



NORGE

(12) **PATENT**

(19) NO

(11) **318321**

(13) **B1**

(51) Int Cl⁷

G 01 N 33/04, 33/68, A 23 C 9/20,
A 01 K 67/02, C 12 Q 1/68

Patentstyret

(21)	Søknadsnr	19972033	(86)	Int.inng.dag og søknadsnr	1995.11.03 PCT/NZ95/00114
(22)	Inng.dag	1997.05.02	(85)	Videreføringsdag	1997.05.02
(24)	Løpedag	1995.11.03	(30)	Prioritet	1994.11.04, NZ, 264862
(41)	Alm.tilgj	1997.07.02			
(45)	Meddelt	2005.03.07			
(71)	Søker	A2 Corporation Ltd , c/-Edinburgh Trust, Level 10, Otago House, 475 Moray Place, Dunedin, NZ			
(72)	Oppfinner	The New Zealand Dairy Board , Pastoral House, 25 The Terrace, WELLINGTON, NZ			
		Robert Bartlett Elliott, Auckland, NZ			
		Jeremy Paul Hill, Palmerston North, NZ			
(74)	Fullmektig	AS Bergen Patentkontor , Postboks 1998 Nordnes, 5817 BERGEN, NO			

(54)	Benevnelse	Ikke-diabetogen melk eller melkeprodukter, samt fremgangsmåte til selektering av slike			
(56)	Anførte publikasjoner	Ann. Nutr. Metab., (1993), Vol. 37, Ikeda A. and Sugano M., "Interaction of Dietary Protein and Alpha-Linolenic Acid Composition of Liver Microsomal Phospholipids and Eicosanoid Production in Streptozotocin - Induced Diabetic Rats", s. 101-109. Annals of Medicine, (1991), Vol. 23, Martin J. M. et al., "Milk Proteins in the Etiology of Insulin-Dependent Diabetes Mellitus (IDDM)", s. 447-452.			

(57) **Sammendrag**

Det beskrives en oppfinnelse som er basert på oppdagelsen av at visse varianter av β -kasein kan indusere diabetes Type-1 i mottakelige individer mens andre varianter ikke gjør dette. Det beskrives en selektering av kuer som produserer ikke-diabetogenisk melk, samt opptak og bearbeiding av deres melk og melkeprodukter. Et annet aspekt ifølge oppfinnelsen er selektering av avlskuer som produserer ikke-diabetogenisk melk.

Område for oppfinnelsen

Den foreliggende oppfinnelse vedrører en fremgangsmåte for å selekttere melk for tilstedeværelse av en ikke-diabetogenisk variant av β -kasein og fravær av en diabetogenisk variant, samt en fremgangsmåte for å selekttere avlskuer eller avlsokser som produserer hunnkalver hvis melk ikke inneholder A1, B, C eller F varianter av β -kasein.

Således vedrører den foreliggende oppfinnelsen en fremgangsmåte for å unngå å utløse diabetes type 1 i mennesker ved inntak av melk og melkeprodukter ved seleksjon av melk som ikke inneholder en diabetogen faktor, ved å selekttere for kuer som produserer melk som inneholder varianter av β -kasein som ikke stimulerer diabetogen aktivitet i mennesker (en ikke-diabetogen variant), og å ekskludere varianter av β -kasein som stimulerer diabetogen aktivitet i mennesker (en diabetogen variant).

20 Bakgrunn og teknikkens stilling

Diabetes type 1 forekommer i individer som er genetisk mottagelige. Imidlertid, selv i identiske tvillinger, kan diabetes forekomme i det ene individ og ikke i det andre. Den foreliggende oppfinnelse bygger på oppdagelsen av en utløser fra omgivelsene for diabetes type 1 som virker svært tidlig i livet.

Bevis for at denne eksterne utløser finnes i kumelk baseres på epidemiologiske (Leslie et al, 1994), økologiske (Virtanen et al, 1993) og eksperimenter fra dyreforsøk (Elliott & Martin, 1984 og Elliott 1992). Den

diabetogene faktor i melk synes å være i kasein-fraksjonen (Elliott et al, 1992), ihvertfall i den ikke-fete diabetiske mus (NOD). Myse-protein synes ikke å inneholde diabetogene komponenter (Elliott et al, 1992). Det har
5 blitt foreslått at bovin serumalbumin (BSA), et protein som er funnet i myse-fraksjonen av kumelk, er den diabetogene komponent av kumelk (Sheard, 1993). Imidlertid viser en oversikt av bevis som støtter denne teori at BSA aldri ble testet for diabetogen aktivitet i fravær av β -
10 kasein.

