phải là cơ sở để điều chỉnh thuốc lá bớt nguy hiểm hơn (Gori, 2002 Coresta Congress). "Mối quan hệ đáp ứng-liều lượng" được xác định là mối quan hệ giữa sự thoái triển nguy cơ-bệnh và thoái triển phơi nhiễm (ví dụ, liều càng cao thì tỷ lệ mắc bệnh càng lớn). "Thông số hiện có cho phép đánh giá, mặc dù không chính xác, mối quan hệ đáp ứng lại liều lượng giữa phơi nhiễm với toàn bộ lượng khói thuốc lá và các bệnh chủ yếu có thể được kiểm tra để đánh giá khả năng giảm tác hại" (p.9, IOM Report). Vì mối quan hệ đáp ứng-liều lượng hiện đang tồn tại cho toàn bộ lượng khói thuốc lá, nên các lợi ích của thuốc lá có TNR thấp có thể giảm toàn bộ lượng khói thuốc mà người hút thuốc hít vào có thể ngay lập tức được đánh giá và xác nhận bởi những tổ chức kiểm soát sức khỏe cộng đồng như U.S. Food and Drug Administration (FDA).

Theo Fig.2, nếu lượng nhựa theo phương pháp FTC Method của các bao thuốc lá to hương vị đậm Marlboro® là 15mg được so với lượng nhựa theo phương pháp FTC Method của các bao thuốc lá to loại nhẹ Marlboro® là 11mg, sau đó quá trình giảm 4mg nhựa được nhận thấy. Sức mạnh này, nhìn bề ngoài, chứng tỏ rằng người hút thuốc sẽ hít vào ít hơn 4mg nhựa bằng cách chuyển sang hút sản phẩm nhẹ. Tuy nhiên, các giá trị TNR tương ứng là 13,64 và 13,75, thể hiện không có sự cải thiện về mặt lượng nhựa hít vào trên mỗi mg nicotin của từng điếu thuốc lá khi chuyển sang hút sản phẩm khác. Vì quá trình đền bù có thể xuất hiện khi chuyển từ thuốc lá hương vị đậm sang thuốc lá nhẹ hoặc cực nhẹ và từ thuốc lá nhẹ sang thuốc lá cực nhẹ, các giá trị TNR có thể cung cấp sự tương ứng chính xác hơn của lượng khói thuốc đúng của loại thuốc lá đối với thói quen hút thuốc của con người.

Đã biết rõ rằng các động cơ thúc đẩy người hút thuốc bao gồm nhiều nhân tố như vị giác, khả năng cảm giác, động cơ cư xử, trong đó phần thưởng được lý của nicotin là quan trọng nhất hơn rất nhiều. Ngoại trừ thuốc lá quá nhẹ, nói chung người hút thuốc có thể kiểm soát để sử dụng trung bình 1mg nicotin (trên mỗi điếu thuốc lá) của thuốc lá thuốc bất kỳ loại nào, bất kể các hiệu suất của máy dựa vào máy hút thuốc chuẩn FTC (Gori, pg. 3 *Virtually Safe Cigarettes-Reviving an Opportunity Once Tragically Rejected*, 2000). "Mức nicotin cao nhất mà người hút thuốc hít vào là khoảng 2mg trên mỗi điếu thuốc lá. Số lượng các hơi thuốc lá trên mỗi điếu thuốc lá trung bình là khoảng 8. Vì vậy lượng cao nhất là 250 microgam trên mỗi hơi thuốc lá sẽ đủ để thỏa mãn nhu cầu tối đa, mặc dù thường người nghiện thuốc sẽ hút và hít vào ít hơn lượng tối đa này" (Gori, Gio, *Less Hazardous Cigarettes*, Tobacco Reporter, p.31, June, 2004).

Trong bài báo British Medical Journal (BMJ, 1976 volume 1, pp. 1430-1433) và lần nữa vào năm 1980 Banbury Report (#3 A Safe Cigarette, pp. 297-310), Michael Russell đã ủng hộ thuốc lá có lượng nhựa thấp, nicotin trung bình và cacbon monoxit thấp là sự lựa chọn an toàn đối với thuốc lá có trên thị trường vào thời điểm đó. Xem xét nghiên cứu về công nghiệp thuốc lá German từ các tài liệu

trên Internet chứng tỏ rằng các nhà khoa học muốn thuốc lá an toàn sẽ có tỷ lệ nicotin lớn hơn nhiều so với nhựa (TNR thấp hơn) (Tobacco Control 2000; 9: 242-248, pg. 4).

Thuốc lá có độ phơi nhiễm giảm mong muốn phải đem lại lượng nicotin mong muốn của người hút thuốc trên mỗi điếu thuốc lá dễ dàng và có hiệu quả đến mức có thể trong khi vẫn duy trì được vị có thể chấp nhận được. Thực tế, "quá trình bù ngược lại" có thể xuất hiện trong một số tình huống với các loại thuốc lá có TNR thấp, vì người hút thuốc hít vào lượng khói thuốc tổng ít hơn trong khi có được lượng nicotin thoả mãn. "Quá trình bù ngược lại" được xác định là hút ít mạnh hơn do lượng nicotin có mặt trong khói thuốc lá tăng lên.

Thuốc lá có TNR thấp cũng sẽ có lợi cho người không hút thuốc. Bằng cách đem lại lượng nicotin hữu hiệu hơn cho người hút thuốc, lượng thuốc lá mỗi ngày có thể được hút ít hơn và mỗi điếu thuốc lá có thể được hút ít hơn, nó sẽ tạo ra luồng khói phụ ít hơn (lượng khói sinh ra từ mẫu cháy còn lại của điếu thuốc, phần lớn giữa các hơi thuốc lá) và khói thuốc trong môi trường ít hơn (khói thuốc có trong không khí, bao gồm luồng khói chính và phụ toả ra). Luồng khói chính (toàn bộ luồng khói thuốc lá chính) là luồng khói xuất hiện từ "miệng" (người hút) hoặc đầu mẫu thuốc lá còn lại (đầu lọc) của điếu thuốc lá đã hút (IOM Report p. 283).

Vì vậy, cần đến loại thuốc lá có TNR thấp có thể đem lại tác dụng của nicotin với sinh lý hữu hiệu hơn mà không có nhựa và các khí có hại.

Bản chất kỹ thuật của sáng chế

Sáng chế đề xuất thuốc lá bao gồm phần thực vật hoặc thực vật chuyển gen chứa nicotin tăng của loài thuộc giống *Nicotiana* và có tỷ lệ hiệu suất nhựa-đối với-nicotin (TNR) nằm trong khoảng 3 và 8, như được xác định bằng phương pháp FTC hoặc ISO. Phần thực vật hoặc thực vật chuyển gen chứa nicotin tăng có lượng nicotin tăng khi so sánh với phần thực vật hoặc thực vật giống gốc không biến nạp

mà từ đó phần thực vật hoặc thực vật chuyển gen được tạo ra và chứa và biểu hiện ít nhất một axit nucleic không tương đồng làm tăng sự điều chỉnh quá trình tạo ra nicotin trong thực vật hoặc phần thực vật chuyển gen. Phần thực vật hoặc thực vật chuyển gen chứa nicotin tăng, khi so sánh với phần thực vật hoặc thực vật đối chứng không biến nạp, chứa và biểu hiện ADN không tương đồng mã hoá ít nhất một đoạn của enzym cần thiết để tổng hợp sinh học nicotin trong sợi thuốc lá, thực vật hoặc phần thực vật chuyển gen này có các mức enzym tăng khi so sánh với phần thực vật hoặc thực vật đối chứng không biến nạp và hàm lượng nicotin tăng khi so sánh với phần thực vật hoặc thực vật đối chứng không biến nạp.

Enzym có thể được chọn từ nhóm gồm có arginin decarboxylaza (ADC), methylputresxin oxidaza (MPO), NADH dehydrogenaza, ornithin decarboxylaza (ODC), phosphoribosylantranilat isomeraza (PRAI), putresxin N-methyltransferaza (PMT), quinolat phosphoribosyl transferaza (QPT), và S-adenosyl-metionin synthetaza (SAMS). Loài thực vật này có thể là *Nicotiana tabacum*.

Thuốc lá có thể có hiệu suất khoảng 1mg nhựa và nằm trong khoảng 0,12mg và 0,34mg nicotin, khoảng 2mg nhựa và nằm trong khoảng 0,25mg và 0,68mg nicotin, khoảng 3mg nhựa và nằm trong khoảng 0,36mg và 1,0mg nicotin, khoảng 4mg nhựa và nằm trong khoảng 0,5mg và 1,36mg nicotin, khoảng 5mg nhựa và nằm trong khoảng 0,62mg và 1,7mg nicotin, khoảng 6mg nhựa và nằm trong khoảng 0,75mg và 2,0mg nicotin, khoảng 7mg nhựa và nằm trong khoảng 0,87mg và 2,33mg nicotin, và khoảng 8mg nhựa và nằm trong khoảng 1,0mg và 2,66mg nicotin. Sáng chế cũng bao gồm thuốc lá chứa phần thực vật hoặc thực vật chuyển gen chứa nicotin tăng của loài thuộc giống *Nicotiana*.

Sáng chế cũng đề cập đến phương pháp tạo ra thuốc lá bao gồm cung cấp phần thực vật hoặc thực vật chuyển gen chứa alkaloid tăng, khi so sánh với phần thực vật hoặc thực vật đối chứng không biến nạp, của loài thuộc giống *Nicotiana*,

lai chéo thực vật với thực vật thuộc loài *Nicotiana tabacum* để thu được thực vật thế hệ con, và tạo ra thuốc lá chứa thực vật thế hệ con. Thuốc lá có thể có tỷ lệ hiệu suất nhựa-đối với-nicotin nằm trong khoảng 3 và 8, như được xác định bằng phương pháp FTC hoặc ISO.

Sáng chế cũng đề cập đến phương pháp tạo ra thuốc lá bao gồm cung cấp phần thực vật hoặc thực vật chuyển gen *Nicotiana tabacum* chứa nicotin giảm có lượng nicotin giảm khi so sánh với phần thực vật hoặc thực vật đối chứng không biến nạp, lai chéo thực vật chứa nicotin giảm với thực vật *Nicotiana rustica* để thu được thực vật thế hệ con, và tạo ra thuốc lá chứa thực vật thế hệ con. Phần thực vật hoặc thực vật thế hệ con có lượng nicotin tăng khi so sánh với thực vật *Nicotiana tabacum* mà từ đó phần thực vật hoặc thực vật chuyển gen được tạo ra. Thực vật thế hệ con có thể được sử dụng làm thuốc lá có tỷ lệ hiệu suất nhựa-đối với-nicotin nằm trong khoảng 3 và 8, như được xác định bằng phương pháp FTC hoặc ISO.

Sáng chế cũng đề cập đến phương pháp tạo ra thuốc lá bao gồm cung cấp phần thực vật hoặc thực vật chuyển gen chứa nicotin tăng, khi so sánh với phần thực vật hoặc thực vật đối chứng không biến nạp, của loài thuộc giống *Nicotiana*, tạo ra sợi thuốc lá hoàn nguyên từ phần thực vật hoặc thực vật, và tạo ra thuốc lá chứa sợi thuốc lá hoàn nguyên này. Thuốc lá có thể có tỷ lệ hiệu suất nhựa-đối với-nicotin nằm trong khoảng 3 và 8, như được xác định bằng phương pháp FTC hoặc ISO.

Sáng chế cũng đề cập đến phương pháp tạo ra thuốc lá bao gồm cung cấp phần thực vật hoặc thực vật chuyển gen chứa nicotin tăng, khi so sánh với phần thực vật hoặc thực vật đối chứng không biến nạp, của loài thuộc giống *Nicotiana*, tạo ra sợi thuốc lá giãn nở từ phần thực vật hoặc thực vật, và tạo ra thuốc lá chứa sợi thuốc lá giãn nở này. Thuốc lá có thể có tỷ lệ hiệu suất nhựa-đối với-nicotin nằm trong khoảng 3 và 8, như được xác định bằng phương pháp FTC hoặc ISO.

Sáng chế cũng đề cập đến thuốc lá chứa phần thực vật hoặc thực vật chuyển gen của loài thuộc giống *Nicotiana* có lượng nicotin tăng khi so sánh với phần thực

vật hoặc thực vật giống gốc không biến nạp mà từ đó phân thực vật hoặc thực vật chuyển gen được tạo ra và tỷ lệ hiệu suất nhựa-đối với-nicotin thấp khi so sánh với thuốc lá đối chứng chứa phân thực vật hoặc thực vật giống gốc không biến nạp.

Sáng chế cũng đề cập đến phương pháp tạo ra thuốc lá bao gồm cung cấp phân thực vật hoặc thực vật chuyển gen chứa nicotin tăng, khi so sánh với phân thực vật hoặc thực vật đối chứng không biến nạp, của loài thuộc giống *Nicotiana*, chiết nicotin từ phân thực vật hoặc thực vật chuyển gen, cung cấp phân thực vật hoặc thực vật của loài thuộc giống *Nicotiana*, bổ sung nicotin được chiết vào loài để tạo ra nguyên liệu thực vật chứa nicotin tăng, tạo ra thuốc lá chứa nguyên liệu thực vật chứa nicotin tăng. Nicotin có thể là các muối nicotin của các axit hữu cơ.

Sáng chế cũng đề cập đến phương pháp tạo ra thuốc lá bao gồm cung cấp phân thực vật hoặc thực vật chuyển gen chứa nicotin tăng, khi so sánh với phân thực vật hoặc thực vật đối chứng không biến nạp, của loài thuộc giống *Nicotiana*, chiết nicotin từ phân thực vật hoặc thực vật chuyển gen, cung cấp phân thực vật hoặc thực vật thứ sinh của loài thuộc giống *Nicotiana*, bổ sung nicotin được chiết vào phân thực vật hoặc thực vật thứ sinh để tạo ra nguyên liệu thực vật chứa nicotin tăng, tạo ra thuốc lá chứa nguyên liệu thực vật chứa nicotin tăng và có tỷ lệ hiệu suất nhựa-đối với-nicotin thấp khi so sánh với thuốc lá đối chứng chứa phân thực vật hoặc thực vật thứ sinh không bổ sung nicotin được chiết.

Sáng chế cũng đề cập đến phương pháp tạo ra thuốc lá bao gồm cung cấp phân thực vật hoặc thực vật chuyển gen chứa nicotin giảm, khi so sánh với phân thực vật hoặc thực vật đối chứng không biến nạp, của loài thuộc giống *Nicotiana*, tạo ra sợi thuốc lá từ phân thực vật hoặc thực vật chuyển gen, bổ sung nicotin vào sợi thuốc lá, tạo ra thuốc lá chứa sợi thuốc lá và có mức nitrosamin riêng trong sợi thuốc lá dưới khoảng 0,5 microgam trên mỗi gam. Nicotin có thể là các muối nicotin của các axit hữu cơ hoặc nicotin được tổng hợp. Mức nitrosamin riêng trong sợi thuốc lá có thể nhỏ hơn khoảng 0,05 microgam (50ppb) trên mỗi gam sợi thuốc

lá và thuốc lá có thể có tỷ lệ hiệu suất nhựa-đối với-nicotin nằm trong khoảng 3 và 8.

