NORGE

(12) **PATENT**

(19) NO (11) **314383** (13) B1

(51) Int Cl[7] A 23 L 1/305, A 23 C 9/20, A 23 J 1/20, C 07 K 14/47, A 61 K 38/17

Patentstyret

(21) Søknadsnr	19982777	(86) Int. inng. dag og søknadsnummer	1996.12.27, PCT/EP96/05846
(22) Inng. dag	1998.06.16	(85) Videreføringsdag	1998.06.16
(24) Løpedag	1996.12.27	(30) Prioritet	1995.12.27, IT, RM95A000850
(41) Alm. tilgj.	1998.06.16		
(45) Meddelt dato	2003.03.17		

(71) Patenthaver Midia Ltd, Green Street, 1 st floor, Channel House, St. Helier Jersey JE4 5UW, England, GB

(72) Oppfinner Paolo Pozzilli, I-00135 Roma, IT

(74) Fullmektig Onsagers AS, 0130 Oslo

(54) Benevnelse **Produkt avledet fra melk hovedsakelig fritt for betakasein fra ikke-humane pattedyr, relativ anvendelse og melk**

(56) Anførte publikasjoner Ingen

(57) Sammendrag

Den foreliggende oppfinnelse angår et produkt avledet fra melk, hovedsakelig fritt for beta kasein fra ikke-humane pattedyr. Oppfinnelsen angår også anvendelsen av et slikt produkt spesielt forhold til diett, mer spesielt for tidlig spedbarn, til å forhindre insulinavhengig diabetes.

Foreliggende oppfinnelse angår et produkt avledet fra melk hovedsakelig fritt for betakasein fra ikke-humane pattedyr. Oppfinnelsen angår også fremgangsmåte til å oppnå produktet og anvendelse av produktet, spesielt i form av dets anvendelse med hensyn til diett, spesielt for tidlig spedbarnsalder til å forhindre insulinavhengig diabetes.

Teknikken for å oppnå produkter, spesielt matprodukter, for tidlig spedbarnsalder er velkjent, og utgår fra ikke-human melk, såsom melk fra ku, sau eller geit. En grunnleggende komponent i melk er kjennetegnet av kasein, som i grunnleggende terminologi representerer en gruppe av proteiner oppnåelig ved melkeutfelling ved sur pH-verdi og opp til romtemperatur, spesifikt pH 4,6 og 20°C. Kaseiner representerer ca. 80 % av alle melkeproteinene i kumelk og 40 % p/v i vanlig melk. Kasein kan oppdeles i tre hovedgrupper: alfa, beta og kappa. Det er også en fjerde gruppe representert av gamma kasein, som er avledet fra beta kasein etter fjerning av de første toogtyve aminosyrer. Derfor i foreliggende oppfinnelse vil gamma kasein betraktes som en del av beta kasein.

Beta kasein representerer ca. 70 % p/v av alt kasein tilstede i human melk, mens i kumelk representerer det ca. 25 % p/v. Det er kjent flere genetiske varianter av bovint beta kasein som er blitt karakterisert, inkludert A1, A2, A3, B, C, D og E. Ved industriell produksjon av melk har hovedsakelig den genetiske melkevarianten A1 blitt favorisert for å øke mengden av produsert melk. Denne varianten som inneholder mer protein enn de andre er blitt oppnådd fra forskjellige utvalgte dyr, spesielt kuer. Ved sekvensanalyse av genetiske data er aminosyresekvensen i posisjon 63-68 blitt identifisert for kuers beta kasein A1, som tilvarer 54-59 sekvensen til humant beta kasein. Lignende situasjon er blitt oppdaget med hensyn på varianten A2. Begge varianter A1 og A2 av beta kasen viser også sekvenshomologi i den region (minst 90 per cent) med et spesifikt protein i insulinproduserende celler i pancreas (GLUT2). I henhold til oppfinnelsen utløser sekvensen 63-68 i A1 og A2 beta kasein, og mer generelt, de analoge sekvensene til andre typer kasein, så som A1, A2, A3, B, C, D og E, en immunrespons via produksjon av anti beta kasein antistoffer og lymfocyter som gjenkjenner slike sekvenser. Hos nyfødte og spedbarn i de første måneder av livet kan en diett som inneholder disse immunogene kaseiner indusere en spesifikk immunrespons til GLUT2 i insulinproduserende celler i pankreas ved en molekylær etterligningsmekanisme med de homologe sekvenser i beta kasein. På basis av en slik hypotese er det blitt utført en undersøkelse som sikter på å oppnå bovine melkeprodukter hovedsakelig fri for ikke-humant beta kasein og mer spesifikt beta kasein som inneholder produkter fra ikke-humane pattedyr som ikke er immunogene med hensyn på GLUT2 proteinene på grunn av fravær av en slik sekvens homologi.

Det er følgelig en hensikt å oppnå et melkeprodukt som ikke har ovennevnte ulemper. Denne hensikt er oppnådd med foreliggende oppfinnelse kjennetegnet ved det som fremgår av de vedlagte krav.

Den foreliggende oppfinnelse angår et produkt avledet fra melk, eller melk i seg selv, hovedsakelig fri for ikke-humant beta kasein med immunogene egenskaper som spesifisert i kjent teknikk.

En annen hensikt med oppfinnelsen er et melkeavledet produkt, eller melk i seg selv, som omfatter minst ett beta kasein modifisert fra ikke-humane pattedyr uten de immunogene egenskapene nevnt ovenfor.

En annen hensikt med oppfinnelsen er anvendelse av et slikt produkt, med hensyn på diett.

Enda en hensikt med oppfinnelsen er anvendelse av produktet fra melk eller melk i seg selv, hovedsakelig fri for beta kasein fra ikke-humane pattedyr for å oppnå mat for tidlig spedbarnsdiett eller til å forhindre insulinavhengig diabetes.