PCT-søknad WO95/10537 beskriver en fremgangsmåte for å produsere denaturerte bovinserumalbumin-melkeprodukter. Det er konstatert at konsum av denaturerte BSA-melkeprodukter reduserer sannsynligheten for at en person
15 erverver diabetes type 1. Imidlertid er der ingen bevis presentert fra forsøk der enten mennesker eller dyr blir føret med melk eller melkeprodukter med denaturert BSA. Det bygger på teorien nevnt ovenfor at BSA er den diabetogene komponent i kumelk (Sheard, 1993). I EP-søknad
20 629.350 beskrives en fremgangsmåte for å hydrolysere kumelk-protein for å produsere et hydrolysat som i hovedsak er fritt for allergene proteiner. Hydrolysatet foreslås også å være anvendelig for å forebygge og behandle type 1 diabetes melitis i barn som er mottakelige for slike
25 lidelser. På side 6 i beskrivelsen antas det at BSA kan utløse immunsystemet. Imidlertid er der ingen eksempler i patentbeskrivelsen, og ingen referanse til publikasjoner, som viser direkte bevis for denne antagelse.

I patentskrivelse 61/1804 i Sør-Afrika beskrives
30 materialer som påstås å være kurer for diabetes. Der er ingen eksempler på noen forsøk som støtter disse antagelser. Materialene består av kasein som en basis, og frukt og blader fra Sør-Afrikanske planter. Den slutning som kan trekkes for beskrivelsen er at den aktive ingrediens er
35 plantemateriale, og det nevnes ikke at kasein har en funksjon i å forårsake eller helbrede diabetes.

Vi har nå testet A1- og A2-variantene av β -kasein og et myseprotein på NOD-mus og funnet at A1-varianten har

diabetogen aktivitet mens A2-varianten og myseproteinet ikke oppviser diabetogen aktivitet.

Det er et formål med et aspekt ifølge oppfinnelsen å anvende dette funn for å selektere melk og melkeprodukter som ikke inneholder en diabetogen faktor i slike melk og melkeprodukter, eller i det minste å tilby publikum et nyttig valg.

Det er et formål med et annet aspekt ifølge oppfinnelsen å nærme seg selektering av avlsdyr (kuer og okser) hvis avkom produserer melk som ikke er diabetogen eller som i det minste tilbyr publikum et nyttig valg.

Foreliggende oppfinnelse beskrives dermed som å omfatte en fremgangsmåte for å selektere melk for å føre individer som er mottagelige for diabetes, idet fremgangsmåten omfatter at melk fra identifiserte kuer testes for nærvær av varianter av β -kasein, og selektering av de kuene hvis melk inneholder A2, A3, D eller E varianter og ikke inneholder A1, B, C eller F varianter, og separat melking av kuene som produserer A2, A3, D eller E melkevarianter, og tilveiebringelse og opprettholdelse av melken deres separat fra melk fra enhver annen kilde.

Fortrinnsvis er den nevnte ikke-diabetogene variant A2-varianten av β -kasein.

Alternativt er den ikke-diabetogene variant A3, D eller E-variant av β -kasein.

Fortrinnsvis er den diabetogene variant A1-varianten av β -kasein.

Alternativt er den nevnte diabetogene variant enhver av B-, C- og F-varianter.

Fortrinnsvis testes den innsamlede melk for nærvær av enhver diabetogen variant, og kastes dersom en slik variant finnes.

Alternativt omfatter fremgangsmåten for å analysere anvendelse av massespektrometri.

I et utførelseseksempel omfatter nevnte massespektrometri elektrosprayionisering-massespektrometri.

Alternativt omfatter nevnte spektrometri massespektrometri av typen "fast-atomic bombardment".

Fortrinnsvis omfatter analysemetoden polyakrylamid-gelelektroforese der det anvendes en sur ureagel.