Sáng chế cũng đề cập đến phương pháp tạo ra sản phẩm thuốc lá bao gồm cung cấp phần thực vật hoặc thực vật chuyển gen của loài thuộc giống *Nicotiana* có lượng nicotin giảm khi so sánh với phần thực vật hoặc thực vật giống gốc không biến nạp mà từ đó phần thực vật hoặc thực vật chuyển gen được tạo ra, tạo ra sợi thuốc lá từ phần thực vật hoặc thực vật chuyển gen, bổ sung nicotin vào sợi thuốc lá, tạo ra sản phẩm thuốc lá chứa sợi thuốc lá và có mức nitrosamin riêng trong sợi thuốc lá thấp hơn khi so sánh với sản phẩm đối chứng chứa phần thực vật hoặc thực vật giống gốc không biến nạp. Phần thực vật hoặc thực vật chuyển gen có nicotin giảm, khi so sánh với phần thực vật hoặc thực vật đối chứng không biến nạp, có thể chứa và biểu hiện ít nhất một axit nucleic không tương đồng làm giảm sự điều chỉnh quá trình tạo ra nicotin trong thực vật hoặc phần thực vật chuyển gen đó. Phần thực vật hoặc thực vật chuyển gen có nicotin giảm có thể chứa và biểu hiện ADN không tương đồng mã hoá ít nhất một đoạn của enzym cần thiết để tổng hợp sinh học nicotin trong sợi thuốc lá, thực vật hoặc phần thực vật chuyển gen này có các mức enzym giảm khi so sánh với phần thực vật hoặc thực vật đối chứng không biến nạp và hàm lượng nicotin giảm khi so sánh với phần thực vật hoặc thực vật đối chứng không biến nạp. Mức nitrosamin riêng trong sợi thuốc lá có thể dưới khoảng 1 microgam trên mỗi gam (1ppm). Sản phẩm thuốc lá có thể dưới dạng được chọn từ nhóm gồm có thuốc lá lá, thuốc lá mảnh vụn, và thuốc lá cắt và có thể được chọn từ nhóm gồm có thuốc lá bột, thuốc lá hút bằng tẩu, điếu xì gà, thuốc lá nhai và thuốc lá điếu.

Sáng chế cũng đề cập đến phương pháp tạo ra sợi thuốc lá giãn nở bao gồm cung cấp phần thực vật hoặc thực vật chuyển gen chứa nicotin tăng, khi so sánh với phần thực vật hoặc thực vật đối chứng không biến nạp, của loài thuộc giống *Nicotiana*, tạo ra sợi thuốc lá từ phần thực vật hoặc thực vật chuyển gen và làm giãn nở sợi thuốc lá.

Sáng chế cũng đề cập đến phương pháp tạo ra sợi thuốc lá hoàn nguyên bao gồm cung cấp nguyên liệu thực vật được chọn từ nhóm gồm có phần thực vật hoặc thực vật chuyển gen chứa nicotin tăng, khi so sánh với phần thực vật hoặc thực vật đối chứng không biến nạp, của loài thuộc giống *Nicotiana*, phần thực vật hoặc thực vật chuyển gen chứa nicotin giảm, khi so sánh với phần thực vật hoặc thực vật đối chứng không biến nạp, của loài thuộc giống *Nicotiana*, tách protein của sợi thuốc lá, và làm khô ở nhiệt độ thấp sợi thuốc lá, và hoàn nguyên nguyên liệu thực vật.

Sáng chế cũng đề cập đến phương pháp tạo ra sợi thuốc lá hoàn nguyên bao gồm cung cấp phần thực vật hoặc thực vật chuyển gen chứa nicotin giảm, khi so sánh với phần thực vật hoặc thực vật đối chứng không biến nạp, của loài thuộc giống *Nicotiana*, và hoàn nguyên phần thực vật hoặc thực vật chuyển gen. Loài thực vật này có thể được chọn từ nhóm gồm có *Nicotiana tabacum* và *Nicotiana rustica*. Sợi thuốc lá hoàn nguyên có thể còn bao gồm sợi thuốc lá hoàn nguyên tách protein. Sáng chế cũng đề cập đến thuốc lá chứa sợi thuốc lá hoàn nguyên đó và có hiệu suất TSNA giảm khi so sánh với thuốc lá đối chứng chứa phần thực vật hoặc thực vật giống gốc không biến nạp. Các TSNA như được sử dụng ở đây có thể được chọn từ nhóm gồm có NNN, NNK, NAT, và NAB và thuốc lá có thể được hiệu suất của các hợp chất giảm được chọn từ nhóm gồm có benzo(a)pyren, phenol, và catechol như được so sánh với thuốc lá đối chứng chứa phần thực vật hoặc thực vật giống gốc không biến nạp đó.

Sáng chế cũng đề cập đến phương pháp tạo ra sợi thuốc lá hoàn nguyên bao gồm cung cấp phần thực vật hoặc thực vật chuyển gen chứa nicotin tăng, khi so sánh với phần thực vật hoặc thực vật đối chứng không biến nạp, của loài thuộc giống *Nicotiana*, và hoàn nguyên phần thực vật hoặc thực vật chuyển gen. Phương pháp này có thể còn bao gồm làm khô ở nhiệt độ thấp phần thực vật hoặc thực vật chuyển gen sau khi thu hoạch nó.

Mô tả chi tiết sáng chế

Một số khía cạnh của sáng chế là đề cập đến việc giảm tỷ lệ hiệu suất nhựa-đối với-nicotin (TNR) của thuốc lá bằng cách hạn chế lượng nhựa người hút thuốc nhận được trong khi cung cấp các lượng nicotin thoả đáng để duy trì được sự thoả mãn của người hút thuốc. Kết quả là thuốc lá thực sự cung cấp cho người hút thuốc một lượng nicotin thoả mãn với lượng nhựa và khí ít độc hại hơn. Thuốc lá thương phẩm nhẹ và cực nhẹ hiện nay không thể thực sự cung cấp cho người hút thuốc một lượng nicotin thoả mãn, dẫn đến kích thích thói quen hút thuốc được gọi là hút bù mà có thể gây ra nhiều tác hại cho người hút thuốc. Đó là vì thuốc lá này đồng thời giảm lượng nhựa và nicotin và với khoảng tỷ lệ tương tự.

Sáng chế, đề cập đến việc kết hợp các mức khác nhau của quá trình lọc và/hoặc làm loãng khói thuốc để làm tăng lượng nicotine ở đầu lọc của thuốc lá, hoặc trong cây thuốc lá bằng cách di truyền, hoặc bằng cách bổ sung nicotin vào đầu lọc, bằng cách đó cho phép lượng nicotin đưa đến cho người hút thuốc được duy trì, trong khi tốt hơn là giảm lượng nhựa mang lại.

Như được sử dụng ở đây, thuật ngữ "thực vật chuyển gen chứa nicotin tăng" có nghĩa là cây thuốc lá tái tổ hợp (hoặc "chuyển gen") chứa lượng nicotin cao hơn thực vật "giống gốc" không chuyển gen (hoặc "đối chứng" không cải biến) mà từ đó thực vật chuyển gen được tạo ra.

Như được sử dụng ở đây, "thực vật chuyển gen chứa alkaloit tăng" có nghĩa là cây thuốc lá tái tổ hợp (hoặc "chuyển gen") chứa lượng alkaloit tổng cao hơn thực vật "giống gốc" không chuyển gen (hoặc "đối chứng" không cải biến) mà từ đó thực vật chuyển gen được tạo ra.

Như được sử dụng ở đây, thuật ngữ "thực vật chuyển gen chứa nicotin giảm" có nghĩa là cây thuốc lá tái tổ hợp (hoặc "chuyển gen") chứa ít hơn một nửa, tốt hơn là ít hơn 25%, và tốt hơn nữa là ít hơn 20% hoặc ít hơn 10%, lượng nicotin của thực vật "giống gốc" không chuyển gen (hoặc "đối chứng" không cải biến) mà từ đó thực

vật chuyển gen được tạo ra. Sẽ được hiểu rằng một số lượng ít nicotin còn lại, khoảng ít nhất là 1% hoặc 5% như so sánh với thực vật đối chứng không cải biến tương ứng, có thể vẫn còn ở các cây chuyển gen này được sử dụng để thực hiện sáng chế.

Như được sử dụng ở đây, "nicotin" (C₁₀H₁₄N₂) bao gồm các chất đồng đẳng của nicotin (ngoại trừ khi nicotin được đề cập tới toàn bộ (các) alkaloit), hai chất đồng phân của nicotin, nicotin tổng hợp, và các muối nicotin của các axit hữu cơ.

Thực vật để sử dụng trong các phương pháp của sáng chế là loài thuộc giống *Nicotiana*, hoặc cây thuốc lá, bao gồm nhưng không giới hạn ở, *Nicotiana tabacum*, *Nicotiana rustic*, *Nicotiana glauca*, *Nicotiana excelsior*, *Nicotiana benthamiana*, *Nicotiana sylvestris* *Nicotiana clevelandii*, và *Nicotiana attenuata*. Như được sử dụng ở đây, "cây thuốc lá" có nghĩa và bao gồm bất kỳ thực vật, loài, giống lai, hoặc các thể lai nào thuộc giống *Nicotiana*. Bất kỳ chủng nào hoặc giống nào của cây thuốc lá cũng có thể được sử dụng. Các cây thuốc lá này được cải biến di truyền để hoặc làm tăng hoặc giảm lượng nicotin của chúng, tùy thuộc vào mục đích, như được thảo luận chi tiết hơn dưới đây. Thuật ngữ "thực vật" bao gồm các phần vật chất hoặc hoá học của chúng, như các phần thực vật và các chất chiết thực vật, các sản phẩm thuỷ phân, v.v..

Như được sử dụng ở đây, thuật ngữ "thuốc lá có TNR thấp" hoặc "thuốc lá có tỷ lệ hiệu suất nhựa-đối với-nicotin thấp" theo sáng chế có nghĩa là thuốc lá chứa cây hoặc phần cây thuốc lá tái tổ hợp có lượng nicotin tăng, bao gồm nhưng không giới hạn ở nicotin từ cây hoặc các phần cây này.

1. *Thuốc lá có TNR thấp (với cây thuốc lá chuyển gen có lượng nicotin tăng); Quá trình tạo ra các loại thuốc lá mới; và thuốc lá có TNR thấp được chấp nhận nhiều hơn*

Cây thuốc lá chuyển gen có lượng nicotin tăng được sử dụng để thực hiện khía cạnh thứ nhất của sáng chế nói chung là các cây thuốc lá tái tổ hợp chứa và

Sáng chế cũng đề cập đến các phương pháp tạo ra và sản xuất các loại sợi thuốc lá mới để sử dụng trong các điếu thuốc lá có TNR thấp sao cho các điếu thuốc lá đó có lợi hơn để tạo ra các sản phẩm thích hợp với người tiêu dùng. Các phương pháp đó bao gồm kết hợp các tính trạng chuyển gen nicotin cao với các tính trạng chuyển gen đường cao và các gốc đường khử cao. Các phương pháp mới khác để tăng tính chất có thể chấp được của người tiêu dùng đối với thuốc lá có TNR thấp bao gồm kết hợp các tính trạng tính trạng chuyển gen nicotin cao với các tính trạng chuyển gen axit béo cao. Các phương pháp này giảm độ pH trong khói thuốc của thuốc lá có TNR thấp.

Mô tả vắn tắt các hình vẽ

Fig.1 là biểu đồ thể hiện các lượng nhựa và nicotin trung bình của thuốc lá Mỹ từ năm 1950 đến 1995.

Fig.2 là bảng thể hiện sự so sánh giữa các lượng nhựa và nicotin (như của năm 2003) của một số loại thuốc lá và các TNR thu được của chúng.

Fig.3 biểu đồ tròn thể hiện các nguyên nhân gây ra cái chết liên quan đến hút thuốc ở Mỹ từ 1990-1994.

Fig.4 là bảng biểu thị các đặc tính thực vật của dòng thực vật chuyển gen có lượng nicotin giảm.

Fig.5 là sơ đồ mạch con đường của một số alkaloit và TSNA ở thuốc lá.

Fig.6 là sơ đồ mạch quá trình sinh tổng hợp pyridin alkaloit trong *Nicotiana* (quá trình điều chỉnh giảm việc tạo ra gen đối nghĩa của hoạt tính putresxin N-methyltransferaza trong *Nicotiana tabacum* L. chuyển gen có thể làm tăng các lượng anatabin với hao phí nicotin; Yupynn Chintapakorn and John D. Hamill; Plant Molecular Biology 53:87-105, 2003).

biểu hiện nucleotit không tương đồng, quá trình biểu hiện của nó điều chỉnh tăng enzym (như arginin decarboxylaza (ADC), metylputresxin oxidaza (MPO), NADH dehydrogenaza, ornithin decarboxylaza (ODC), phosphoribosylanthranilat isomeraza (PRAI), putresxin N-metyltransferaza (PMT), quinolat phosphoribosyl transferaza (QPT), và S-adenosyl-metionin synthetaza (SAMS)) ở cây, và nhờ đó làm tăng quá trình tạo ra nicotin ở cây. Thực vật tái tổ hợp thích hợp được M. Conkling et al., đề cập trong đơn PCT có số công bố W098/56923 (công bố ngày 17.12. 1998) và M. Timko đề cập trong đơn PCT có số công bố WO00/67558 (công bố ngày 16.11. 2000). Nói chung, nucleotit không tương đồng bao gồm ít nhất một đoạn axit nucleic mã hoá enzym được điều chỉnh tăng.

Theo phương án này, cây thuốc lá có lượng nicotin tăng kết hợp vào đầu lọc của điếu thuốc lá để thu được thuốc lá có TNR thấp mong muốn. Với sự kết hợp của thanh hương vị đậm, tốt hơn là thanh nhẹ, và tốt hơn nữa là thanh cực nhẹ, các điếu thuốc lá có lượng nicotin tăng hiện nay có thể cung cấp lượng nicotin trên mỗi điếu thuốc theo mong muốn của người hút thuốc (có thể bao gồm các hỗn hợp pha trộn của thuốc lá thông thường), trong khi cung cấp lượng nhựa và khí độc hại ít hơn. Thuốc lá theo sáng chế có TNR thấp cũng có thể thu được nhờ sử dụng thanh không đầu lọc, vì người hút thuốc lá không đầu lọc sẽ tiếp tục có lượng nicotin tăng, trong một số trường hợp quá trình hít nhựa và các khí độc hại vào sẽ giảm. Vì vậy, thuốc lá có TNR được làm giảm là mục đích chính của PREP theo sáng chế.

Một phương án đặc biệt sử dụng thực vật tái tổ hợp có nicotin tăng có quá trình biểu hiện quinolat phosphoribosyl transferaza tăng (QPRtaza) liên quan với thực vật đối chứng không biến nạp, thực vật tái tổ hợp này bao gồm các tế bào thực vật tái tổ hợp chứa: cấu trúc ADN ngoại sinh bao gồm, ở hướng 5' đến 3', gen khởi đầu có thể xử lý được trong tế bào thực vật này và ADN không tương đồng mã hoá ít nhất một đoạn thuộc ARN thông tin quinolat phosphoribosyl transferaza của thực vật, ADN không tương đồng này liên kết động với gen khởi đầu nêu trên, thực vật

này có quá trình biểu hiện QPRTase tăng so với thực vật đối chứng không biến nạp và lượng nicotin tăng khi so sánh với thực vật đối chứng không biến nạp.

Phương án khác có thể được tiến hành với thực vật tái tổ hợp có nicotin tăng có quá trình biểu hiện putresxin N-metyltransferaza (PMTase) liên quan với thực vật đối chứng không biến nạp, thực vật tái tổ hợp này bao gồm các tế bào thực vật tái tổ hợp chứa: cấu trúc ADN ngoại sinh bao gồm, ở hướng 5' đến 3', gen khởi đầu có thể xử lý được trong tế bào thực vật này và ADN không tương đồng mã hoá ít nhất một đoạn thuộc ARN thông tin PMT của thực vật, ADN không tương đồng này liên kết động với gen khởi đầu nêu trên, và với ADN không tương đồng này ở hướng có nghĩa hoặc đối nghĩa; thực vật này có quá trình biểu hiện PMT tăng so với thực vật đối chứng không biến nạp và lượng nicotin tăng khi so sánh với thực vật đối chứng không biến nạp.

Các phương án khác nữa có thể được tiến hành theo cách tương tự với các enzym khác được nêu trên.

Các cấu trúc axit nucleic như được mô tả ở trên có thể bao gồm các thành phần cách ly nằm trước (5' đến) và/hoặc nằm sau (3' đến) của cấu trúc được mô tả ở trên, như đã nêu, chẳng hạn trong patent Mỹ các số 6.100.448 và 6.037.525 của Thompson và các đồng tác giả. Ngoài ra, các cấu trúc như được mô tả ở trên có thể bao gồm các vùng gắn kết màng (hoặc giàn) nằm trước hoặc nằm sau của cấu trúc được mô tả ở trên, như đã nêu (chẳng hạn) trong patent Mỹ các số 5.773.695 và 5.773.689 của và các đồng tác giả.