Andre hensikter med oppfinnelsen vil være klart fra den detaljerte beskrivelsen av oppfinnelsen.

I den vedheftede beskrivelse vil aminosyresekvensene som er viktige i henhold til oppfinnelsen være understreket. Ordet "hovedsakelig fri" vil angi nærvær av substansstoffet (s) som det refererer seg til i mengder som varierer mellom 0 og 10 vekt%.

Aminosyresekvensen av interesse for foreliggende oppfinnelse er beskrevet nedenfor. Som nevnt ovenfor er det i henhold til oppfinnelsen en korrelasjon mellom eksponering for kumelk og utvikling av insulinavhengig diabetes på grunn av molekylær etterligning mellom aminosyresekvensene til beta kasein A1 og A2 og en spesifikk sekvens av GLUT2 proteiner funnet i de insulinproduserende celler. En slik sekvens er blitt identifisert som følger:

Pro-Gly-Pro-Ile-His-Asn (hvor den understrekete sekvens er SEKV ID NR. 1, for A1 beta kaseinet innskutt i det større fragment: Ser-Leu-Val-Tyr-Pro-Phe-Pro-Gly-Pro-Ile-His-Asn (SEKV ID NR. 3).

Som allerede stadfestet er slike sekvenser også tilstede i gamma kasein. Andre sekvenser som tilsvarer immunogene peptider av beta kasein som er forskjellig fra de nevnt ovenfor er gitt som eksempler. Kuer's beta kasein A2 fra Bos taurus (63-68), Pro-Gly-Pro-Ile-Pro-Asn (hvor den understrekede sekvens er SEKV ID NR. 2) innskutt i det større fragment: Ser-Leu-Val-Tyr-Pro-Phe-Pro-Gly-Pro-Ile-Pro-Asn (SEKV ID NR. 4).

Beta kasein fra Bos indikus (63-68): Pro-Gly-Pro-Ile-Pro-Asn (understreket sekvenser SEKV ID NR. 2).

I sammenligning har humant beta kasein følgende sekvens (48-59): Ser-Leu-Val-Tyr-Pro-Phe-Val-Glu-Pro-Ile-Pro-Tyr (SEKV ID NR. 6). Peptidfraksjonen relevant til den foreliggende oppfinnelse er blitt identifisert som (54-59): Val-Glu-Pro-Ile-Pro-Tyr (hvor den understrekede sekvens er SEKV ID NR. 5). Peptidsekvensene til GLUT2, glukosetransportøren inne i insulinproduserende beta celler i pankreas, er følgende:

(409-420) Ser-Phe-Phe-Glu-Ile-Gly-Pro-Gly-Pro-Ile-Pro-Trp

(412-423) Glu-Ile-Gly-Pro-Gly-Pro-Ile-Pro-Trp-Phe-Met-Val

(414-425) Gly-Pro-Gly-Pro-Ile-Pro-Trp-Phe-Met-Val-Ala-Glu

Oppfinneren foreslår at sekvensen til A1, B og C beta kasein og gamma kasein, Pro-Gly-Pro-Ile His (SEKV ID NR. 1), og de større fragmenter som inneholder sekvensen, såsom sekvensen til beta kasein, A2, A3 og E, Pro-Gly-Pro-Ile Pro (SEKV ID NR. 2), er ansvarlig for induksjon av en immunrespons mot beta kasein som, ved kryssreaktivitet, ville bli rettet mot den homologe sekvensen til GLUT2, og forårsake skader på cellene som produserer insulin.

Derfor ville det være en preventiv tilnærming mot insulinavhengig diabetes å produsere melk eller generelt matprodukt som omfatter ikke-immunogent beta kasein for administrering i dietter, spesielt til nyfødte og tidlig spedbarnsalder. Alle kaseiner som ikke inneholder sekvensen Pro-Gly-Pro-Ile-His (SEKV ID NR. 1) eller Pro-Gly-Pro-Ile-Pro (SEKV ID NR. 2) er ikke betraktet som patogene og kan derfor brukes til å fremstille et kostprodukt i henhold til foreliggende oppfinnelse, hvor:

- noen eller alle aminosyrer tilstede i ovenstående sekvens er modifisert;
- beta kasein ikke inneholder en slik sekvens (det har f.eks. blitt fjernet)
- beta kasein er modifisert slik at en sekvens er substituert med en sekvens til human beta kasein.

Alle modifikasjoner kan gjøres ved å anvende velkjent bioteknologisk teknikk og den klassiske biologiske teknikken for krysseleksjon som beskrevet i patent WO 93/04171.

Den oppnådde melk som inneholder kasein modifisert som nevnt ovenfor, kan administreres som sådan eller kan behandles med kjente metoder, idet de angitte kasein(er) kan adskilles og brukes til å fremstille mat eller farmasøytiske produkter.

Spesielt kan produktene hvor slikt kasein er inkludert anvendes for administrering til barn i tidlig spedbarnsalder og senere som en diett til å forhindre insulinavhengig diabetes.

Det er foretrukket at i produktene i henhold til foreliggende oppfinnelse representerer ikke konsentrasjonene av A1 og/eller A2 og/eller andre immunogene beta kaseiner, særlig de med sekvensen Pro-Gly-Pro-Ile-His (SEKV ID NR. 1) eller Pro-Gly-Pro-Ile-Pro (SEKV ID NR. 2) mer enn 10 vekt% av det avsluttede produkt.

Matproduktene i henhold til oppfinnelsen kan f.eks. være pasta, melk og melkeavledede produkter og proteiner, såsom de tilsatt mat som allerede er markedsført hvor modifikasjonen er substitusjon av de immunogene kaseiner med kaseiner i henhold til den foreliggende oppfinnelse.