Fortrinnsvis omfatter fremgangsmåten et ytterligere trinn idet melken bearbeides til melkeprodukter.

5 Der er et stort antall metoder som er kjent for fagkyndige innenfor fagområdet å omdanne melk til melkeprodukter. Disse strekker seg fra å separere krem fra helmelk til å produsere skummet melk ved anvendelse av mikrofiltrering og ultrafiltrering for å produsere et bredt
10 spekter av produkter, såsom de som er beskrevet i PCT-søknad PCT/NZ95/00086.

Et produkt av spesiell interesse fra den ovennevnte PCT-søknad er et konsentrat av melkeprotein. Dette kan fremstilles ved andre metoder slik som den som er be-
15 skrevet i IDF-spesialnr. 9201, 1991, kapittel 5 med tittel "Milk Protein Concentrate", A. Novak.

Et annet melkeprodukt ifølge oppfinnelsen er kasein avledet fra ikke-diabetogen melk ved å anvende enhver kjent kasein-produserende metode, såsom den som er be-
20 skrevet i Southward et al, 1980.

Foreliggende oppfinnelse kan defineres bredt til å omfatte melk selektert i samsvar med fremgangsmåten slik den er definert ovenfor.

Oppfinnelsen kan også bredt sies å omfatte et ikke-
25 diabetogent melkeprodukt fremstilt med én av fremgangsmåtene beskrevet ovenfor.

Foreliggende oppfinnelse omfatter også en fremgangsmåte for å redusere risikoen for å utvikle diabetes type 1 i et mottagelig individ idet metoden omfatter å begrense
30 individets inntak av melk eller melkeprodukter til melk som kun inneholder ikke-diabetogene varianter av β -kasein.

Fortrinnsvis er et slikt individ et spedbarn eller et ungt barn. Foreliggende oppfinnelse omfatter også en fremgangsmåte for å selektere melk for å gi til diabetes type
35 1 mottagelige individer, idet fremgangsmåten omfatter analyse av melk fra identifiserte kuer for nærvær av heksapeptidet Pro-Gly-Pro-Ile-His-Asn som korresponderer med aminosyrer 63 til 68 i A1 varianten av β -kasein eller

et proteinfragment av β -kasein inneholdende heksapeptidet Pro-Gly-Pro-Ile-His-Asn, og selektering av de kuer hvis melk ikke inneholder heksapeptidet eller proteinfragmentet som inneholder heksapeptidet, og separat melking av de kuer hvis melk ikke inneholder heksapeptidet eller proteinfragmentet som inneholder heksapeptidet, og tilveiebringelse og opprettholdelse av melken deres separat fra melk fra enhver annen kilde.

Fortrinnsvis testes også den separerte melk for nærvær av heksapeptidet eller proteinfragmentet inneholdende heksapeptidet, og melk som inneholder heksapeptidet eller det heksapeptid-inneholdende protein kastes.

Fremgangsmåten for å teste heksapeptidet er ved anvendelse av kromatografisk rensing av heksapeptidet, etterfulgt av aminosyresekvensering.

Fortrinnsvis omfatter fremgangsmåten det ytterligere trinn med å bearbeide melken til melkeprodukter.

Foreliggende oppfinnelse vedrører melk selektert i samsvar med fremgangsmåten beskrevet ovenfor.

Foreliggende oppfinnelse vedrører også ikke-diabetogene melkeprodukter fremstilt ved en av fremgangsmåtene som er beskrevet ovenfor.

Fortrinnsvis er individet et spedbarn eller ungt barn.

I et annet utførelseseksempel omfatter oppfinnelsen en fremgangsmåte for å selektere avlskuer som produserer hunnkalver hvis melk ikke inneholder A1, B, C eller F varianter av β -kasein, idet fremgangsmåten omfatter bestemmelse av genotypen til kuene og selektering av de kuer hvis hunnkalver produserer melk som ikke inneholder A1, B, C, eller F varianter av β -kasein.

Foreliggende oppfinnelse omfatter også en fremgangsmåte for å selektere avlsokser som produserer hunnkalver hvis melk ikke inneholder A1, B, C eller F varianter av β -kasein, idet metoden omfatter å bestemme genotypen av oksen og selektering av de okser hvis hunnkalver produ-

serer melk som ikke inneholder A1, B, C, eller F varianter av β -kasein.