Theo một phương án khác, thực vật đã sử dụng có thể chứa phần lớn các axit nucleic tái tổ hợp điều chỉnh tăng đa số các enzym trong quá trình tổng hợp nicotin. Thực vật được mô tả như có ít nhất một axit nucleic tái tổ hợp vì vậy có thể bao gồm các loại chứa phần lớn các axit nucleic. Lợi ích của việc sử dụng nhiều hơn một axit nucleic tái tổ hợp là các mức nicotin hoặc alkaloit khác có thể được tăng tới các mức lớn hơn (nếu so với chỉ một axit nucleic đó được sử dụng) và các tỷ lệ

alkaloit mong muốn khác (ví dụ, tỷ lệ nicotin đối với tổng các alkaloit) có thể được điều chỉnh, nếu muốn.

Theo một phương án khác, thực vật hoặc tế bào tương tự có thể chứa ít nhất một axit nucleic tái tổ hợp điều chỉnh tăng enzym trong quá trình tổng hợp nicotin hoặc alkaloit, trong khi cũng chứa ít nhất một axit nucleic tái tổ hợp điều chỉnh giảm enzym trong quá trình tổng hợp nicotin hoặc alkaloit. Như một ví dụ, nếu PMT được điều chỉnh tăng, và QPT được điều chỉnh giảm, thì tỷ lệ nicotin đối với alkaloit tổng sẽ tăng. Tốt hơn nếu tỷ lệ này gần với tỷ lệ để thúc đẩy việc ngăn ngừa quá trình hình thành NAT, NAB và có thể các TSNA khác. Xem Fig.5 và Fig.6.

Theo một phương án khác, sáng chế sử dụng thực vật tái tổ hợp có lượng nicotin tăng có quá trình biểu hiện cả QPRT lẫn PMT tăng liên quan với thực vật đối chứng không biến nạp, thực vật tái tổ hợp này bao gồm các tế bào thực vật tái tổ hợp chứa: (i) cấu trúc ADN ngoại sinh thứ nhất bao gồm, ở hướng 5' đến 3', gen khởi đầu có thể xử lý được trong tế bào thực vật này và ADN không tương đồng mã hoá ít nhất một đoạn thuộc ARN thông tin quinolat phosphoribosyl transferaza của thực vật, ADN không tương đồng này liên kết động với gen khởi đầu nêu trên; và (ii) cấu trúc ADN ngoại sinh thứ hai bao gồm, ở hướng 5' đến 3', gen khởi đầu có thể xử lý được trong tế bào thực vật này và ADN không tương đồng mã hoá ít nhất một đoạn thuộc ARN thông tin PMT của thực vật, ADN không tương đồng này liên kết động với gen khởi đầu nêu trên, thực vật tái tổ hợp có lượng nicotin tăng có quá trình biểu hiện QPRT và PMT tăng so với thực vật đối chứng không biến nạp, và lượng nicotin tăng như so với thực vật đối chứng không biến nạp. Như được sử dụng ở đây, QPT, QPRT, và QPRTaza được sử dụng có thể thay thế cho nhau. PMT và PMTaza cũng có thể được sử dụng thay thế cho nhau.

Các ví dụ về thực vật tái tổ hợp có thể được sử dụng để thực hiện các phương án, nhưng không giới hạn ở, thực vật đã biết biến nạp với ADN mã hoá gen quinolat phosphoribosyl transferaza của cây thuốc lá (NtQPT1) (xem, ví dụ, đơn PCT WO98/5556923 của Conkling et al.); ADN mã hoá putresxin N-metyltransferaza

của cây thuốc lá, như PMT1, PMT2, PMT3 và PMT4; ADN mã hoá arginin decarboxylaza, như ADC1 và ADC2; ADN mã hoá ornithin decarboxylaza của cây thuốc lá (ODC); ADN mã hoá S-adenosylmethionin synthetaza (SAMS); ADN NADH dehydrogenaza của cây thuốc lá; và ADN phosphoribosylantranilat isomerase của cây thuốc lá (PRAI) (đã được biết và được mô tả trong đơn PCT có số công bố WO 00/67558 của M. Timko et al.).

Patent Mỹ các số 6.423.520, 6.586.661, 5.260.205, 5.369.023, 5.668.295 và đơn yêu cầu cấp patent Mỹ đã công bố số 20030018997 cũng mô tả các phương pháp biến đổi lượng nicotin của cây thuốc lá bằng cách cải biến di truyền hoặc QPRT hoặc PMT theo cách tổng hợp sinh học nicotin.

Lượng nicotin của mỗi cây thuốc lá có lượng nicotin tăng biến nạp, với từng phương pháp trong các phương pháp nêu trên, có thể thay đổi. Vì vậy, nếu dòng cây thuốc lá được mong muốn có khoảng 6,2 phần trăm lượng nicotin (trên cơ sở trọng lượng khô), nó sẽ là số quá trình biến nạp di truyền thực vật hợp lý đối với chuyên gia trong lĩnh vực kỹ thuật để thu được thực vật đồng hợp tử có lượng nicotin đó.

Các hạt giống từ sự tự thụ phấn của các thể biến nạp ban đầu chứa ở gen chuyển gen đơn sẽ có ba loại kiểu gen khác nhau do chuyển gen (đề cập đến lượng nicotin cao) phân tách 1:2:1; 25% sẽ không mang gen chuyển, 50% sẽ là dị hợp tử đối với gen chuyển, và 25% sẽ là đồng hợp tử đối với gen chuyển. Thế hệ con của loại dị hợp tử của các hạt giống sẽ phân tách lần nữa 1:2:1. Loại đồng hợp tử của các hạt giống sẽ có hữu ích nhất để nhân giống thêm vì 100 phần trăm của tất cả các thế hệ con của chúng sẽ mang transgene (với hai bản sao nếu thực vật được tự thụ phấn, và một bản sao nếu thực vật chuyển gen đồng hợp tử được lai chéo với giống gốc không chuyển gen). Nếu các hạt giống từ sự tự thụ phấn của thế hệ con đồng hợp tử được gieo trồng trên cánh đồng chúng sẽ chứa các lượng nicotin tăng rất giống nhau như thực vật giống gốc sinh trưởng trong khí hậu, đất trồng, và điều kiện gieo trồng tương tự.

Các phương án di truyền này để tạo ra thuốc lá có nicotin tăng là tiết kiệm nhiều hơn để bổ sung vào các sản phẩm thuốc lá thương phẩm có nicotin tăng so với bổ sung trực tiếp nicotin, hoặc các muối nicotin của các axit hữu cơ, vào thuốc lá đã xử lý. Tương tự, thuốc lá chuyển gen có nicotin tăng cũng sẽ tiết kiệm nhiều hơn so với bổ sung nicotin tổng hợp hoặc các chất đồng đẳng nicotin. Công việc, thời gian và các nguồn tài nguyên khác nhau khác sẽ an toàn do phát triển thêm thuốc lá để chiết nicotin, chiết nicotin, và sau đó bổ sung nicotin này vào thuốc lá đã xử lý sẽ không phải tiến hành. Khi thực vật chuyển gen được tạo ra, chúng tự tạo ra lượng nicotin bổ sung cần thiết rất hữu hiệu và không có các chi phí tăng thêm.

Hiện nay việc bổ sung nicotin và các muối nicotin của axit hữu cơ (như đưa ra trong patent Mỹ các số 4.830.028, 4.836.224 và 5.031.646) vào các sản phẩm thuốc lá ở nhiều nước đã bị cấm, kể cả Mỹ. Ở nhiều nước, nicotin và các muối nicotin của axit hữu cơ không nằm trong danh mục các chất phụ gia được cho phép đối với các sản phẩm thuốc lá. Thuật ngữ "sản phẩm thuốc lá" được sử dụng ở đây bao gồm nhưng không giới hạn ở điếu thuốc lá, điếu xì gà, thuốc lá điếu, thuốc lá hút bằng tẩu, thuốc lá nhai, thuốc lá bột, các viên hình thoi và bất kỳ thiết bị cung cấp nicotin nào khác mà không phải là sản phẩm thay thế nicotin được sử dụng làm liệu pháp thay thế nicotin.

Tiện lợi khác của các phương án tạo ra thuốc lá TNR thấp nêu trên là thuốc lá có nicotin tăng an toàn hơn chiết nicotin bằng cơ học từ một nguồn, vận chuyển nó, và sau đó bổ sung nó vào thuốc lá trong quá trình xử lý, vì nicotin dưới dạng tinh khiết của nó có độ độc cao. Nicotin khó giữ dưới dạng tinh khiết vì nó dễ bị oxy hoá. Lưu giữ nicotin tinh khiết sẽ tăng thêm các chi phí và nguy hiểm.

Bất lợi có thể có của các phương pháp nêu trên có thể là làm tăng các TSNA được tạo ra từ các mức alkaloit cao hơn, đó là các tiền chất nitrosamin. Nó sẽ được bù đắp bằng cách giảm toàn bộ lượng khói thuốc cung cấp, trong đó có các TSNA. Các TSNA chỉ là một loại trong số nhiều carxinogen trong khói thuốc lá. Các

phương pháp xử lý thích hợp cùng với thuốc lá TNR thấp sẽ giảm bất lợi có thể có này tới mức có thể chấp nhận được (Peele, D. M. , et al., "Formation of Tobacco Specific Nitrosamines in Flue-Cured Tobacco", CORESTA 1999 AGRO-PHYTO Proceedings, Suzhou, China 1999).

Nếu thuốc lá TNR thấp giảm được 35 phần trăm lượng khói trong tổng lượng khói cung cấp cho người hút thuốc (bao gồm nhựa và các khí có hại), so với thuốc nhẹ trung bình hoặc cực nhẹ thông thường, còn hiệu suất các TSNA của nó cao hơn không đáng kể, có thể giả thuyết là các nghiên cứu bệnh dịch cuối cùng sẽ chứng minh rằng phương án này các lợi ích giảm nguy hiểm đáng kể.

Tốt hơn là thuốc lá TNR thấp theo phương án này sử dụng nguyên liệu thuốc lá từ giống *Nicotiana tabacum* chuyển gen hoặc giống cây trồng có kiểu hình khác biệt bởi mức nicotin tăng, so với giống hoặc giống cây trồng thiếu transgene, như được mô tả ở trên, và bởi lượng đường khử, đã xử lý rất cao, tỷ lệ với dãy các giá trị lượng đường đặc trưng bởi nhiều giống và giống cây trồng thương phẩm. Các giới hạn của giống thuốc lá được ưu tiên có lượng đường khử giảm nằm trong khoảng từ 11 phần trăm đến 20 phần trăm, hoặc tốt hơn là trên 20 phần trăm. Minh họa các giống *N. tabacum* có lượng đường khử rất cao đó là K 394, NC 2326, và GL 939, trung bình ba năm tuổi, có lượng đường khử giảm, đã xử lý tương ứng là 15,7 phần trăm, 15,5 phần trăm, và 15,2 phần trăm (2000 Official Flue-Cured Variety Test at the University of Georgia, Tifton).

Về mặt này, thuật ngữ "giống cây trồng" và "giống" được sử dụng đồng nghĩa để đề cập đến nhóm thực vật thuộc loài, *N. tabacum*, có chung một số đặc tính không đổi tách biệt chúng với dạng thông thường và với các giống có thể có khác trong loài đó. Trong khi có ít nhất một đặc điểm phân biệt, một giống cũng được đặc trưng bởi giá trị tổng các biến đổi giữa các cá thể trong giống, chủ yếu dựa vào sự tách rời Mendelian các tính trạng giữa thế hệ con trong các thế hệ nối tiếp. “Dòng”, như được phân biệt từ “giống”, đề cập đến nhóm thực vật thể hiện mức

biến đổi ít hơn giữa các cá thể, nói chung (mặc dù không loại trừ) bởi ưu điểm của một số thể hệ tự thụ phấn. Ngoài ra, “dòng” được xác định, với mục đích của sáng chế, đủ rộng để bao gồm nhóm thực vật nhân giống sinh dưỡng từ thực vật giống gốc đơn, nhờ sử dụng các kỹ thuật nuôi cấy mô. Việc sử dụng các dòng tế bào này để phát triển các thể lai được mô tả trong patent Mỹ các số 4.326.358 và 4.381.624.

"Chất đệm nicotin" giúp duy trì được độ pH của khói thuốc lá. Khi nicotin là chất dễ bay hơi chính có trong khói thuốc, độ pH của khói thuốc có vai trò quan trọng trong sự nhận biết cảm thụ. Đường hoạt động như chất đệm nicotin, giảm bất kỳ vị chất nào do lượng nicotin tăng; vì thế, lượng đường cao là có ích, đường hoặc là tự nhiên ở cây thuốc lá hoặc được bổ sung vào, ví dụ như xiro ngô có fructoza cao, sucroza, đường nghịch chuyển, chất chiết cam thảo, chất chiết và hạt carob, và bột coca và chất chiết coca trong quá trình xử lý thuốc lá.

"(Các) loại đường khử" là bất kỳ loại đường nào (monosacarit hoặc polysacarit) có nhóm aldehyt hoặc keton tự do hoặc có khả năng tự do. Glucoza và fructoza hoạt động như các chất đệm nicotin trong khói thuốc lá bằng cách giảm độ pH và giảm hữu hiệu lượng nicotin không thêm một proton “tự do”. Các loại đường khử làm cân bằng hương vị khói thuốc, chẳng hạn, bằng cách cải biến sự nhận biết cảm thụ nicotin và các alkaloit khác trong thuốc lá. Nói chung có một mối quan hệ nghịch đảo giữa lượng đường và lượng alkaloit bất chèo các giống thuốc lá, trong cùng một giống, và trong cùng một dòng thực vật do các điều kiện gieo trồng. Ví dụ, nitơ càng thấp trong đất trồng cây thuốc lá, thì các lượng nicotin càng thấp nhưng các lượng đường càng cao hơn. Mưa nhiều làm các lượng nicotin thấp và các lượng đường cao hơn.

Thuốc lá có các TNR thấp có thể tạo ra khói chất và kích thích, đặc biệt kích thích mũi và họng. Nguồn của vị chất này thường được quy cho là do lượng nicotin không thêm proton "tự do" hoặc "dễ bay hơi," trong khói thuốc. Nói chung, ở độ pH của khói thuốc là 5,4, nicotin được thêm proton 100%. Khi độ pH của khói thuốc tăng lên trên 5,4, thì nicotin “tự do” nhiều hơn sẽ có mặt trong khói thuốc, nó là

nguyên nhân gây ra vị chát. Độ pH của khói thuốc lá chủ yếu được xác định bởi hàm lượng đường và alkaloit của đầu lọc thuốc lá. Quá trình đốt cháy đường tạo ra sản phẩm phụ là axit, nó làm giảm độ pH và giúp làm giảm vị chát. Chẳng hạn, thuốc lá chứa toàn bộ thuốc lá được sấy bằng không khí nóng (nói chung sẽ chứa hàm lượng đường cao hơn nếu chúng chứa cả thuốc lá được sấy bằng không khí nóng lẫn thuốc lá burley) có độ pH của khói thuốc nằm trong khoảng 5,0 đến 6,0, được tính toán để tạo ra 0-1% nicotin không thêm proton.