Del av foreliggende oppfinnelse er også grønnsaker og/eller synteti8ske proteiner, såsom de avledet fra soya. I henhold til foreliggende oppfinnelseslære er det mulig å fremstille farmasøytiske produkter eller næringsprodukt, spesielt for tidlig spedbarnsalder, hovedsakelig fri for beta kasein, med aminosyresekvensen Pro-Gly-Pro-Ile-His (SEKV ID NR. 1) eller Pro-Gly-Pro-Ile-Pro (SEKV ID NR. 2), eller hvor slike sekvenser er mindre enn 10 % av den avsluttende vekt av produktet. Det er også mulig å fremstille et matprodukt eller en melk i henhold til følgende alternativer:

- hvor beta kaseinet er lavere enn 10 vekt% eller beta kaseinet som omfatter aminosyresekvensen Gly-Pro-Ile-His (SEKV ID NR. 7) eller Gly-Pro-Ile-Pro (SEKV ID NR. 8) er mindre enn 10 vekt%;
- hovedsakelig fritt for beta kasein som omfatter aminosyresekvensen Gly-Pro-Ile-His (SEKV ID NR. 7) eller Gly-Pro-Ile-Pro (SEKV ID NR. 8) og integrert med peptider avledet fra hydrolyse av dyre-, vegetailske og/eller syntetiske proteiner, og som mangler de ovenstående sekvenser, og blandinger derav FR 86-00325, WO 94/06306, WO 91/02539;
- hvor beta kaseinet som omfatter aminosyresekvensen Gly-Pro-Ile-His (SEKV ID NR. 7) eller Gly-Pro-Ile-Pro (SEKV ID NR. 8) er mindre enn 10 % (vekt) og integrert med peptider som kommer fra hydrolyse av dyre- og/eller vegetabilske og/eller syntetiske proteiner som mangler slike sekvenser og blandinger derav;
- hvor beta kaseinet mangler aminosyresekvensen Gly-Pro-Ile-His (SEKV ID NR. 7) eller Gly-Pro-Ile-Pro (SEKV ID NR. 8) ved at den er blitt oppnådd fra dyrearter som genetisk ikke produserer proteiner med slike sekvenser;
- melk som naturlig mangler beta kasein, fremstilt av genetisk modifiserte dyr i henhold til patent WO 93/04171;
- melk som omfatter humant beta kasein oppnådd fra genetisk manipulerte mikroorganismer eller dyr, såsom de beskrevet i de ovenfor nevnte patenter.

Proteinfraksjonene kan avledes fra fysikalsk kjemiske behandlinger av melk og fra lyofilisert kasein, for eksempel ved differensiell oppløselighet, væsk-væske ekstraksjon, membran, separasjon, kromatografisk separasjon, som beskrevet i patenter FR 86-00325 og WO 92/00017.

Integreringen kan utføres ved å bruke rekombinant beta kasein fremstilt ved en av de velkjente kloningsfremgangsmåter, ved å bruke gjær, bakterier, sopp eller transgene dyr, slik som de beskrevet i patent WO 93/04171.

En fremgangsmåte til å fjerne beta kasein fra melk er den kromatografiske prosess som beskrevet nedenfor.

Ved hjelp av en slik prosess blir beta kasein adskilt, ved å starte fra surt kasein, og ved hjelp av kromatografi i to trinn, til de gjenværende fraksjoner av alfa og kappa kasein oppnås. Fremgangsmåten kan optimaliseres ved å bruke den kunnskap som allerede er tilgjengelig på området. En slik prosess inkluderer anvendelse som basisk fase, av en harpiks til ionebytte, for eksempel Sepharose® fra Pharmacia, med konsentrasjon også i kolonner. Den mobile fase utgjøres av Buffer A:

- Natriumacetat med konsentrasjon ikke mindre enn 10 mM;

- urea i konsentrasjon ikke mindre enn 2M;

- pH-verdi mellom 5 og 6.

Det sure kasein kan oppløses i Buffer A med pH-verdi ikke mindre enn 6, ved tilsetting av et spesifikt reduksjonsmiddel, DTT, (Ditiotreeitol). Blandingen går i 24 timer, bringes til pH-verdi mellom 5 og 6 og lastes på kolonnene. Beta kasein fraksjonen interagerer ikke med harpiksen og blir eluert i NaCl. Det er derfor ikke nødvendig å utføre trinn med økende ionekonsentrasjon, tatt i betraktning at fremgangsmåten som er for hånden bare omfatter en enkel separasjon av beta kasein fra de andre fraksjoner, som vil oppsamles isokratisk ved eluering med buffer:

- Natriumacetat i konsentrasjon ikke mindre enn 10 mM;

- urea i konsentrasjon ikke mindre enn 2M;

- 0,8 M NaCl;

- pH-verdi mellom 5 og 6.

Fraksjonene blir senere diafiltrert for å eliminere urea og andre salter; etter konsentrasjon blir kaseinene oppsamlet ved syreutfelling og det oppnådde våtproduktet lyofilisert.

Kort beskrivelse av tegningene.

Fig. 1 er kromatogrammet som angår den initielle opplasting av eksempel 1.

Fig. 2 illustrerer en kromatografisk topp som angår beta kasein.

Fig. 3 viser fravær av beta kasein i kromatogrammet.

Følgende eksempler skal betraktes som illustrerende for en slik teknikk.

Eksempel 1:
Separasjon av beta kasein fra surt kasein og oppsamling av gjenværende alfa og kappa kasein fraksjoner.

Preparering

- 200 g surt kasein + 3000 ml Buffer C: 20 mM natriumacetat. 4M urea, 10 mM (ditioltreeitol) DTT pH-verdi = 7.