Fortrinnsvis, bestemmelse av fenotype av hunn-kalver for å bestemme genotype av oksene utføres ved å teste melk av kalvene for fravær av diabetogene varianter av β -kasein og nærvær av ikke-diabetogene varianter av β -kasein.

Alternativt kan genotypen til kuene og oksene bestemmes direkte ved å anvende egnede prøber og polymerase-kjedereaksjonsteknologi.

Foreliggende oppfinnelse omfatter også kuer som er selektert i samsvar med ovennevnte fremgangsmåte.

Foreliggende oppfinnelse omfatter også okser som er selektert i samsvar med ovennevnte fremgangsmåte.

Foreliggende oppfinnelse omfatter også sæd av okser som er selektert i samsvar med ovennevnte fremgangsmåter.

Et alternativ til en av de ovennevnte fremgangsmåter eller produkter, er melk eller melkeproduktet melk eller melkeprodukter fra geit, melk eller melkeprodukter fra sau, melk eller melkeprodukter fra bøffler, eller melk eller melkeprodukter fra ethvert annet dyr som er egnet for menneskelig føde.

Fremgangsmåten i følge oppfinnelsen er således kjennetegnet ved at melk fra identifiserte kuer testes for tilstedeværelse av varianter av β -kasein, og selektering av de kuene hvis melk inneholder A2, A3, D eller E varianter og ikke inneholder A1, B, C eller F varianter, og separat melking av kuene som produserer A2, A3, D eller E melkevarianter, og tilveiebringelse og opprettholdelse av melken deres separat fra melk fra enhver annen kilde.

En ytterligere fremgangsmåte i følge oppfinnelsen er kjennetegnet ved bestemmelse av genotypen til kuene eller oksene og selektering av de kuer eller okser hvis hunnkalver produserer melk som ikke inneholder A1, B, C, eller F varianter av β -kasein.

Ytterligere utførelser av oppfinnelsen er angitt i underkravene 2-12, 14 og 15.

Kort beskrivelse av figurene

Fig. 1 viser PAGE-bånd av β -kasein-varianter.

Fig. 2 er en proteinsekvens-representasjon av β -kasein A1-varianten fra bovin.

Fig. 3 er et stolpediagram som viser forskjeller i antistoffnivå til blandete β -kasein-varianter i mennesker av ulik alder, og som nylig har fått diagnosen diabetes, i forhold til kontroller.

Polymorfisme av melkeprotein

Etter oppdagelsen til Aschaffenburg og Drewry (1955), at det vesentligste myseprotein i melk, β -laktoglobulin, finnes i et antall ulike varianter, er det nå vist at alle melkeproteiner (α_{s1} -kasein, α_{s2} -kasein, β -kasein, κ -kasein og a-laktalbumin) å eksistere i et antall ulike protein-former, på grunn av genetisk polymorfisme ved det gen-loki som koder for disse proteiner (Grosclaude, 1988, Ng-Kwai-Hang og Grosclaude, 1992). Primærsekvensene av kasein-proteinene, og en omfattende liste av aminosyresekvens-forandringene som gir opphav til de forskjellige former av disse proteiner er gitt i Swaisgood (1992), Ng-Kwai-Hang og Grosclaude (1992) og Visser et al (1995). β -kasein-proteinet har åtte forskjellige former:

A1 A2 A3 B C D E F

Som beskrevet av Ng-Kwai-Hang og Grosclaude (1992) synes A2-varianten å være den opprinnelige formen av genet Bos.

Fordi melkeproteingenene uttrykkes kodominant (Mephram et al, 1992), produserer de enkelte kuer melk inneholdende enten en enkelvariant av β -kasein (A1A1, A2A2, A3A3 fenotyp-kuer, etc.) eller en blanding av to variantformer av β -kasein (A1A2, A1A3, A2A3 fenotyp-kuer, etc.). Frekvensen av β -kasein-fenotyper i en prøve-populasjon av New Zealandske melkekuer uttrykt som % er angitt i tabell 1.