Thuốc lá có lượng nicotin cao hơn, như burley, (nói chung có hàm lượng đường thấp hơn thuốc lá được sấy bằng không khí nóng) thường sẽ tạo ra khói thuốc có độ pH của khói thuốc cao hơn. Thuốc lá hỗn hợp của Mỹ (thuốc lá được sấy bằng không khí nóng lẫn thuốc lá xử lý theo kiểu phương Đông) có độ pH của khói thuốc nằm trong khoảng từ 5,5 đến 6,5, được tính toán để tạo ra 0,3-3% nicotin không thêm proton (Morie, G. P., (1972), phần nicotin thêm và không thêm proton trong khói thuốc lá có các giá trị pH khác nhau, Tob. Sci., 16, 167.) Vì vậy, thuốc lá được tạo ra từ thuốc lá chuyển gen có lượng nicotin cao với TNR dưới 9 sẽ thường có độ pH lớn hơn 6,5 và có thể được cho là chát với người hút thuốc trừ khi hàm lượng đường đủ hoặc hoặc (các) chất đệm nicotin có trong đầu lọc. Bằng cách sử dụng thuốc lá có hàm lượng đường rất cao hoặc bổ sung đủ lượng đường vào đầu lọc, độ pH sẽ giảm và thuốc lá có TNR thấp sẽ có vị có thể chấp nhận được. Quá trình làm giảm độ pH này cũng có thể được thực hiện bằng cách làm tăng hàm lượng axit béo ở đầu lọc, như được mô tả dưới đây.

Phương án khác của sáng chế đề xuất phương pháp sản xuất thuốc lá bao gồm chuẩn bị thực vật hoặc phân thực vật chuyển gen chứa alkaloit tăng, khi so sánh với phân thực vật hoặc thực vật đối chứng không biến nạp, của loài thuộc giống *Nicotiana*, lai chéo thực vật này với thực vật của loài *Nicotiana tabacum* để tạo ra thực vật thế hệ con, và sản xuất thuốc lá chứa thực vật thế hệ con, với thuốc lá có tỷ lệ hiệu suất lượng nhựa-đối với-nicotin nằm trong khoảng 3 và 8, như được xác định bằng phương pháp FTC hoặc ISO. Lợi ích của thực vật mới này là các

alkaloit tăng khác nhau khác với nicotin (kể cả nicotin duy nhất so với các tỷ lệ alkaloit tổng) của loài *Nicotiana* khác nhau được kết hợp với các tính trạng mong muốn của *Nicotiana tabacum*. Chẳng hạn, alkaloit chủ yếu trong *Nicotiana glauca* là bột giả thuốc lá. Patent Mỹ số 6.534.527 mô tả N. *glauca* được sử dụng để làm các cơn thèm nicotin.

Phương án khác của sáng chế đề xuất phương pháp sản xuất thuốc lá bao gồm chuẩn bị thực vật hoặc phần thực vật chuyển gen *Nicotiana tabacum* chứa nicotin giảm có lượng nicotin giảm khi so sánh với phần thực vật hoặc thực vật đối chứng không biến nạp, lai chéo thực vật chứa nicotin giảm với thực vật *Nicotiana rustica* để thu được thực vật thế hệ con, và sản xuất thuốc lá gồm thực vật thế hệ con, bằng thực vật hoặc phần thực vật thế hệ con có lượng nicotin tăng khi so sánh với thực vật *Nicotiana tabacum* mà thực vật hoặc phần thực vật chuyển gen được tạo ra. Sau đó thực vật thế hệ con được sử dụng để sản xuất thuốc lá có tỷ lệ hiệu suất lượng nhựa-đối với-nicotin nằm trong khoảng 3 và 8, như được xác định bằng phương pháp FTC hoặc ISO. Lợi ích của thực vật mới này thêm nữa là có thể thu được nicotin duy nhất so với các tỷ lệ alkaloit tổng.

Theo các kỹ thuật nhân giống thông thường, như được Wernsman, et al., mô tả trong 2 PRINCIPLES OF CULTIVAR DEVELOPMENT: CROP SPECIES (Macmillan 1997), thể biến nạp ổn định, tái sinh từ nguyên liệu thuốc lá chứa transgene thích hợp, được sử dụng để nhập gen tính trạng nicotin cao vào nền di truyền có thể chấp nhận được về mặt thương mại, nhờ đó thu được giống hoặc cây thuốc lá kết hợp nicotin với hàm lượng đường rất cao trong giới hạn, chẳng hạn khoảng từ 14 phần trăm đến 20 phần trăm, tốt hơn nữa là 20 phần trăm đến 30 phần trăm, và còn tốt hơn nữa là trên 30 phần trăm. Trong khi bất kỳ nền thuốc lá nào có lượng đường cao đều có thể được sử dụng cho mục đích này, vì vậy tốt hơn nếu cây trồng hoặc giống thu được là của loại được sấy khô bằng không khí. Từ các vòng lai chéo và chọn lọc liên tiếp, thế hệ con được chọn lọc có cả hàm lượng nicotin lẫn đường cao.

Vì thuốc lá có thể phải chịu các nghiên cứu di truyền, nên bất kỳ transgene nào cũng có thể được đưa vào nền thuốc lá thích hợp nhờ sử dụng các kỹ thuật và các phương pháp đã biết trong sinh học phân tử thực vật. Như được Miki et al. mô tả trong *METHODS IN PLANT MOLECULAR BIOLOGY AND BIOTECHNOLOGY* (CRC Press 1993), bất kỳ quá trình chuyển nhiễm, lây nhiễm, biến nạp, hấp thu tự nhiên, xung điện, và biolistic có thể được sử dụng để đưa gen chuyển vào bất kỳ nền di truyền nào. Ví dụ, và theo phương án của sáng chế, gen mang lại kiểu hình đường cao được đưa vào tế bào chủ của cây thuốc lá, bằng cách đó tạo ra thực vật biểu hiện hàm lượng đường tăng. Ví dụ, tế bào thuốc lá được biến nạp với gen mã hoá enzym hoặc nhân tố phiên mã điều chỉnh tăng quá trình tổng hợp đường, như gen mang lại các mức glucoza và fructoza tăng. Từ quá trình chọn lọc liên tiếp, thực vật thế hệ con có hàm lượng đường tăng được chọn lọc.

Để minh hoạ sáng chế, transgene mang lại kiểu hình nicotin cao có thể được đưa vào nền thuốc lá có lượng đường cao. Bất kỳ gen hoặc phần gen nào mã hoá sản phẩm tạo ra quá trình tổng hợp sinh học nicotin cao đều có thể được sử dụng để biến nạp. Để minh hoạ vấn đề này là các gen tương ứng mã hoá arginin decarboxylaza (ADC), methylputresxin oxidaza (MPO), NADH dehydrogenaza, ornithin decarboxylaza (ODC), phosphoribosylantranilat isomeraza (PRAI), putresxin N-methyltransferaza (PMT), quinolat phosphoribosyl transferaza (QPT), và S-adenosyl-metionin synthetaza (SAMS). Khi gen chuyển mang lại kiểu hình có lượng nicotin cao được đưa vào cây thuốc lá có lượng đường cao, các vòng chọn lọc liên tiếp được khai thác, theo cách thông thường, để nhận dạng và chọn lọc dòng thuốc lá đồng phân tách cả hàm lượng nicotin cao lẫn hàm lượng đường cao. Hàm lượng nicotin và đường được phân tách bằng các phương pháp chuẩn.

Theo phương án khác, gen mang lại kiểu hình nicotin cao được đưa vào thực vật biểu hiện quá trình tổng hợp axit béo tăng. Nhờ sử dụng các kỹ thuật sinh học phân tử thực vật đã biết rõ, bất kỳ gen hoặc phần gen nào tạo ra quá trình tổng hợp axit béo tăng cũng được sử dụng để biến nạp. Để minh hoạ vấn đề này là các gen

mã hoá và/hoặc điều chỉnh quá trình tổng hợp các axit béo bão hoà, như các gen mã hoá axit stearic và palmitic. Thực vật thể hệ con được thử nghiệm đối với quá trình tổng hợp axit béo tăng nhờ sử dụng các phương pháp đã biết rõ trong lĩnh vực kỹ thuật, như PCR, phân tích Bắc, các phân tích sắc ký. Từ quá trình nhận dạng và chọn lọc dòng ổn định có sự tổng hợp axit béo tăng, gen chuyển mang lại kiểu hình có nicotin cao được đưa vào dòng tổng hợp axit béo tăng. Các vòng chọn lọc liên tiếp được khai thác, theo cách thông thường, để nhận dạng và chọn lọc dòng thuốc lá đồng phân tách cả hàm lượng nicotin cao lẫn hàm lượng đường cao. Hàm lượng nicotin và đường được phân tách bằng các phương pháp chuẩn.

Giống và cây trồng được coi là "sự nhân giống thuần" đối với tính trạng đặc biệt nếu nó có gen xác định tính trạng di truyền đối với tính trạng đó đến phạm vi mà, nếu giống hoặc cây trồng được tự thụ phấn, số lượng đáng kể quá trình phân tách độc lập tính trạng trong số thế hệ con không được thấy. Để đánh giá đặc tính nhân giống thuần của nguyên liệu trong phạm vi này, các chuyên gia trong việc nhân giống thuốc lá sẽ nhận ra rằng mức đường của lá thuốc lá thay đổi trong số các cây của dòng nhận dạng, vì cây trồng khác nhau không tiếp xúc với ánh sáng mặt trời giống nhau. Tính biến dị của lượng đường tồn tại ngay cả trong từng cây. Vì vậy, các lá thấp hơn thường bị che bởi các lá cao hơn, trong khi các cây ở các rìa luống thường hay nhận được nhiều ánh sáng mặt trời hơn các cây ở giữa luống. Vì các lý do đó, nói chung lượng đường tăng ở vị trí thân đi lên từ phần gốc đến ngọn. Nhờ quá trình thử nghiệm thông thường, người chọn giống có kỹ năng sẽ tính đến các điều đó và các lý do khác khi phát triển cây trồng và giống để, theo phương án của sáng chế là sự nhân giống thuần để được các mức nicotin cao và hàm lượng đường rất cao.

Theo một phương án khác, bất kỳ vị chất có thể có nào từ lượng nicotin tăng trong khối thuốc lá từ đối tượng sáng chế được giảm bằng cách bổ sung các lượng đường khử thích hợp vào đầu lọc thuốc lá. Thông thường các đường khử này được thêm vào vỏ thuốc lá dưới dạng xiro ngô fructoza, mật ong hoặc cam thảo. Thông

thường đạt được các kết quả tốt nhất để có các tỷ lệ đường với nicotin nằm trong khoảng 3,3 phần đường với 1 phần nicotin của đầu lọc thuốc tính theo trọng lượng khô (Status update of sugar/nicotine balance technology assessment (1992) RJ Reynolds documents, Bates512842551/2).

Tuy nhiên, tỷ lệ này có thể được điều chỉnh theo sở thích vị khói sao cho giới hạn tỷ lệ đường/nicotin nằm trong khoảng từ 3 đến 5. Như đã đề cập trước đó, độ pH của thuốc lá có TNR thấp và hàm lượng đường khử của đầu lọc của nó phải được xem xét khi điều chỉnh các chất phụ gia đường. Đối với phân tích này, hàm lượng nicotin trong thuốc lá được xác định bằng cách chiết và phân tích bằng phép sắc ký khí. Các mức đường trong thuốc lá tự nhiên được xác định bằng cách chiết và phân tích bằng phép sắc ký lỏng tính năng cao. Để thu được các lượng nicotin và đường tự nhiên tính theo trọng lượng khô, lượng đường bổ sung được xác định để đạt được tỷ lệ mong muốn.

Theo một phương án khác, các axit béo có thể được sử dụng như các chất đệm nicotin. Chẳng hạn, các axit myristic và palmitic có thể được thêm vào các đầu lọc thuốc lá để thực hiện chức năng như các chất đệm nicotin. Ngoài ra, các axit béo, như được thấy trong dầu ca cao mỡ bơ hoặc dầu dừa, có thể được thêm vào vỏ thuốc lá. Theo cách khác, cây thuốc lá có thể được cải biến di truyền để tạo ra các axit béo tăng trong các mô lá thuốc lá.

Sẽ được hiểu rằng các cây thuốc lá theo sáng chế không thể “chuyển gen”, nghĩa là không thể chứa các trình tự axit nucleic từ các sinh vật khác được đồng hoá trong hệ gen của chúng, còn các mức nicotin, đường hoặc các axit béo khác có thể được cải biến bằng cách tạo ra các cây hoặc tế bào thực vật nhờ sự phát sinh đột biến đích các trình tự axit nucleic đặc hiệu bằng cách đưa các axit nucleic gây kích thích cặp ADN hoặc quá trình tái tổ hợp (Beetham et al., 1999; Zhu et al., 2002; WO 03/013226), hoặc đưa các virus cải biến có thể tạo ra các kết quả cuối cùng giống như "thực vật chuyển gen có lượng nicotin tăng," "thực vật chuyển gen có lượng nicotin giảm," "thực vật chuyển gen có lượng đường tăng," và thực vật

chuyển gen có axit béo tăng được mô tả ở đây. Phương pháp "nhân giống chính xác" (công bố đơn yêu cầu cấp patent Mỹ số 20040107455), trong đó chỉ các trình tự axit nucleic thu được từ loài đích hoặc loài tương thích giới tính được đưa vào trong hệ gen của thực vật đích, có thể được sử dụng để tạo ra thực vật là "thực vật có lượng nicotin tăng," "thực vật có lượng nicotin giảm," "thực vật có lượng đường tăng," và thực vật có axit béo tăng được mô tả ở đây.

2. Thuốc lá có TNR thấp (bằng cách bổ sung nicotin từ thực vật chuyển gen có lượng nicotin tăng)

Khía cạnh thứ hai của sáng chế là phương pháp bổ sung nicotin hoặc phần chứa nicotin được chiết từ thực vật chuyển gen có lượng nicotin tăng, như được mô tả ở trên, vào thuốc lá thông thường hoặc thuốc lá có lượng nicotin giảm ở các mức cần thiết.

Các patent Mỹ 4.830.028; 4.836.224 và 5.031.646, mô tả quá trình cải biến đầu lọc thuốc lá bằng cách bổ sung các muối axit hữu cơ chứa nicotin. Đặc biệt, các tác giả sáng chế quan tâm đến việc bổ sung nicotin theo cách để làm giảm tỷ lệ hiệu suất nhựa-đối với-nicotin. Tạp chí của Brown and Williamson Tobacco Company in the Journal of the American Medical Association (volume 274, No.3, p. 228, 1995) mô tả Project Ariel bao gồm trong các patent Mỹ 3.258.015 và 3.356.094 (Battelle). Các patent này mô tả sol khí có nicotin bổ sung theo cách mà có thể giảm tỷ lệ hiệu suất nhựa- đối với-nicotin của thuốc lá theo sáng chế đến một phần tư của thuốc lá thông thường.

Các phần chứa nicotin, nicotin, hoặc muối nicotin của các axit hữu cơ thu được từ thực vật chuyển gen có lượng nicotin tăng được bổ sung vào thuốc lá thông thường hoặc thực vật chuyển gen có lượng nicotin giảm bằng cách phun hoặc sử dụng bất kỳ phương pháp nào khác đối với người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực kỹ thuật chế biến thuốc lá và các ứng dụng bổ sung, có hoặc không có propylen glycol hoặc bất kỳ dung môi nào khác, hoặc nước, để hoà tan, vào lá thuốc lá

nguyên vẹn hoặc mảnh thuốc lá cắt. Lượng nicotin mà cần được bổ sung để thu được thuốc lá TNR thấp có chức năng dưới đây: (1) hàm lượng nicotin và loại hỗn hợp thuốc lá được sử dụng-mảnh thuốc lá cắt trộn kiểu Mỹ thường chứa khoảng 2 đến 2,5 phần trăm nicotin, (2) các đặc điểm kỹ thuật của thanh thuốc lá, có quan tâm đến sự thông gió và các đặc tính xấp, (3) TNR mong muốn của thuốc lá, và (4) hiệu suất nhựa đặc hiệu được mong muốn.

Chẳng hạn, hãy cho rằng nhà sản xuất thuốc lá muốn tạo ra thuốc lá TNR thấp có lượng nhựa là 8mg và cũng là 1,2mg nicotin như các lượng của loại thuốc lá hương vị đậm của nó theo phương pháp FTC/ISO Method. Các lượng của loại hương vị đậm của nó là 16mg nhựa cho nên mục đích đối với TNR của thuốc lá loại mới là một phần nửa các lượng của loại thuốc lá hương vị đậm. Cũng mong muốn để sử dụng loại đầu lọc tương tự và sau đó thêm nicotin vào để tạo ra thuốc lá TNR thấp.