Kasein skal oppløses langsomt i bufferen, pH-verdi = 7 opprettholdes med 2M NaOH ved hver tilsetting.

Etterlates under omrøring ved 5°C i ca. 12 timer.

Filtrering av oppløsningen i pre-filter Milex AP-50 (Millipore).

Vask prefilteret med 1000 ml av Buffer C og oppsaml.

Bring lasten (4000 ml) til pH 5,5 med HCl 6M og juster ionestyrken (2,2 mS) til 4,5 mS.

Kromatografi

- FPLC Waters 600 Controller

- Avlesningsinstrument: Perkin Elmer UV/VIS Spectophotometer Lambda 3B 280 nm.

- Kolonne: XK 50 Pharmacia (maksimum trykk 3 bard. 5 cm, høyde 100 cm.

- Harpiks: S-Sepharose Pharmacia, høyde 85 cm, volum 1670 ml

- Elueringsmidler:	Buffer A	Natriumacetat, 20 mM
		Urea 4 M
	Buffer B	Natriumacetat, 20 Mm
		Urea 4M
		pH-verdi 5,5
		Natriumklorid 1 M ione-
		styrke 57,1 mS

Alle buffere blir filtrert ved å bruke et Millex pre-filter AP 50 bundet i serier med filtre 0,45 µm Millipak 20 (Millipore).

- Temperatur: Romtemperatur

- Betingelser: ≈ ca. 8000 ml
  Buffer A: 97 % Buffer B: 3 %
  ionestyrkeblanding: 4,5 mS
  Gjennomstrømning: 30 ml/min.
  P = 42 PSI Tid: 4 timer, 25 min.
- Opplasting: 200 g surt kasein oppløst i Buffer C
  (totalt volum 4000 ml)
  Gjennomstrømning: 20 ml/min.
  P=50 PSI Tid: 3 timer, 20 min.
- Eluering: Første trinn (isokratisk) ≈ 8000 ml
  Buffer A: 97 % Buffer B: 3 %
  Gjennomstrømning: 30 ml/min.
  P=42 PSI Tid: 4 timer, 25 min.
  Annet trinn (isokratisk) 9000 ml
  Buffer A: 20 % Buffer B: 80 %
  Gjennomstrømning: 30 ml/min.
  P=42 PSI Tid: 5 timer

Eksempel 2 - Kontrolltest

En mengde av produkter fra eksempel 1 blir testet med kromatografi for å evaluere fravær av beta kasein i den isokratiske oppløsning fra andre trinn. Slik fravær er konfirmert som demonstrert i kromatogrammet i fig. 3. Ved sammenligning i fig. 1 hvor kromatogrammet som angår den initielle opplasting er illustrert, mens i fig. 2 er toppen som angår nærvær av beta kasein bare avledet av elueringen i det første trinn.

Analyttisk kromatografi

- HPLC Perkin Elmer Biocompatible Binary Pump 250

- Analyseinstrument: Perkin Elmer LC95 280 nm

- Kolonne: Mono S HR 5/5 Pharmacia

- Løkke: 100 µl

- Eluenter: Buffer A* Natriumacetat 20 mM
  Urea 6 M
  pH-verdi 5
  Buffer B* Natriumacetat 20 Mm
  Urea 6 M
  Natriumklorid 1M
  pH-verdi 5

- Temperatur: Romtemperatur

- Gjennomstrømning: 1 ml/min.

- Betingelse: 8'00''	Buffer A* 100 %	Buffer B* 0 %
- Eluering: gradient 5'00''	Buffer A* 50 %	Buffer B* 50 % (økning av B*1 % min.)
isokratisk 2'00''	Buffer A* 50 %	Buffer B* 50 %
isokratisk 5'00''	Buffer A* 0 %	Buffer B* 100 %

Eksempel 3

Produktet i eksempel 1 er blitt renset fra urea ved en følgende diafiltreringsmetode.

- Ultrafiltrering S.G.I.

- Cellulosemembran S-10 10.000 Da Amicon

- Dialysebuffer: demineralisert vann
  natriumacetat 10 mM pH-verdi = 7
  ionestyrke 0,8 mS
  totalt volum 250 l (5 vasker)

- Permeat gjennomstrømning. 32 + 37 l/time

- Temperatur: 10°C

- Produktkonsentrasjon 50 l opp til 20 l

Produktet er blitt testet for å kontrollere fravær av urea som følger:

Urea test

- UV fremgangsmåte (Boehringer Mannheim)

- Spektrofotometer: Lamda 3B 340 nm (Perkin Elmer)

Reagenser	Blank	Prøve
Oppløsning 1	1,00 ml	1,00 ml
Prøve oppløsning	---	0,10 ml
Oppløsning 2	0,02 ml	0,02 ml
Bidestillert vann	2,00 ml	1,90 ml
Inkuber 5' ved 20-25°C: avles absorbansen (A1)		
Oppløsning 3	0,02 ml	0,02 ml
Inkuber 20' ved 20-25°C: avles absorbansen (A2)		

Oppløsning 1 = Trietanolaminbuffer, pH-verdi 8,2 oksoglutarat, NADH
Oppløsning 2 = Urase
Oppløsning 3 = Dehydrogenaseglutamat

Lyofoliseringen blir utført på produktet som er fritt for urea, ved å bruke en Christ modell Beta 1-16 utstyr.

SEKVENSLISTE

(1) GENERELL INFORMASJON:

(i) SØKER:

(A) NAVN: BIOSISTEMA di Pier Luigi Sarapani & C. Sas
(B) GATE: Via Per Luco dei Marsi
(C) BY: Avezzano
(D) STAT: L'Aguila
(E) LAND: Italia
(F) POSTKODE (ZIP): 67051

(ii) OPPFINNELSENS TITTEL: Produkt avledet fra melk hovedsakelig fritt for beta kasein fra ikke-humane pattedyr og dens relative anvendelse.