Lượng nicotin mà nhà sản xuất sẽ thêm vào ban đầu trong quá trình sản xuất sản phẩm với tỷ lệ các lượng là 8mg nhựa và khoảng hai lần 1,2mg nicotin nhiều bằng hàm lượng nicotin của đầu lọc của nó đối với thuốc lá loại hương vị đậm. Chuyên gia trong lĩnh vực kỹ thuật sẽ hiểu rằng sự thông gió nhiều hơn của thanh thuốc lá nhẹ sẽ giảm lượng nhựa ở tỷ lệ cao hơn không đáng kể so với lượng nicotin đến mức gấp đôi lượng nicotin ở đầu lọc có thể là quá nhiều một chút. Tuy nhiên, một lượng nicotin có thể bị hao hụt trong quá trình xử lý thuốc lá và các quy trình tạo ra điều thuốc lá, do đó lượng nicotin gấp đôi có thể được điều chỉnh. Tác động thời gian thuốc lá đó được lưu giữ sau khi bổ sung thêm nicotin, nhưng trước khi điều thuốc lá được tạo ra, cũng phải được đánh giá. Vì quy mô và loại quy trình là khác nhau đối với các nhà sản xuất, nên sẽ được hiểu rằng một số thử nghiệm và sai số có thể được tất yếu.

Thanh thuốc nhẹ thường có lượng nhựa là 8mg trên mỗi điều thuốc lá ban đầu có thể được nhà sản xuất chọn. Kết quả mong đợi là thuốc lá đó có lượng nhựa

là 8mg và nicotin là 1,2mg, bằng cách giảm bớt hơn một nửa lượng nhựa còn giữ lượng nicotin cũng như của thuốc lá hương vị đậm nhất.

Lượng thuốc lá chọn lọc, sau khi bổ sung nicotin, hoặc các muối nicotin của các axit hữu cơ, độ ẩm ở khoảng 13 phần trăm được cho vào trong phễu của máy cuốn thuốc lá. Tiếp theo máy cuốn thuốc chuyển các điều thuốc lá đã cuốn sang máy khác để cắm đầu lọc lên điều thuốc lá đã cuốn chưa có đầu lọc. Bước này được bỏ qua nếu sản xuất thuốc lá không đầu lọc.

Điều thuốc lá thành phẩm sau đó được thử nghiệm nhờ sử dụng phương pháp FTC/ISO Method sao cho các kết quả cuối cùng có thể được đánh giá. Nếu điều thuốc lá có các lượng nhựa là 8mg và nicotin là 1,2mg, (TNR là 6,66) và tất cả các lý do nêu trên được giải thích, tiếp theo quá trình xử lý được kết thúc. Nếu điều thuốc lá được đánh giá vị chất ở các nhóm trung tâm vì lượng nicotin tăng thêm, sau đó các chất phụ gia được thêm vào đầu lọc để giúp giảm bớt vấn đề.

Các điều chỉnh nhỏ có thể được thực hiện nếu các điều thuốc lá tạo ra lượng nhiều hơn hoặc ít hơn các lượng mong muốn. Các điều chỉnh bao gồm thay đổi một trong các thành phần của thanh thuốc lá. Một số thành phần của các thanh thuốc có thể được cải biến bằng cách thay đổi các loại đầu lọc, giấy cuốn thuốc lá, vỏ bao đệm, giấy cuốn đầu ngậm (phần gắn thanh thuốc lá với đầu lọc), các lỗ thông gió, và kết hợp các biến đổi tương ứng của chúng. Ví dụ, nếu thuốc lá hiện có 9mg nhựa và 1,3mg nicotin, quá trình lọc và/hoặc làm loãng được tăng nhẹ để giảm cả lượng nhựa lẫn lượng nicotin với tỷ lệ rất giống nhau. Điều này đạt được bằng cách định rõ cỡ và số lượng lỗ thông gió và tính chất xốp của vỏ bao đệm đầu lọc để đạt được lượng mong muốn. Nếu lượng nhựa là đích nhưng lượng nicotin cao hơn thấp hơn mong muốn, thì khi đó các lượng nicotin bổ sung có thể được điều chỉnh theo.

Hầu hết các loại thuốc lá có khoảng từ 10 phần trăm sợi thuốc lá hoàn nguyên trong các loại cao hơn giá quy định đến 30% trong các loại giảm giá ở đầu lọc điều thuốc lá cho dù nó là phần không cần thiết của đầu lọc. Phương án khác

của sáng chế là thêm nicotin vào phần hoàn nguyên của đầu lọc thuốc lá để thuốc lá có TNR thấp hơn. Việc điều chỉnh lượng nicotin bổ sung vào thuốc lá có TNR thấp là một biến số khác có thể được thực hiện bởi nhà sản xuất. Vì vậy, hàm lượng nicotin của đầu lọc là chức năng của hàm lượng nicotin của sợi thuốc lá cộng với hàm lượng nicotin của bất kỳ sợi thuốc lá hoàn nguyên nào trong đầu lọc, kể cả recon nicotin tăng và/hoặc recon nicotin giảm, hoặc cả hai. Bất kỳ kết hợp nào của ba loại này đều có thể được sử dụng.

Giấy 1975 từ Philip Morris Document Website (Bates 2056140416, Titled "Low Delivery Cigarettes and Increased Nicotine/Tar Ratios, A Replication") mô tả các kết quả từ bảng vị của thuốc lá có các tỷ lệ nicotin/ nhựa tăng. Đã thấy rằng thuốc lá có 10mg nhựa và tỷ lệ nicotin/nhựa là 0,09 (TNR tương đương là 11) là như nhau về độ đậm và tính chất có thể chấp nhận được với đối chứng Marlboro® hương vị đậm (ở thời điểm 18mg nhựa, 1,03mg nicotin, tỷ lệ nicotin/nhựa là 0,06), tương đương với TNR là 16,66.

Chuyên gia trong lĩnh vực sẽ hiểu rằng chiết nicotin từ thuốc lá tái tổ hợp có lượng nicotin tăng cho các phương án nêu trên sẽ tiết kiệm và hiệu quả hơn nhiều so với chiết từ thuốc lá thông thường vì ít cây sẽ phải nuôi trồng và xử lý để thu được lượng nicotin đủ.

3. Giảm Nitrosamin riêng có hại của sợi thuốc lá trong các sản phẩm thuốc lá

Đã biết rõ trong công nghiệp sản xuất thuốc lá là nitrosamin riêng có hại của sợi thuốc lá (TSNAs), thường được đề cập tới như là carcinogen của thuốc lá, chủ yếu tạo ra trong khi xử lý thuốc lá. Trong khi các TSNA khác có mặt trong thuốc lá, thì nói chung bốn loại được cho là có hại nhất là như dưới đây: N'-nitrosonornicotine (NNN), 4-(N-nitrosomethylamino)-1-(3-pyridyl)-1-butan-one (NNK), N'-nitrosoanatabin (NAT), N'-nitrosoanabasin (NAB). Các TSNA trong khi xử lý thuốc lá được tạo thành từ các tiền chất in minor alkaloid thứ yếu (Wiemik, et al., 1995, "Effect of air-curing on the chemical composition of tobacco", Recent Advances in

Tobacco Science, 21, 39-80). Như được sử dụng ở đây, nitrosamin riêng của sợi thuốc lá hoặc các TSNA được chọn từ nhóm dưới đây: NNN, NNK, NAT, và NAB.

Các TSNA chủ yếu được phân tích bằng phép sắc ký khí có dò phát quang hoá học, tiếp theo là chiết bằng dung môi (Charles Risner, et al., Quantification of Tobacco Specific Nitrosamines in Tobacco, Tobacco Science, 38 (1-6), 1994.). Phương pháp xen kẽ khác để tách và phân tích sử dụng quá trình chiết chất lưu siêu tới hạn có sắc ký khí/dò quang phổ khối (Siqing Song, et al., Supercritical fluid extraction and GC/MS for the analysis of tobacco-specific nitrosamines in cigarettes, Analytical Chemistry, 1999, 71, 1303-1308). Gần đây hơn, một phương pháp nhanh chóng nhờ sử dụng quá trình chiết bằng amoni axetat tiếp theo là sắc ký lỏng nhờ sử dụng phép phân tích phổ khối (MS/MS) được đề xuất (Karl Wagner, et al., The rapid and quantitative analysis of tobacco specific nitrosamines in whole tobacco and mainstream smoke using LC/MS/MS with positive ion electrospray, 55th Tobacco Science Research Conference 2001).

Mức nitrosamin thường có tương quan dương với hàm lượng nicotin vì thông thường các alkaloit có mặt theo tỷ lệ với hàm lượng nicotin. Nói chung, đối với hầu hết các giống cây thuốc lá *Nicotiana*, nicotin chiếm đến khoảng 90 phần trăm hàm lượng alkaloit tổng của cây. Vì vậy, phương án khác theo sáng chế là sử dụng cây thuốc lá chuyển gen có lượng nicotin giảm và bổ sung nicotin chiết, các muối nicotin thu được từ các axit hữu cơ (thu được cây thuốc lá cải biến di truyền hoặc thông thường có lượng nicotin tăng), hoặc nicotin tổng hợp, trong bazơ tự do hoặc kết hợp với các axit hữu cơ, để tạo ra điếu thuốc lá hoặc các sản phẩm thuốc lá khác hầu như không có nitrosamin hoặc các alkaloit thứ yếu, và còn có lượng nicotin bình thường. Phương pháp này được sử dụng với cây thuốc lá cải biến di truyền có lượng nicotin giảm bằng cách chỉ bổ sung một lượng nicotin đủ để tạo ra hiệu suất tương tự như các điếu thuốc thông thường được tạo ra bằng phương pháp FTC/ISO, ví dụ, từ 0,05 đến 1,5mg trên điếu thuốc.

Việc biến đổi di truyền hàm lượng alkaloit ở cây thuốc lá được tiến hành bằng cách biến đổi quinolat phosphoribosyl transferaza (QPT) và putresxin metyltransferaza (PMT). Fig.4 thể hiện mức độ alkaloit bao gồm Nor-Nicotin bị giảm do giảm QPRTaza ở giống cây burley để tạo ra giống cây chuyển gen có lượng alkaloit thấp gọi là Vector 21-41. Giống cây thuốc lá này chứa các lượng TSNA rất thấp. Giống cây Vector 21-41 bảo vệ bởi Plant Variety Protection Office và số bảo vệ giống cây là 200100039.

"Các dòng rễ biến nạp được tạo ra có hoạt tính PMT giảm rõ rệt, với mức giảm hàm lượng nicotin đồng thời so với các đối chứng" (Yupynn Chintapakorn and John D. Hamill, *Plant Molecular Biology* 53: 87-105, 2003. © 2003 Kluwer Academic Publishers. 87). Một trong số các alkaloit không quan trọng, nornicotin, có sự tương quan âm tính với chất lượng thuốc lá và vị thuốc lá ("Natural Tobacco Flavor", Roberts, D. L., *Recent Advances in Tobacco Science*, 14, pg. 49-81, 1988). Sản phẩm thuốc lá được tạo ra với nicotin là alkaloit duy nhất sẽ được chấp nhận cao hơn dựa vào riêng cơ sở này.

Cây thuốc lá có lượng nicotin giảm được sử dụng để thực hiện sáng chế nói chung là cây thuốc lá tái tổ hợp chứa và biểu hiện nucleotit không tương đồng, quá trình biểu hiện nucleotit không tương đồng đó điều chỉnh giảm enzym quinolat phosphoribosyl transferaza (QPT), putresxin metyltransferaza (PMTase), arginin decarboxylaza, omithin decarboxylaza, S-adenosyl-metionin synthetaza, NADH dehydrogenaza, hoặc phosphoribosylanthranilat isomeraza (PRAI) ở cây, và nhờ đó giảm bớt quá trình tạo ra nicotin ở cây. Thực vật tái tổ hợp thích hợp được M. Conkling et al., đề cập trong đơn PCT W098/56923 (công bố ngày 17.12, 1998) và M. Timko đề cập trong đơn PCT WO00/67558 (công bố ngày 16.11, 2000). Nói chung, nucleotit không tương đồng bao gồm ít nhất một đoạn axit nucleic mã hoá enzym được điều chỉnh giảm, cùng nghĩa hoặc đối nghĩa.

Tốt hơn nếu thuốc lá có lượng nicotin giảm còn chứa các lượng nitrosamin riêng của thuốc lá giảm (ví dụ, bằng ít nhất 90, 95 hoặc 99 phần trăm trọng lượng hoặc nhiều hơn) so với lượng được thấy ở thực vật không có các mức nicotin giảm tương ứng.

Theo một phương án khác của sáng chế là sử dụng thực vật tái tổ hợp có lượng nicotin giảm có mức biểu hiện quinolat phosphoribosyl transferaza (QPR Taza) giảm so với thực vật đối chứng không biến nạp, thực vật tái tổ hợp này bao gồm các tế bào thực vật tái tổ hợp chứa: cấu trúc ADN ngoại sinh bao gồm, theo hướng 5' đến 3', một gen khởi đầu có thể thao tác được trong tế bào thực vật này và ADN không tương đồng mã hoá ít nhất một đoạn của ARN thông tin quinolat phosphoribosyl transferaza ở thực vật, ADN không tương đồng này có thể liên kết động với gen khởi đầu nêu trên, và với ADN không tương đồng này theo hướng có nghĩa hoặc đối nghĩa; thực vật này thể hiện mức biểu hiện QPR Taza giảm so với thực vật đối chứng không biến nạp và hàm lượng nicotin giảm so với thực vật đối chứng không biến nạp.

Theo một phương án khác, sáng chế có thể được tiến hành bởi thực vật tái tổ hợp có lượng nicotin giảm có mức biểu hiện putresxin N-metyltransferaza (PMTaza) giảm so với thực vật đối chứng không biến nạp, thực vật tái tổ hợp này bao gồm các tế bào thực vật tái tổ hợp chứa: cấu trúc ADN ngoại sinh bao gồm, theo hướng 5' đến 3', một gen khởi đầu có thể thao tác được trong tế bào thực vật này và ADN không tương đồng mã hoá ít nhất một đoạn của ARN thông tin PMT ở thực vật, ADN không tương đồng này có thể liên kết động với gen khởi đầu nêu trên, và với ADN không tương đồng này theo hướng có nghĩa hoặc đối nghĩa; thực vật này thể hiện mức biểu hiện QPR Taza giảm so với thực vật đối chứng không biến nạp và hàm lượng nicotin giảm so với thực vật đối chứng không biến nạp. Các phương án khác nữa có thể được tiến hành theo cách tương tự với các enzym khác nêu trên.

Các cấu trúc axit nucleic như được mô tả ở trên có thể bao gồm các thành phần cách điện nằm trước (5' đến) và/hoặc nằm sau (3' đến) của cấu trúc được mô tả ở trên, như nêu trong (ví dụ) patent Mỹ các số 6.100.448 và 6.037.525 của Thompson et al. Ngoài ra, các cấu trúc như được mô tả ở trên có thể bao gồm các vùng gắn màng (hoặc giàn giáo) nằm trước và/hoặc nằm sau cấu trúc mô tả ở trên, như nêu trong (ví dụ) patent Mỹ các số 5.773.695 và 5.773.689 của Thompson et al.

Theo một phương án khác của sáng chế, thực vật được sử dụng chứa phần lớn các axit nucleic điều chỉnh giảm đa số các enzym trong quá trình tổng hợp nicotin. Lợi ích của việc sử dụng nhiều hơn một axit nucleic tái tổ hợp là các lượng nicotin có thể giảm tới một mức rất lớn (so với nếu chỉ một axit nucleic đó được sử dụng), có thể đến bằng 0, và các tỷ lệ alkaloit mong muốn khác (ví dụ, tỷ lệ nicotin với các alkaloit tổng) có thể được điều chỉnh thích hợp, nếu được ưu tiên.