(iii) ANTALL SEKVENSER: 8

(iv) EDB LESBAR FORM:
(A) MEDIUM TYPE: Floppy disk
(B) EDB: IBM PC kompatibel
(C) OPERATIVT SYSTEM: PC-DOS/MS-DOS
(D) SOFTWARE: PatentIn Release #1,0, Verson #1,25 (EPO)

(vi) TIDLIGERE SØKNADSDATA:
(A) SØKNADSNUMMER: IT RM 95 A 000850
(B) INNLEVERINGSDATO: 27 DESEMBER 1995

(vi) FORELIGGENDE SØKNADSDATA:
(A) SØKNADSNUMMER:
(B) LEVERINGSDATO:
(C) KLASSIFISERING:

2. INFORMASJON FOR SEKV ID NR. 1:

(i) SEKVENSEGENSKAPER
(A) LENGDE: 5 aminosyrer
(B) TYPE: aminosyrer
(C) TRÅDER: enkel

(ii) MOLEKYLTYPE: peptid

(xi) SEKVENSBESKRIVELSE: SEKV ID NR. 1:

Pro Gly Pro Ile His
1 5

(2) INFORMASJON FOR SEKV ID NR. 2

(i) SEKVENSEGENSKAPER:

(A) LENGDE: 5 aminosyrer
(B) TYPE: aminosyrer
(C) TRÅDER: enkel

(ii) MOLEKYL TYPE: peptid

(xi) SEKVENSBESKRIVELSE: SEKV ID NR. 2:

Pro Gly Pro Ile Pro
1 5

(2) INFORMASJON FOR SEKV ID NR. 3:

(i) SEKVENSEGENSKAPER:

(A) LENGDE: 12 aminosyrer
(B) TYPE: aminosyre
(C) TRÅDER: enkel

(ii) MOLEKYLTYPE: Peptid

(xi) SEKVENSBESKRIVELSE: SEKV ID NR. 3:

Ser Leu Val Tyr Pro Phe Pro Gly Pro Ile His Asn
1 5 10

(2) INFORMASJON FOR SEKV ID NR. 4:

(i) SEKVENSEGENSKAPER:

(A) LENGDE: 12 aminosyrer
(B) TYPE: aminosyre
(C) TRÅD: enkel

(ii) MOLEKYLTYPE: peptid

(xi) SEKVENSBESKRIVELSE: SEKV ID NR. 4:

Ser Leu Val Tyr Pro Phe Pro Gly Pro Ile Pro Asn
1 5 10

(2) INFORMASJON FOR SEKV ID NR. 5:

(i) SEKVENSEGENSKAPER:
(A) LENGDE: 5 aminosyrer
(B) TYPE: aminosyre
(C) TRÅDER: enkel

(ii) MOLEKYLTYPE: peptid

(xi) SEKVENSBESKRIVELSE: SEKV ID NR. 5:

Val Glu Pro Ile Pro
1 5

(2) INFORMASJON FOR SEKV ID NR. 6:

(i) SEKVENSEGENSKAPER:

(A) LENGDE: 12 aminosyrer
(B) TYPE: aminosyre
(C) TRÅDER: enkel

(ii) MOLEKYLTYPE: peptid

(xi) SEKVENSBESKRIVELSE: SEKV ID NR. 6:

Ser Leu Val Tyr Pro Phe Val Glu Pro Ile Pro Tyr
1 5 10

(2) INFORMASJON FOR SEKV ID NR. 7:

(i) SEKVENSEGENSKAPER:
(A) LENGDE: 4 aminosyrer
(B) TYPE: aminosyre
(C) TRÅDER: enkel

(ii) MOLEKYLTYPE: peptid

(xi) SEKVENSBESKRIVELSE: SEKV ID NR. 7:

Gly Pro Ile His
1

(2) INFORMASJON FOR SEKV ID NR. 8:

(i) SEKVENSEGENSKAPER:
(A) LENGDE: 4 aminosyrer
(B) TYPE: aminosyre
(C) TRÅDER: enkel

(ii) MOLEKYLTYPE: peptid

(xi) SEKVENSBESKRIVELSE: SEKV ID NR. 8:

Gly Pro Ile Pro
1

Patentkrav

1. Diettprodukt eller farmasøytisk produkt avledet fra melk, eller melk i seg selv, som skal anvendes i dietter til forhindring av insulinavhengig diabetes, k a r a k t e r i s e r t v e d at det er fritt for ikke-humant beta kasein.

2. Diettprodukt eller farmasøytisk produkt avledet fra melk, eller melk i seg selv, som skal anvendes i dietter til forhindring av insulinavhengig diabetes, k a r a k t e r i s e r t v e d at det er fritt for beta kasein fra ikke-humane pattedyr som utviser molekylær mimikry med proteinet GLUT2 og derfor er immunogent til hvilke det er blitt tilsatt ikke-immunogene beta kaseiner valgt fra dyre-, plante- og/eller syntetiske beta kaseiner og blandinger derav, hvor nevnte kasein ikke omfatter sekvensen: Pro-Gly-Pro-Ile-His (SEKV ID NR. 1) og Pro-Gly-Pro-Ile-Pro (SEKV ID NR. 2) eller sekvensene omfattende Ser-Leu-Val-Tyr-Pro-Phe-Pro-Gly-Pro-Ile-His-Asn (SEKV ID NR. 3) og Ser-Leu-Val-Tyr-Pro-Phe-Pro-Gly-Pro-Ile-Pro-Asn (SEKV ID NR. 4).