Vì vậy, phương án khác của sáng chế là sử dụng thực vật tái tổ hợp có lượng nicotin giảm mà có mức biểu hiện cả QPRTaza và PMTaza giảm so với thực vật đối chứng không biến nạp, thực vật tái tổ hợp này bao gồm các tế bào thực vật tái tổ hợp chứa: (i) cấu trúc ADN ngoại sinh bao gồm, theo hướng 5' đến 3', một gen khởi đầu có thể thao tác được trong tế bào thực vật này và ADN không tương đồng mã hoá ít nhất một đoạn của ARN thông tin quinolat phosphoribosyl transferaza ở thực vật, ADN không tương đồng này có thể liên kết động với gen khởi đầu nêu trên; và (ii) cấu trúc ADN ngoại sinh bao gồm, theo hướng 5' đến 3', một gen khởi đầu có thể thao tác được trong tế bào thực vật này và ADN không tương đồng mã hoá ít nhất một đoạn của ARN thông tin PMT ở thực vật, ADN không tương đồng này có thể liên kết động với gen khởi đầu nêu trên, và với ADN không tương đồng này theo hướng có nghĩa hoặc đối nghĩa; thực vật này thể hiện mức biểu hiện PMT giảm so với thực vật đối chứng không biến nạp và hàm lượng nicotin giảm so với thực vật đối chứng không biến nạp. Sẽ được đánh giá rằng, trong đó quá trình điều chỉnh giảm có nghĩa hoặc đối nghĩa được mô tả ở đây, các kỹ thuật khác như sử dụng sự nhắc lại nghịch đảo để tạo ra ARN sợi kép kích thích làm bất hoạt gen, các

ribozym, hoặc ức chế ARN thông tin bổ trợ có thể được sử dụng. Cũng sẽ được đánh giá rằng cấu trúc ADN đơn có thể được sử dụng để giảm hoạt tính của nhiều hơn một enzym. Ví dụ, một cấu trúc ADN có thể được sử dụng để giảm cả QPRTaza và PMTaza.

Các ví dụ về các trình tự axit nucleic có thể được sử dụng để thực hiện sáng chế bao gồm, nhưng không giới hạn ở, ADN mã hoá gen quinolat phosphoribosyl transferaza ở cây thuốc lá (NtQPTI); (ví dụ xem đơn PCT có số công bố WO98/5556923 của Conkling et al.); ADN mã hoá putresxin N- methyltransferaza ở cây thuốc lá như PMT1, PMT2, PMT3 và PMT4; ADN mã hoá arginin decarboxylaza ở cây thuốc lá như ADC1 và ADC2; ADN mã hoá ornithin decarboxylaza ở cây thuốc lá (ODC); ADN mã hoá S-adenosylmethionin synthetaza ở cây thuốc lá (SAMS); ADN mã hoá NADH dehydrogenaza ở cây thuốc lá, và ADN mã hoá phosphoribosylantranilat isomeraza (PRAI) (là đã biết và được mô tả trong đơn PCT có số công bố WO00/67558 của M. Timko et al.).

Các điều kiện cho phép các trình tự ADN khác mã hoá để biểu hiện protein có hoạt tính enzym mong muốn như được mô tả ở trên để lai với ADN như được mô tả ở trên, hoặc với các trình tự ADN khác mã hoá enzym protein như nêu trên, có thể được xác định theo cách thông thường. Ví dụ, quá trình lai các trình tự này có thể được tiến hành trong các điều kiện ít nghiêm ngặt hoặc ngay cả trong các điều kiện nghiêm ngặt (ví dụ, các điều kiện được thể hiện bởi tính nghiêm ngặt khi rửa bằng NaCl 0,3M, 0,03M natri xitrat, SDS 0,1% ở 60°C hoặc thậm chí 70°C đối với ADN mã hoá protein nêu trên trong thử nghiệm lai chuẩn tại chỗ. Xem J. Sambrook et al., *Molecular Cloning, A Laboratory Manual* (2d Ed. 1989, Cold Spring Harbor Laboratory). Nói chung, các trình tự này sẽ có độ tương đồng ít nhất là 65% , 75%, 80%, 85%, 90%, hoặc thậm chí 95%, hoặc nhiều hơn, bằng trình tự nêu trên, hoặc các trình tự ADN mã hoá các protein nêu trên. (Các quá trình xác định tính tương đồng trình tự được thực hiện bằng hai trình tự sắp thẳng hàng để thích hợp nhất. Được ưu tiên là các chiều dài khuyết đoạn bằng 10 hoặc nhỏ hơn, ưu tiên hơn nữa là

các chiều dài khuyết đoạn bằng 5 hoặc nhỏ hơn, và các chiều dài khuyết đoạn bằng 2 hoặc nhỏ hơn còn được ưu tiên hơn nữa.)

Trình tự không tương đồng được sử dụng trong các phương pháp theo sáng chế được chọn để tạo ra sản phẩm ARN hỗ trợ cho vật mang tin nguyên vẹn mã hoá trình tự enzym, hoặc cho một phần của chúng. Trình tự này có thể hỗ trợ cho bất kỳ trình tự kế nào của ARN thông tin tự nhiên, nghĩa là, nó có thể hỗ trợ cho trình tự ARN thông tin nội sinh ở đầu gần các đầu - hoặc điểm chặn 5', nằm sau từ điểm chặn, giữa điểm chặn và codon khởi đầu và có thể phủ toàn bộ hoặc chỉ một phần của vùng không mã hoá, có thể liên kết cầu với vùng không mã hoá và mã hoá, hỗ trợ cho tất cả hoặc một phần của vùng mã hoá, hỗ trợ cho đầu 3'- của vùng mã hoá, hoặc hỗ trợ cho vùng không dịch mã 3'- của ARN thông tin. Các trình tự đối nghĩa thích hợp có thể bắt đầu từ ít nhất khoảng 12, 14 hoặc 15 đến khoảng 15, 25, hoặc 35 nucleotit, ít nhất khoảng 50 nucleotit, ít nhất khoảng 75 nucleotit, ít nhất khoảng 100 nucleotit, ít nhất khoảng 125 nucleotit, ít nhất khoảng 150 nucleotit, ít nhất khoảng 200 nucleotit, hoặc nhiều hơn. Ngoài ra, các trình tự có thể được mở rộng hoặc rút ngắn bằng các đầu 3' hoặc 5' của chúng (ví dụ, bằng cách bổ sung 1 đến 4 hoặc 8 gốc axit nucleic). Sản phẩm đối nghĩa có thể hỗ trợ cho các phần mã hoá hoặc không mã hoá (hoặc cả hai) của ARN đích xuất hiện tự nhiên. Trình tự đối nghĩa đặc biệt và chiều dài của trình tự đối nghĩa sẽ thay đổi tùy thuộc vào mức độ ức chế mong muốn, độ ổn định của trình tự đối nghĩa, và các vấn đề tương tự. Người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực kỹ thuật này sẽ được chỉ dẫn theo cách lựa chọn các trình tự enzym đối nghĩa thích hợp nhờ sử dụng các kỹ thuật có thể sử dụng trong lĩnh vực kỹ thuật và thông tin được cung cấp ở đây.

Như đã nêu trên, sáng chế cũng có thể được thực hiện với các cây tạo ra sự cùng ức chế có nghĩa quá trình tạo ra nicotin. Các ADN có nghĩa được sử dụng để thực hiện sáng chế có chiều dài đủ để khi biểu hiện trong tế bào cây có thể ức chế quá trình biểu hiện tự nhiên của enzym ở cây như được mô tả ở đây trong tế bào cây đó. Các ADN có nghĩa này về cơ bản có thể là một ADN của hệ gen hoàn chỉnh

hoặc ADN bổ trợ mã hoá enzym, hoặc một phần của chúng với các phần thường có chiều dài ít nhất là 15 nucleotit. Các phương pháp xác định chiều dài của ADN có nghĩa tạo ra sự ức chế quá trình biểu hiện của gen tự nhiên trong tế bào có thể đã biết đối với chuyên gia trong lĩnh vực kỹ thuật. Sáng chế cũng có thể được thực hiện với các cây chứa các ADN mã hoá các ARN sợi kép bao gồm các trình tự bổ trợ có nghĩa và đối nghĩa mà khi biểu hiện có khả năng ức chế hoặc làm câm các gen nội sinh chứa các trình tự. Các vùng bổ trợ thích hợp có thể bắt đầu từ ít nhất khoảng 20 đến 25 nucleotit và có thể tách ra bởi ít nhất khoảng 5 nucleotit.

Theo một phương án khác nữa của sáng chế, các tế bào cây *Nicotiana* được biến nạp bằng cấu trúc ADN chứa đoạn ADN mã hoá phân tử ARN enzym (ví dụ, "ribozym"), phân tử ARN enzym này trực tiếp chống lại quá trình phiên mã (ví dụ, phân cắt) ARN thông tin của ADN mã hoá enzym thực vật như được mô tả ở đây. Các ribozym chứa các vùng gắn kết chất nền liên kết các vùng có thể sử dụng được của ARN thông tin đích, và các miền xúc tác quá trình phân cắt ARN, ngăn chặn quá trình dịch mã và sản sinh protein. Các miền gắn kết có thể chứa các trình tự đối nghĩa bổ trợ cho trình tự ARN thông tin đích; motif xúc tác có thể là motif đầu búa hoặc các motif khác, như motif chữ chi. Các điểm phân cắt ribozym trong đích ARN có thể được nhận dạng lúc đầu bằng cách chụp cắt lớp phân tử đích đối với các điểm phân cắt ribozym (ví dụ, các trình tự GUA, GUU hoặc GUC). Khi nhận dạng, các trình tự ARN ngắn chứa 15, 20, 30 hoặc nhiều ribonucleotit tương ứng với vùng gen đích chứa điểm phân cắt có thể được đánh giá về các đặc điểm cấu trúc dự đoán. Sự thích hợp của các đích ứng cử cũng có thể được đánh bằng cách thử nghiệm tính có thể sử dụng được với quá trình lai bằng các oligonucleotit bổ trợ, nhờ sử dụng các thử nghiệm bảo vệ ribonucleaza đã biết trong lĩnh vực kỹ thuật. ADN mã hoá các phân tử ARN enzym có thể được tạo ra bằng các kỹ thuật đã biết. Xem, ví dụ, T. Cech et al., patent Mỹ số 4.987.071; Donson et al., patent Mỹ số 5.589.367; Torrence et al., patent Mỹ số 5.583.Q32; Joyce, patent Mỹ số 5.580.967; Wagner et al., patent Mỹ số 5.591.601; và patent Mỹ số 5.622.854. Quá trình tạo ra phân tử ARN enzym này trong tế bào thực vật và làm đứt quãng quá

trình tạo ra enzym protein làm giảm hoạt tính enzym trong các tế bào thực vật về bản chất là theo cách tương tự như quá trình tạo ra phân tử ARN đối nghĩa: nghĩa là, bằng cách làm đứt quãng quá trình dịch mã ARN thông tin trong tế bào tạo ra enzym. Thuật ngữ “ribozym” được sử dụng ở đây để mô tả axit nucleic chứa ARN hoạt động như một enzym (như một endoribonucleaza), và có thể được sử dụng thay thế cho nhau với “phân tử ARN enzym”.

Theo một phương án khác của sáng chế, việc điều chỉnh giảm quá trình tạo ra nicotin có thể đạt được bằng cách sử dụng quá trình ức chế dịch mã của ARN thông tin nhờ ARN thông tin bổ trợ nhiều, như nêu trong patent Mỹ số 5.272.065.

Để tạo ra cây thuốc lá có các mức enzym giảm, và nhờ đó có lượng nicotin thấp hơn so với cây thuốc lá đối chứng không biến nạp, tế bào thuốc lá có thể được biến nạp bằng đơn vị phiên mã ngoại sinh chứa một phần trình tự axit nucleic của enzym, trình tự axit nucleic của enzym có chiều dài đầy đủ, theo hướng cùng nghĩa hoặc đối nghĩa với các trình tự điều hoà liên kết động thích hợp hoặc một trình tự mã hoá ribozym như được mô tả ở trên. Các trình tự điều hoà thích hợp bao gồm trình tự bắt đầu phiên mã (“gen khởi đầu”) có thể thao tác được ở thực vật được biến nạp, và trình tự kết thúc quá trình polyadenylat hoá/phiên mã. Các kỹ thuật chuẩn, như vẽ bản đồ giới hạn, lai hoá thẩm tách Nam, và phân tích trình tự nucleotit, sau đó được sử dụng để nhận dạng các dòng vô tính mang các trình tự enzym theo hướng đối nghĩa, liên kết động với các trình tự điều hoà. Cây thuốc lá sau đó được tái sinh từ các tế bào biến nạp thành công. Được ưu tiên nhất là trình tự đối nghĩa sử dụng để bổ trợ cho trình tự nội sinh, tuy nhiên, các biến đổi nhỏ trong các trình tự nội sinh và ngoại sinh có thể được chấp nhận. Được ưu tiên là trình tự ADN đối nghĩa có điểm tương tự với trình tự đầy đủ ở chỗ có khả năng liên kết với trình tự nội sinh ở tế bào cần điều hoà, trong các điều kiện nghiêm ngặt như được mô tả dưới đây. Các kỹ thuật đặc biệt để tạo ra cây thuốc lá tái tổ hợp là đã biết đối với chuyên gia trong lĩnh vực kỹ thuật và được giải thích chi tiết hơn trong M. Conkling

et al., PCT Application WO98/56923 (công bố ngày 17 tháng 12, 1998) và trong M. Timko, PCT Application WO00/67558 (công bố ngày 16 tháng 11, 2000), nêu trên.

Giống cây thuốc lá nicotin, Vector Burley 21-41, được phát triển bằng cách cải tiến di truyền Burley 21 LA như được mô tả trong patent Mỹ số 6.586.661. Burley 21 LA là giống cây thuộc Burley 21 có các mức nicotin cơ bản giảm do với Burley 21 (ví dụ, Burley 21 LA có 8% các mức nicotin Burley 21, xem Legg et al., (1971) Can. J. Venet. Cytol. 13: 287-91; Legg et al., (1969) J. Hered. 60: 213-17). Vector Burley 21-41 giống nhất giống gốc, Burley 21 LA. Nói chung, Vector Burley 21-41 giống với Burley 21 LA ở tất cả các đặc tính đánh giá, ngoại trừ hàm lượng alkaloit (ví dụ, nicotin và nornicotin). Vector Burley 21-41 có thể được phân biệt với Burley 21 LA gốc bởi hàm lượng nicotin, nicotin và các alkaloit tổng của nó về cơ bản giảm.

Như thể hiện trên Fig.4, các nồng độ alkaloit tổng trong Vector 21-41 bị giảm xuống gần 10 phần trăm của các mức trong Burley 21 LA gốc. Các nồng độ nicotin và không phải nicotin tương ứng ít hơn khoảng 6,7% và 32% trong Vector Burley 21-41 khi so sánh với Burley 21 LA. Các mức QPRTaza tương quan dương với nicotin và các alkaloit khác trong thuốc lá bao gồm anabasin và anatabin, nó lần lượt tạo ra NAB và NAT. Xem Fig.5.

Theo một phương án khác nữa của sáng chế là bổ sung một lượng nicotin, hoặc các muối nicotin của các axit hữu cơ, và các chất tương tự như nicotin (so với thuốc lá thông thường) vào thuốc lá có lượng nicotin giảm để tạo ra các sản phẩm thuốc lá có các TNSA giảm. Các phương pháp thông thường đối với chuyên gia trong lĩnh vực kỹ thuật xử lý thuốc lá, bao gồm việc sử dụng các chất phụ gia thuốc lá và các chất hương liệu, được sử dụng để bổ sung nicotin vào các sản phẩm thuốc lá này.