3. Diett- eller farmasøytisk produkt avledet fra melk, eller melk i seg selv, som skal anvendes i dietter til forhindring av insulinavhengig diabetes, k a r a k t e r i s e r t v e d at det er fritt for kaseiner som omfatter sekvensen: Pro-Gly-Pro-Ile-His (SEKV ID NR. 1) og Pro-Gly-Pro-Ile-Pro (SEKV ID NR. 2), eller sekvensen omfattende: Ser-Leu-Val-Tyr-Pro-Phe-Pro-Gly-Pro-Ile-His-Asn (SEKV ID NR. 3) og Ser-Leu-Val-Tyr-Pro-Phe-Pro-Gly-Pro-Ile-Pro-Asn (SEKV ID NR. 4).

4. Diettprodukt eller farmasøytisk produkt avledet fra melk, eller melk i seg selv, som skal anvendes i dietter til forhindring av insulinavhengig diabetes, k a r a k t e r i s e r t v e d at det omfatter kaseiner som ikke har sekvensen: Pro-Gly-Pro-Ile-His (SEKV ID NR. 1) og Pro-Gly-Pro-Ile-Pro (SEKV ID NR. 2), hvor nevnte kaseiner er valgt blant de hvor:

- noen eller alle av aminosyrene i nevnte sekvens er modifisert;
- nevnte sekvenser er fjernet;
- nevnte sekvenser er substituert med den homologe sekvens i humant beta kasein og beslektede blandinger.

5. Diettprodukt eller farmasøytisk produkt avledet fra melk, eller melk i seg selv, som skal anvendes i dietter til å forhindre insulinavhengig diabetes, k a r a k t e r i s e r t v e d at det omfatter kaseiner som har sekvensen: Val-Glu-Pro-Ile-Pro (SEKV ID NR. 5) eller en lengre sekvens som omfatter: Ser-Leu-Val-Tyr-Pro-Phe-Val-Glu-Pro-Ile-Pro-Tyr (SEKV ID NR. 6).

6. Produkt som angitt i kravene 1-5,
k a r a k t e r i s e r t v e d at det er integrert med plante-, dyre- og/eller syntetiske beta kaseiner med peptider avledet fra hydrolyse av dyre-, plante- og/eller syntetiske proteiner som mangler sekvensen Pro-Gly-Pro-Ile-His (SEKV ID NR. 1) eller Pro-Gly-Pro-Ile-Pro (SEKV ID NR. 2) og blandinger derav, til å forhindre insulinavhengig diabetes.

7. Diettprodukt eller farmasøytisk produkt avledet fra melk, eller melk i seg selv, som skal anvendes i dietter til å forhindre insulinavhengig diabetes,
k a r a k t e r i s e r t v e d at det omfatter kaseiner i hvilke beta kasein mangler aminosyresekvensen Gly-Pro-Ile-His (SEKV ID NR. 7) eller Gly-Pro-Ile-Pro (SEKV ID NR. 8) fordi det er blitt produsert av dyrearter som genetisk ikke produserer proteiner med en slik sekvens.

8. Melk som naturlig mangler beta kasein,
k a r a k t e r i s e r t v e d at den er fremsilt fra genetisk modifiserte dyr og skal anvendes i dietter til forhindring av insulinavhengig diabetes.

9. Melk som inneholder humant beta kasein,
k a r a k t e r i s e r t v e d at den er oppnådd fra genetisk manipulerte mikroorganismer eller dyr, og skal anvendes i dietter til å forhindre insulinavhengig diabetes.

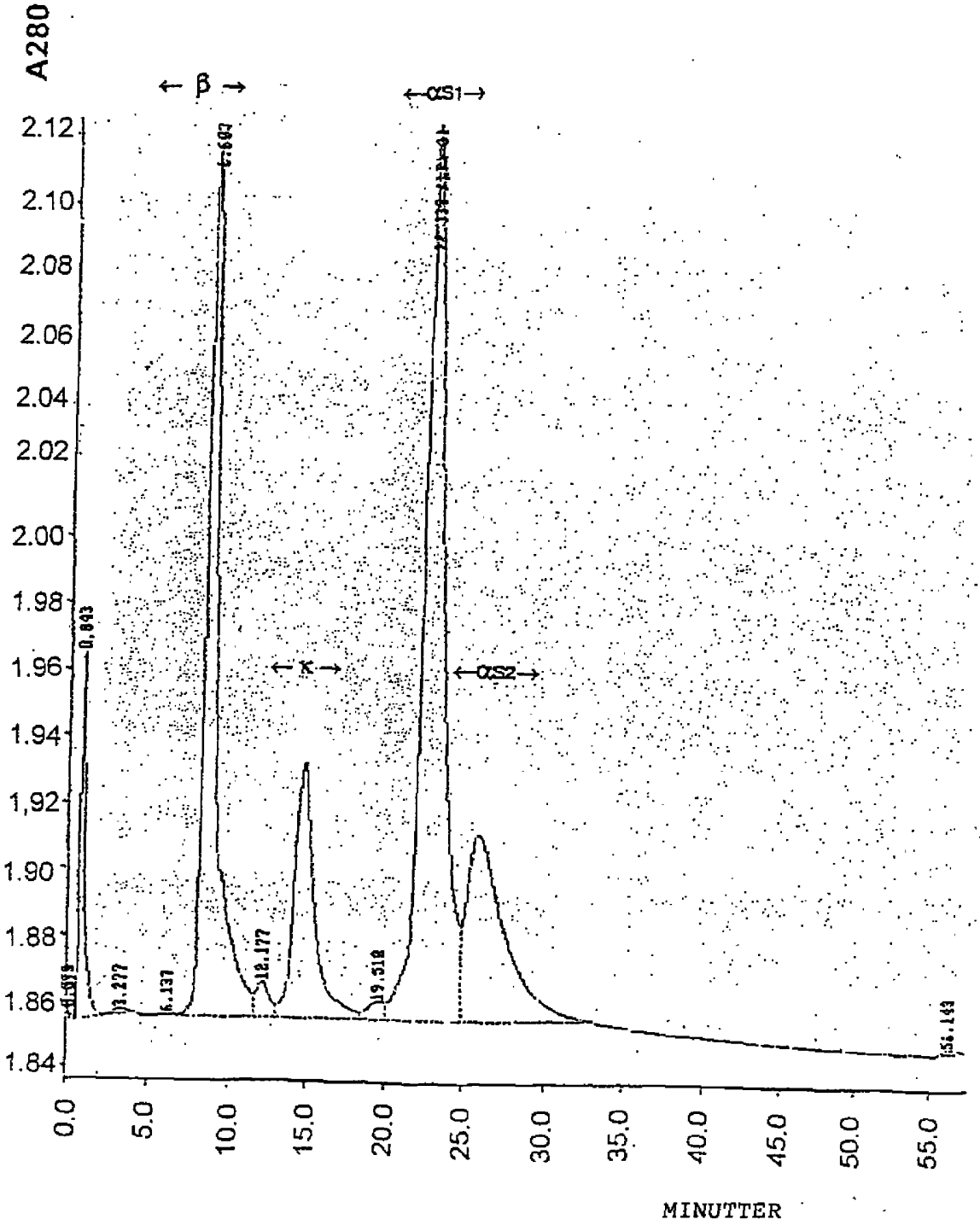
10. Fremgangsmåte til å oppnå et diettprodukt som angitt i krav 4,
k a r a k t e r i s e r t v e d at aminosyresekvensene blir modifisert ved hjelp av anvendelse av teknikker, såsom genetisk teknikk og biologisk kryss-seleksjon.