Phương án khác của sáng chế là bổ sung một lượng nicotincòn lớn hơn rất nhiều vào thuốc lá có lượng nicotin giảm (so với thuốc lá thông thường) để tạo ra

điều thuốc lá có TNR thấp. Lợi ích chính của phương pháp này là hầu như không có nitrosamin tạo ra đối với thuốc lá khi thuốc lá đang xử lý vì thiếu nicotin hoặc các alkaloit thứ yếu. Các điều thuốc lá được tạo ra bằng phương pháp này không chỉ có các lợi ích của các điều thuốc lá TNR thấp, mà hầu như còn không chứa nitrosamin hoặc các alkaloit thứ yếu nếu QPRT được giảm hoặc loại bỏ. Phương án khác của sáng chế là sử dụng thuốc lá có lượng nicotin giảm và sau đó bổ sung nicotin sao cho lượng nicotin thông thường có mặt đối với các sản phẩm dưới đây: chất độn hoặc giấy cuốn thuốc lá, thuốc lá tự cuốn, thuốc lá hút bằng tẩu, thuốc lá nhai, thuốc lá bột, thuốc lá hoàn nguyên, và các loại thuốc lá không khói khác. Lợi ích ở chỗ các sản phẩm này có TSNA và/hoặc các alkaloit thứ yếu của thuốc lá cực kỳ thấp.

4. Quy trình tạo ra thuốc lá giãn nở cải tiến hoặc xốp nhờ sử dụng thuốc lá chuyển gen có lượng nicotin tăng

Hơn 150 patent được đưa ra liên quan đến quá trình làm giãn nở thuốc lá (ví dụ, patent Mỹ số 3.991.772). Quá trình giãn nở tạo ra khả năng làm đầy lớn hơn của thuốc lá để trọng lượng thuốc lá được sử dụng trong điều thuốc lá ít hơn. Lợi ích của việc sử dụng thuốc lá giãn nở là lượng nhựa được giảm. Thuốc lá giãn nở đặc biệt được sử dụng để làm tạo ra các điều thuốc lá có lượng nhựa thấp. Các điều thuốc lá Carlton®, được bảo hộ vì nó là thuốc lá có lượng nhựa và nicotin thấp nhất, được tạo ra theo báo cáo có tỷ lệ thuốc lá giãn nở rất lớn. Tuy nhiên, việc sử dụng thuốc lá giãn nở cũng làm giảm lượng nicotin, nó có thể tạo ra sự đền bù.

Lợi ích chính của thuốc lá chuyển gen giãn nở có lượng nicotin tăng là ở chỗ thuốc lá này tạo ra lượng nhựa giảm trong khi gần như duy trì được lượng nicotin, tạo ra điều thuốc lá có lượng nhựa giảm và TNR giảm. Ví dụ, hỗn hợp thuốc lá kết hợp nicotin tăng từ thuốc lá chuyển gen có thể cung cấp 16mg nhựa và 2,0mg nicotin. Làm giãn nở thuốc lá này 100% sẽ tạo ra chất độn thuốc lá, nó chiếm khoảng một nửa trọng lượng của thuốc lá không giãn nở, nhưng nó chiếm thể tích

tương tự trong điều thuốc lá. Lượng khói của điều thuốc lá này sẽ nằm trong khoảng 8mg nhựa và 1,0mg nicotin với TNR là 8, không có sự thông gió của đầu lọc thuốc lá.

Bất kỳ phương pháp nào để làm giãn nở thuốc lá đã biết trong lĩnh vực kỹ thuật đều có thể được sử dụng trong sáng chế. Ngày nay phương pháp thông thường nhất được sử dụng kết hợp với cacbon dioxit dạng lỏng (patent Mỹ các số 4.340.073 và 4.336.814). Propan dạng lỏng cũng được sử dụng để tạo ra các điều thuốc lá thương phẩm, chủ yếu là ở châu Âu (patent Mỹ số 4.531.529). Propan dạng lỏng có các lợi ích so với cacbon dioxit vì có thể có các mức độ làm giãn nở cao hơn, trong khoảng 200%. Dưới áp suất, cacbon dioxit dạng lỏng (hoặc propan dạng lỏng) ngấm vào cấu trúc tế bào thuốc lá. Nếu thuốc lá được gia nhiệt nhanh thì cacbon dioxit (hoặc propan dạng lỏng) làm giãn nở tế bào trở lại kích cỡ đã xử lý trước của nó.

Phương án của sáng chế là sử dụng thuốc lá chuyển gen có lượng nicotin tăng, tốt hơn là loại thuốc lá mà được tạo ra từ gốc axit béo cao và/hoặc đường cao và tạo ra thuốc lá giãn nở từ thuốc lá chuyển gen để tạo ra điều thuốc lá có TNR thấp.

Phương án khác để sử dụng thuốc lá loại protein, tốt hơn là được chiết từ thuốc lá chuyển gen có lượng nicotin giảm, và tạo ra thuốc lá giãn nở từ thuốc lá loại protein này. Điều thuốc lá chứa thuốc lá giãn nở loại protein và thuốc lá chuyển gen có lượng nicotin tăng được tạo ra.

5. Quá trình tạo ra thuốc lá hoàn nguyên

Phương án khác của sáng chế là tạo ra các sản phẩm thuốc lá có độ phơi nhiễm giảm, các sản phẩm này bao gồm các điều thuốc lá có TNR thấp, bằng cách sử dụng các sáng chế trước đó theo mục 1-3 nêu trên, sợi thuốc lá loại protein, và

thuốc lá làm khô ở nhiệt độ thấp trong bất kỳ hỗn hợp nào và kết hợp với thuốc lá hoàn nguyên.

Quy trình để tạo ra các lá thuốc lá hoàn nguyên ("recon") bắt đầu trong các năm 1950. Patent Mỹ các số mô tả các quy trình đó bao gồm: 3.499.454, 4.182.349, 4.962.774, và 6.761.175. Recon được tạo ra theo cách truyền thống từ các thân cây thuốc lá và/hoặc các mảnh lá nhỏ hơn gần giống với quy trình tạo ra giấy thông thường. Các hiệu suất nhựa và nicotin của thuốc lá hoàn nguyên thấp hơn hiệu suất từ các khối lượng tương đương của lá thuốc lá nguyên vẹn. Quy trình này đòi hỏi việc xử lý các phần thuốc lá khác nhau để tạo thành Recon. Sau khi các lá Recon được tạo ra chúng được cắt thành cỡ và hình dạng giống với thuốc lá mảnh cắt từ lá thuốc lá nguyên vẹn. Recon đã cắt này sau đó được trộn với thuốc lá mảnh cắt và sẵn sàng để tạo ra điếu thuốc lá.

Các điếu thuốc lá được tạo ra với tất cả recon, không có recon, hoặc bất kỳ hỗn hợp nào của chúng. Hầu hết các loại thuốc lá chủ yếu có ít nhất Recon trong đầu lọc.

Lợi ích chính của thuốc lá chuyển gen có lượng nicotin tăng sử dụng cho recon là ở chỗ thuốc lá này sẽ giảm hiệu suất nhựa của các điếu thuốc lá, trong khi giữ được hiệu suất nicotin.

Một phương án khác của sáng chế là việc bổ sung nicotin, hoặc các muối nicotin vào để tạo ra recon, mà được tạo ra từ thuốc lá chuyển gen có lượng nicotin giảm hoặc bất kỳ nguyên liệu nào không phải là thuốc lá bao gồm nhưng không giới hạn ở các chất pha trộn thảo mộc sao cho khi lá hoàn nguyên này được đốt cháy nó có hiệu suất về cơ bản ít hơn các nitrosamin riêng của thuốc lá và các tác nhân gây ung thư được tạo ra từ các điếu thuốc lá thông thường, còn có mặt cả các lượng nicotin thoả mãn.

Một phương án khác của sáng chế là sử dụng thuốc lá chuyển gen có lượng nicotin tăng, tốt hơn là loại thuốc lá này được tạo ra từ gốc axit béo cao và/hoặc đường cao và tạo ra recon từ thuốc lá chuyển gen này để tạo ra điếu thuốc lá có TNR thấp. Một phương án khác làm tăng hàm lượng đường, hàm lượng axit béo, hoặc cả hai của recon trong quá trình xử lý.

Recon từ sợi thuốc lá

Các patent mô tả các quy trình loại bỏ các protein khỏi thuốc lá, nhờ đó tạo ra "sợi thuốc lá loại protein" như được mô tả trong patent Mỹ các số 4.289.147 và 4.347.324. Sợi thuốc lá là sản phẩm phụ chính sau khi loại bỏ protein. Sợi còn lại của thuốc lá loại protein có thể bao gồm với bất kỳ tỷ lệ nào như một thành phần của thuốc lá hoàn nguyên. Các điếu thuốc lá được tạo thành từ thuốc lá loại protein có vị khác với các điếu thuốc lá thông thường. Tuy nhiên, các lượng chất phụ gia thích hợp, bao gồm chất tạo hương vị và nicotin, có thể được bổ sung vào để giúp làm giảm bớt sự thiếu hụt vị.

Các điếu thuốc lá chứa thuốc lá loại proteinin có lợi ích đáng kể so với các điếu thuốc lá thông thường vì chúng sẽ tạo ra các mức carxinogen và các sản phẩm đốt cháy giảm. "Hàm lượng protein giảm 71% trong lá thuốc lá đã xử lý bằng hơi làm giảm 81% tính gây đột biến TA98 Ames" của phần ngưng nhiệt phân (Clapp, W.L., et al., "Reduction in Ames Salmonella mutagenicity of cigarette mainstream smoke condensate by tobacco protein removal", Mutation Research, 446, pg 167-174, 1999). Nghiên cứu trước đó trong phạm vi này đã xác định rằng protein trong lá thuốc lá có thể là tiền chất chính của các chất gây đột biến trong phần ngưng khói thuốc lá (Matsumoto, et al., "Mutagenicities of the pyrolysis of peptides and proteins", Mutation Research, 56, pg 281-288, 1978).

Sợi thuốc lá chiết từ thuốc lá cải biến di truyền có lượng nicotin giảm (ví dụ, Vật truyền 21-41) loại bỏ hữu hiệu hầu như toàn bộ các TSNA gây ung thư như

thuốc lá, vì nitrosamin phụ thuộc tương đối với các nồng độ nicotin và các alkaloit để tạo thành ở các mức có thể dò được. Xem Fig.4

Vì vậy, thuận lợi khi sử dụng thuốc lá có lượng nicotin giảm trong các điều thuốc lá có độ phơi nhiễm giảm hoặc các sản phẩm thuốc lá khác để giảm hơn nữa nitrosamin. Nicotin hoặc để sót lại hoặc đưa vào sau trong quy trình, cũng có thể dưới dạng các muối nicotin.

Các hydrocacbon thơm nhiều vòng (PAHs) được tạo ra từ sự nhiệt phân nhiệt độ cao của các axit amin, đường, parafin, terpen, sterol thực vật, xenluloza và các thành phần khác của thuốc lá. Hầu hết các thành phần này rất được giảm trong sợi thuốc lá, giảm hữu hiệu quá trình tạo ra PAHs. Catechol và phenol, các đồng nhân tô gây ung thư được thừa nhận trong khói thuốc, cũng sẽ bị giảm vì các mức đường hoà tan có mặt trong sợi thuốc lá thấp.

Các hợp chất pha khí có hại như hydro xyanua, nitơ oxit, và cacbon monoxit cũng giảm khi điều thuốc lá chỉ chứa sợi thuốc lá được hút so với các điều thuốc lá được tạo ra bằng toàn bộ lá thuốc lá. Hydro xyanua được tạo thành do thiêu cháy các protein và clorophyl. Nitơ oxit được tạo thành do đốt cháy protein, clorophyl, nitrat, và alkaloit tan được. Các thành phần đó sẽ không có mặt với các lượng đáng kể trong thuốc lá loại protein. Sợi thuốc lá có khoảng gần 85 phần trăm tinh bột và chất xenluloza vì vậy giảm được các tiền chất nhiệt phân chính của cacbon monoxit.

Theo một phương án khác, sáng chế đề cập đến việc tạo ra thuốc lá hoàn nguyên bao gồm sợi thuốc lá chiết thu được từ thuốc lá thông thường, thuốc lá chuyển gen chứa lượng nicotin giảm, hoặc thuốc lá chuyển gen chứa lượng nicotin tăng.

Recon từ thuốc lá làm khô ở nhiệt độ thấp

Nếu quy trình xử lý thuốc lá bị hỏng, hầu như không có các TSNA có mặt trong các sản phẩm thuốc lá truyền thống như các điều thuốc lá, đầu lọc thuốc lá

hoặc lá áo điều xì gà, thuốc lá tự cuốn, thuốc lá hút bằng tẩu, thuốc lá nhai, thuốc lá bột, thuốc lá hoàn nguyên và các loại thuốc lá được tạo ra từ thuốc lá làm khô ở nhiệt độ thấp sẽ hầu như không chứa không khí khác và TSNA vì các quy trình xử lý truyền thống bị loại bỏ.

Theo một phương án khác, sáng chế đề xuất quá trình loại bỏ thực sự các TSNA nhờ xử lý thuốc lá mới thu hoạch bằng phương pháp làm đông khô nhanh. Quá trình này được thực hiện bằng cách xử lý thuốc lá mới thu hoạch nhờ các đơn vị làm khô ở nhiệt độ thấp nằm ở gần các trang trại thuốc lá. Thuốc lá xử lý theo cách này có thể được trồng theo cách truyền thống với khoảng cách giữa các cây hoặc theo cách bố trí sinh khối. Ngoài các lợi ích về kinh tế là bớt được chi phí liên quan đến quá trình xử lý, hiện nay thuốc lá có thể được trồng theo cách sinh khối có thể tạo ra hàng trăm nghìn pao thuốc lá tươi trên một mẫu Anh.

Bằng cách trồng cây thuốc lá theo môi trường sinh khối và làm khô ở nhiệt độ thấp ngay thuốc lá tươi dành cho các điều thuốc lá, thuốc lá tự cuốn, thuốc lá hút bằng tẩu, đầu lọc thuốc lá hoặc lá áo điều xì gà, thuốc lá nhai, thuốc lá bột, và các loại thuốc lá không khói khác, nhân công được giảm bớt không chỉ bằng cách bỏ việc đem từng cây trong nhà kính trồng lại ngoài cánh đồng mà còn loại bỏ được quá trình thu hoạch và xử lý thuốc lá theo cách truyền thống. Ngoài ra, đất trồng trọt cần cho mục đích này được giảm bớt rất nhiều. Sản lượng thuốc lá từ một mẫu Anh thuốc lá trồng theo cách bố trí sinh khối gần tương đương với 100 mẫu Anh thuốc lá trồng theo cách truyền thống.

"Sinh khối thuốc lá" thu được bằng cách gieo trực tiếp nhiều hạt cây thuốc lá lên một mẫu Anh đất trong một vài in-sơ trên một cánh đồng. Cây thuốc lá khác được trồng theo khoảng cách truyền thống, các cây thuốc lá riêng rẽ không cao hơn có thể được phân biệt khi cây thuốc lá được trồng theo kiểu sinh khối. Một mẫu Anh sinh khối thuốc lá có vẻ bên ngoài của tấm thảm xanh, rậm rạp, liên tiếp. Công bố đơn yêu cầu cấp patent Mỹ số 20020197688 mô tả các phương pháp này.

Quá trình làm đông khô nhanh loại bỏ hầu hết nước ($\approx 80\%$) từ khối lượng của sinh khối thuốc lá mới thu hoạch. Kết quả là thuốc lá làm khô ở nhiệt độ thấp (Freeze Dried Tobacco) ("FDT"). FDT được dễ dàng nghiền thành các hạt mịn thích hợp cho để xử lý thành lá thuốc lá hoàn nguyên (recon). Recon này có thể được cắt và tạo thành bất kỳ loại sản phẩm thuốc lá nào như đầu lọc cho các điếu thuốc lá, thuốc lá tự cuốn, thuốc lá hút bằng tẩu, đầu lọc thuốc lá hoặc lá áo điếu xì gà, thuốc lá nhai, thuốc lá bột, và các loại thuốc lá không khói khác. Hương vị và các chất phụ gia, kể cả đường, có thể được đưa vào quá trình xử lý recon.