11. Anvendelse av beta kasein eller peptidfragmenter som ikke viser molekylær mimikry med proteinet GLUT2 til fremstilling av diett- eller farmasøytiske produkter til forhindring av insulinavhengig diabetes.

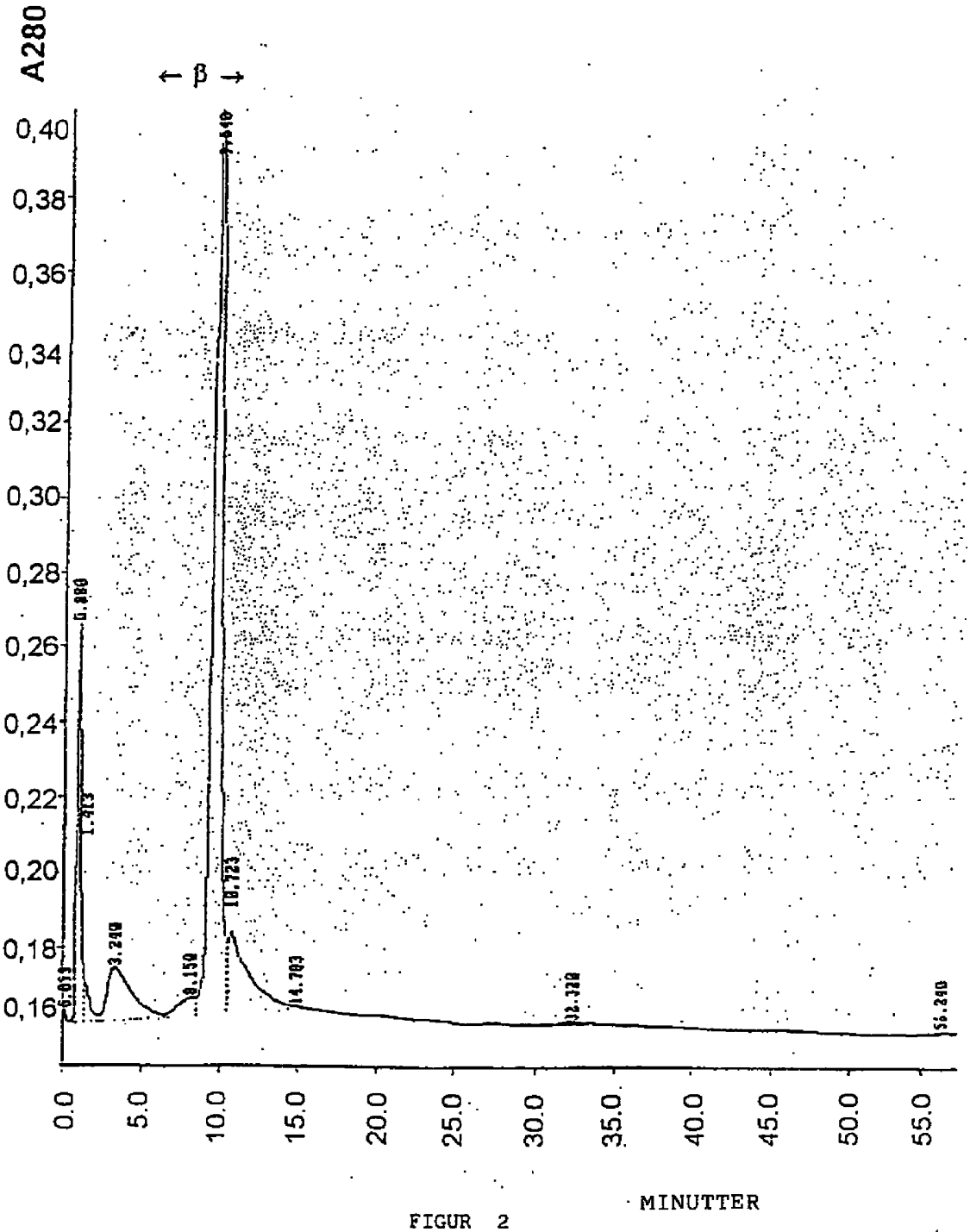
12. Anvendelse av beta kasein eller peptidfragmenter som angitt i krav 11 til å fremstille et næringsdiett- eller farmasøytisk produkt til å forhindre insulinavhengig diabetes.