Recon này có thể được tạo ra từ 100 phần trăm FDT hoặc theo tỷ lệ bất kỳ nào mà người tiêu dùng thích hơn. Quy trình làm đông khô nhanh có thể có các tác dụng bất lợi đối với hương vị của các sản phẩm thuốc lá đó. Vì vậy, FDT có thể còn được trộn theo bất kỳ tỷ lệ nào với thuốc lá được xử lý, nghiền theo truyền thống, sao cho hỗn hợp có thể được tạo thành thuốc lá hoàn nguyên. Theo cách khác, FDT có thể được trộn theo bất kỳ tỷ lệ nào với bất kỳ dạng thuốc lá truyền thống nào giúp tạo ra các điếu thuốc lá, thuốc lá tự cuốn, thuốc lá hút bằng tẩu, đầu lọc thuốc lá hoặc lá áo điếu xì gà, thuốc lá nhai, thuốc lá bột, và các loại thuốc lá không khói khác để làm thỏa mãn sở thích của thị trường đại chúng.

Theo một phương án khác của sáng chế là sử dụng thuốc lá cải biến di truyền có lượng nicotin giảm để giảm các TSNA như được mô tả ở trên, nhờ đó tăng lợi ích của các điếu thuốc lá này, thuốc lá tự cuốn, thuốc lá hút bằng tẩu, đầu lọc thuốc lá hoặc lá áo điếu xì gà, thuốc lá nhai, thuốc lá bột, và các loại thuốc lá không khói khác không gây nghiện hoặc không chứa bất kỳ nitrosamin nào.

Theo một phương án khác của sáng chế để bổ sung nicotin, với các lượng tạo ra đáp ứng sinh lý mong muốn, hỗ trợ FDT để sử dụng trong các điếu thuốc lá, đầu lọc thuốc lá hoặc lá áo điếu xì gà, thuốc lá tự cuốn, thuốc lá hút bằng tẩu, thuốc lá nhai, thuốc lá bột, và các loại thuốc lá không khói khác sao cho chúng sẽ hầu như không chứa các TSNA. Điếu thuốc lá được tạo ra từ sợi thuốc lá thu được từ lá xanh

thậm chí sẽ có lượng TSNA giảm hơn nữa, do chúng quá mạnh trong thuốc lá đã xử lý.

Theo một phương án khác của sáng chế, *Nicotiana rustica* và/hoặc *Nicotiana tabacum* chuyển gen có lượng nicotin tăng được làm khô ở nhiệt độ thấp sau khi thu hoạch và được kết hợp trong recon. Lợi ích là hàm lượng alkaloit cao được bảo toàn cho các điều thuốc lá có TNR thấp và sẽ tiết kiệm được ở bước xử lý thuốc lá. Ngoài ra, mức các TSNA tăng có liên quan với thuốc lá có alkaloit cao sẽ không trở thành hiện thực.

YÊU CẦU BẢO HỘ

1. Thuốc lá chứa phần cây *Nicotiana tabacum* chuyển gen có hàm lượng nicotin cao, trong đó thuốc lá này khác biệt ở chỗ:

(i) tỷ lệ nhựa và nicotin tạo thành nằm trong khoảng từ 3 đến 8, như được xác định bằng phương pháp FTC (Federal Trade Commission - Ủy ban Thương mại Liên bang) hoặc ISO (International Standards Organization - Tổ chức Tiêu chuẩn Quốc tế), và

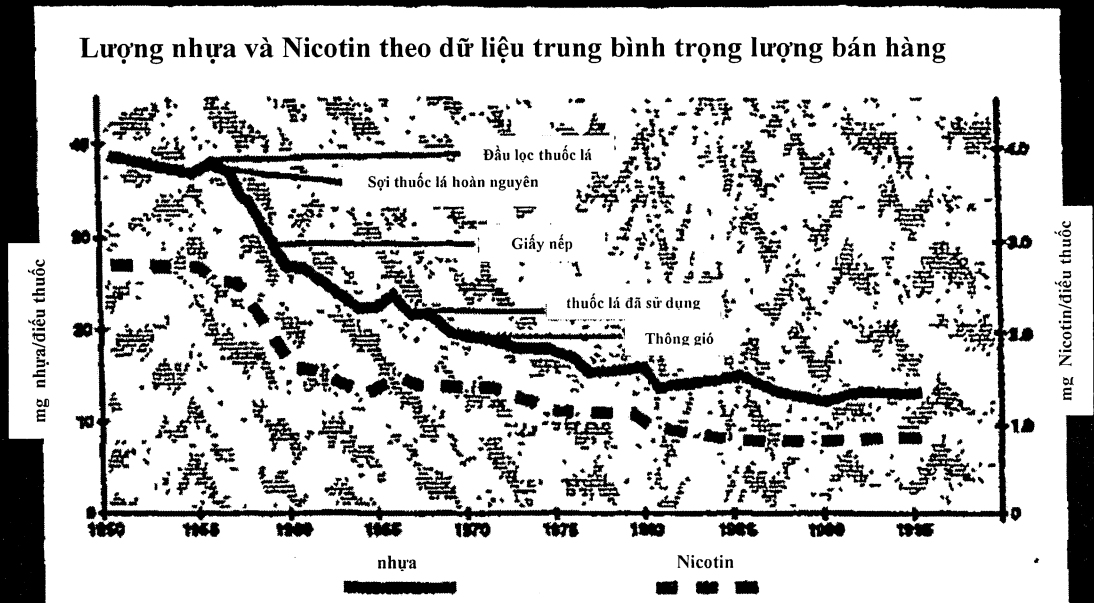
(ii) khói thuốc lá có độ pH khoảng 6,5 hoặc nhỏ hơn.

2. Thuốc lá theo điểm 1, trong đó cây *Nicotiana tabacum* chuyển gen này biểu hiện ít nhất một axit nucleic ngoại lai mà điều hòa tăng việc sản xuất nicotin trong cây hoặc phần cây chuyển gen này.

3. Thuốc lá theo điểm 2, trong đó cây *Nicotiana tabacum* chuyển gen này biểu hiện axit nucleic ngoại lai mã hóa ít nhất một đoạn QPT và PMT.

FIG.1

Lịch sử về các hiệu suất nhựa và nicotin



Nguồn RJRT com

1950: TNR trung bình trọng lượng bán hàng (39/2,7)=

FIG.2

So sánh về TNR của các loại thuốc lá thông

	Nhựa	Nic.	TNR	
Marlboro đầu lọc mềm	15	1,1	13,64	
Marlboro đầu lọc mềm trung bình	11	0,8	13,75	
Marlboro đầu lọc mềm nhẹ	11	0,8	13,75	
Marlboro đầu lọc siêu nhẹ	6	0,5	13,75	
Marlboro 100's Filter Box Red	15	1,1	13,75	
Basis Full Flavor Kings Filter Box	16	1	16,00	
Basic Lights Kings Filter Box	10	0,7	14,29	
Basic Ultra Lights Kings Filter Soft Pack	6	0,5	12,00	
Basic Full Flavor 100's Filter Soft Pack	16	1	16,00	
Virginia Slims Full Flavor 100's Filter Box	15	1,1	13,64	
Virginia Slims lights 120's Filter Menthol Box	14	1,1	12,73	
GPC Full Flavor King	15	0,8	18,75	(Cao nhất)
GPC Lights Kings Box	9	0,6	15,00	
GPC Ultra Lights King	5	0,4	12,50	
GPC tinh dầu bạc hà 100	13	0,8	16,25	
Lucky Strike Non-Filter	23	1,5	15,33	
Lucky Strike Filter King Box	15	1,1	13,64	
Lucky Strike Lights King Box	9	0,8	11,25	(Thấp nhất)

*Các loại thuốc lá chiếm khoảng 50% thị trường US

FIG.3

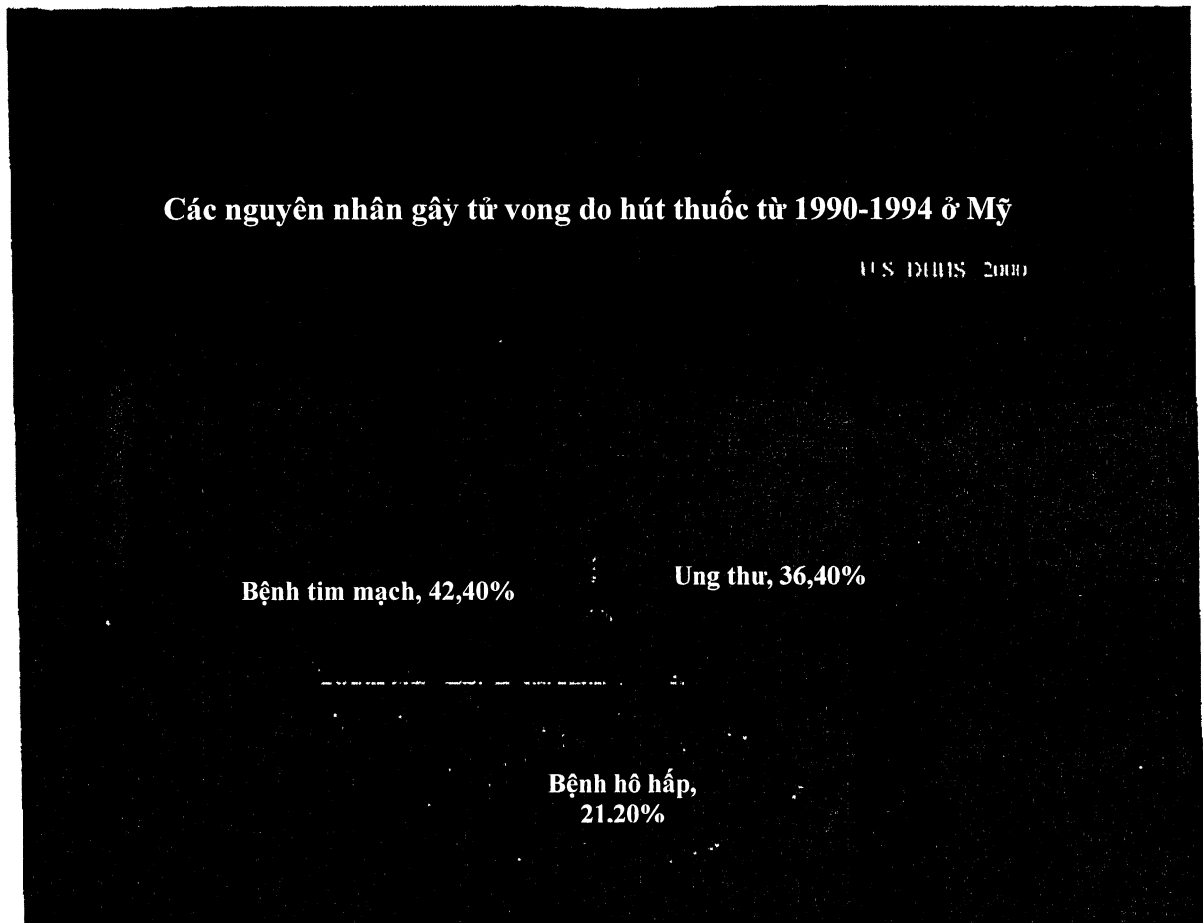


FIG.4

So sánh giữa Vector Burley 21-41 và Burley 21 LA

	Vector Burley 21-41	Xử lý	
		Kiểm soát promoter	Dạng tự nhiên
Ngày từ khi trồng đến khi ra hoa (ngày)	57,1±3,6*	56,7±3,4*	57,6±3,4*
Chiều cao khi ra hoa (cm)	118,6±20,1*	112,1±21,4*	110,8±19,5*
Sản lượng (kg/ha)	890,3±7,7*	780±68,5*	809,2±71,2*
%Nicotin ($\times 10^2$)	1,44±0,66**	19,12±8,99*	21,54±9,34*
%không có Nicotin ($\times 10^2$)	0,4±0,1**	1,56±0,22*	1,27±0,52*
%tổng alkaloit	0,23±0,44**	2,07±0,93	2,31±0,94*
%tổng nitơ	2,55±0,78*	2,89±0,42	2,64±0,91*
%đường giảm	10,29±0,89**	5,87±2,04	5,51±2,40*

Dữ liệu từ 2000 thử nghiệm lĩnh vực ở Central Crops Research Station, Clayton, NC. Thử nghiệm hóa học được thực hiện trên cây đứng đầu. 15 sao chép/10 cây trên mỗi sao chép. Dữ liệu được phân tích sử dụng thuốc thử-F.

*=không có sự khác biệt đáng kể, **=đáng kể ở mức 1%

FIG.5

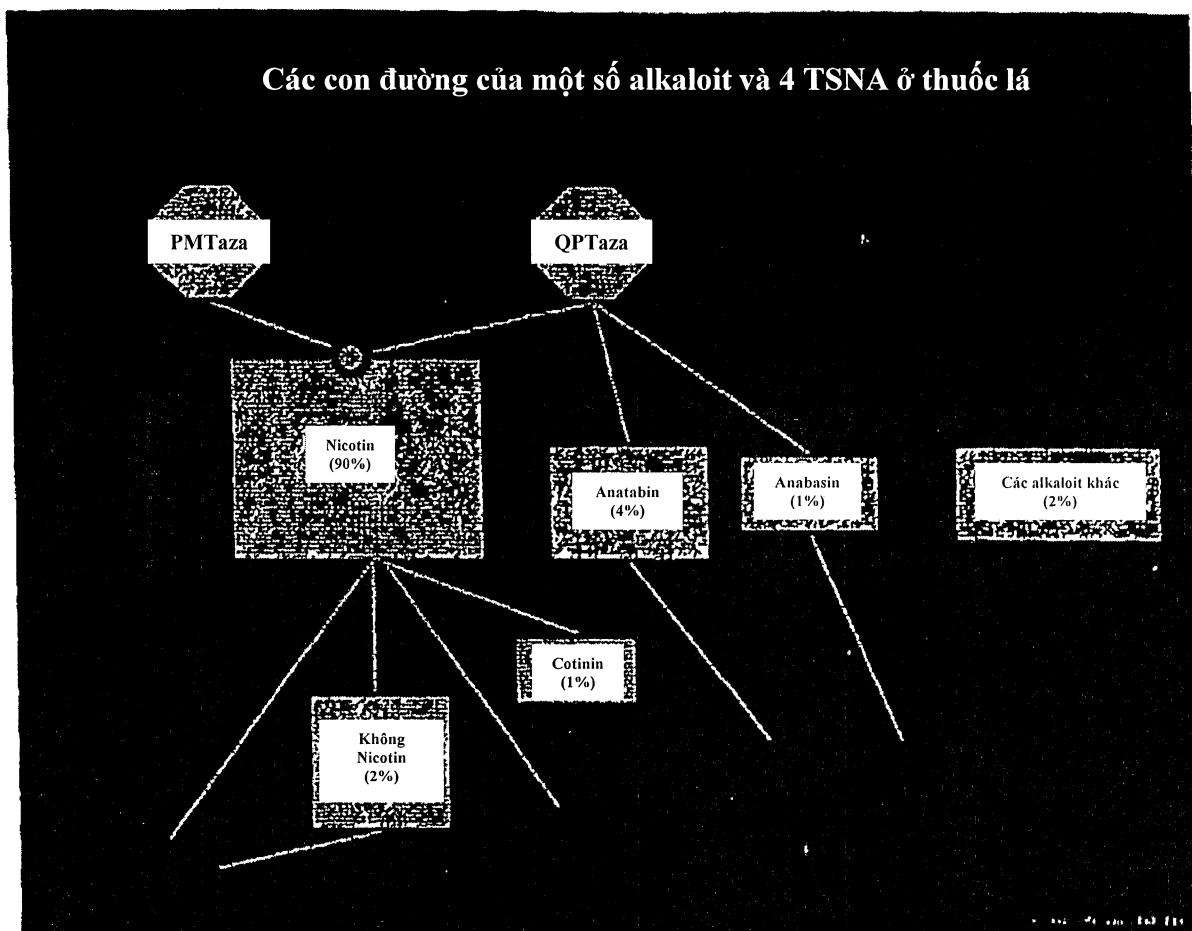


FIG.6

Sơ đồ về sinh tổng hợp pyridin alkaloit trong *Nicotiana*