13. Anvendelse av kaseiner som angitt i et av kravene 4-7 til å fremstille et næringsdiett- eller farmasøytisk produkt til å forhindre insulinavhengig diabetes.

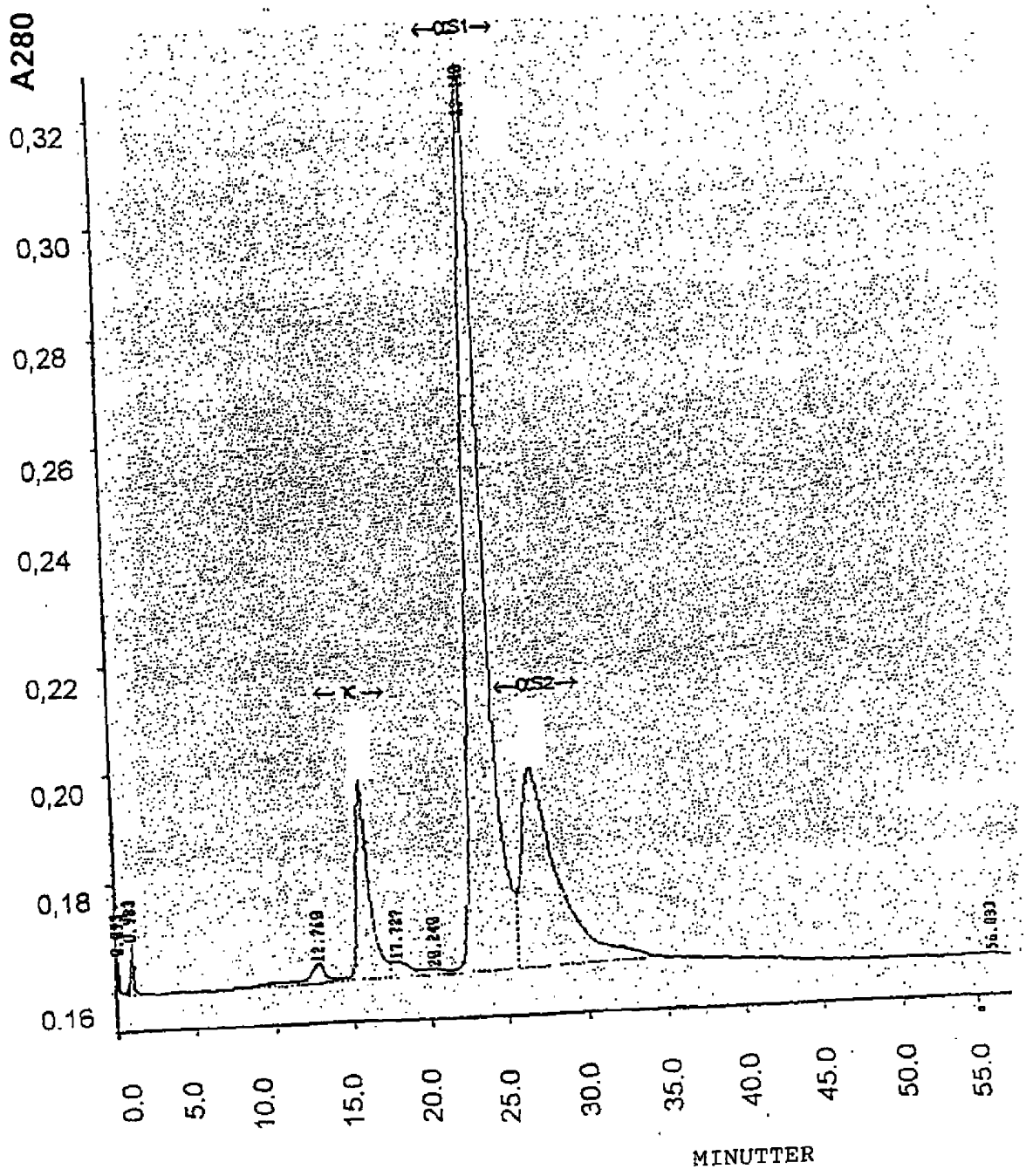
14. Anvendelse av melk som angitt i krav 8-9 til å fremstille et næringsdiett- eller farmasøytisk produkt til å forhindre insulinavhengig diabetes.


A280
2.12
2.10
2.08
2.06
2.04
2.02
2.00
1.98
1.96
1.94
1,92
1.90
1.88
1.86
1.84
← β →
←αS1→
← κ →
←αS2→
0.0
5.0
10.0
15.0
20.0
25.0
30.0
35.0
40.0
45.0
50.0
55.0
MINUTTER

FIGUR 1


A280
← β →
0,40
0,38
0,36
0,34
0,32
0,30
0,28
0,26
0,24
0,22
0,20
0,18
0,16
0.0
5.0
10.0
15.0
20.0
25.0
30.0
35.0
40.0
45.0
50.0
55.0
MINUTTER

FIGUR 2


A280
0,32
0,30
0,28
0,26
0,24
0,22
0,20
0,18
0.16
αS1
K
αS2
0.0
5.0
10.0
15.0
20.0
25.0
30.0
35.0
40.0
45.0
50.0
55.0
MINUTTER

FIGUR 3