TABELL 1
Fenotype

Rase	A1A1	A1A2	A1A3	A1B	A2A2	A2A3	A2B	BB
Friesian	21	43	0,1	5	24	0,16	5,6	0,4
Jersey	0	9	0	5	46	0	34	6

Den dominerende β -kaseinvariant fra den indiske ku (Bos indicus) er identisk i dets aminosyresekvens til A2-varianten av den kjente melkeku (Bos taurus). Maasai-folket i Sentral-Afrika drikker store mengder kumelk fra Bos indicus fra svært ung alder, men utvikler ikke diabetes, mens folk fra Finland som drikker tilsvarende store mengder melk fra blandet Bos taurus har en meget høy forekomst av diabetes.

Eksempel 1: Finske og Samoanske dietter gitt til NOD-mus.

Basert på disse observasjoner har vi undersøkt effekten av menneskelige spedbarnsdietter gitt til et 1 år gammelt normalt finsk barn (som har en påfølgende risikorate for diabetes på 40/100.000/år i de påfølgende 15 år), og tilsvarende dietter innsamlet fra barn fra Samoa (hvor den påfølgende forventede diabeteshyppighet er <1/100.000/år) på de diabetes-mottagelige NOD-mus.

Dietter fra finske og Vest-Samoanske barn ble innsamlet fra 10 barn fra hvert sted. Barna var 10-14 måneder gamle. Familiene tilhørte kooperativ middelklasse, og innsamlingene ble ledet av en trenet ernæringskonsulent, som også spurte foreldrene om å frembringe en oversikt over typer og mengder av næringen som var gitt.

Idet hver porsjon mat og drikke ble gitt til barnet ble et tilsvarende kvantum plassert i en beholder. Denne ble holdt frossen inntil en mengde tilsvarende 10 dager var innsamlet. Deretter ble maten frysetørket og sendt til New Zealand. Maten ble sterilisert ved gammastråling før den ble gitt til musene.

Barna i disse to grupper konsumerte <100 ml og >500 ml kumelk per dag respektivt i Samoa og Finland.

Diettene ble deretter gitt til grupper av NOD-mus fra de sluttet å die, enten som den eneste diett eller som en

10% vekt/vekt-tilsetning til et soyabasert materiale for barn av typen ProsobeeTM, som tidligere var vist å ikke forårsake diabetes i denne muse-stamme. Hyppighet av diabetes i de påfølgende 250 dager ble deretter undersøkt.

- 5 Resultatene er vist i tabell 2. Den finske diett er mer (ca. tre ganger) diabetogen enn dietten fra Samoa, og dette korresponderer ca. til den relative andel av kumelk i de to dietter.

10

TABELL 2

Effekt av duplikate barnedietter fra Finland
og Vest-Samoa på hyppighet av diabetes
i NOD-mus som mates med disse dietter
15 etter avsluttet diing

Diett	Antall dyr	Antall dyr som har utviklet diabetes etter 250 dager	%	"p"-verdi (Fisher Exact Test)
1a) Diett fra Vest-Samoa	24	14	58	avb
b) Finsk diett	20	16	80	0,112
2a) 10% diett fra Vest-Samoa i Prosobee TM IF	43	4	9	avb
b) 10% Finsk diett i Prosobee TM IF	39	13	33	0,007*
3) Kun Prosobee TM IF	33	0	0	Prosobee TM IF v2A.113 Prosobee TM IF v2b.00Q*

- "p"-verdien er det statistiske estimat i styrken på observasjonene at der er en forskjell mellom de to grupper. Vanligvis aksepteres en "p"-verdi på mindre enn 0,05 som sterkt signifikant, noe som vises med en stjerne. De andre symboler i hver rute refererer sammenligningen som utføres, f.eks. i den første rute benevnes "a" 1a, dvs. andelen 14/24, og symbolet "b" til forholdet 16/24, der "v" er "versus". I dette eksempel betyr en p-verdi på 0,112 at dette resultat kan ha oppstått tilfeldig 11,2
- 20
- 25

ganger av 100. IF betyr infant formula (materiale for barn).

Eksempel 2: NOD-mus som ble føret med hydrolysert kasein og kasein

Tilsvarende grupper av mus ble føret med en diett der den eneste nitrogenkilde var hydrolysert kasein, eller kasein. Kun de mus som ble føret med kasein utviklet diabetes (tabell 3).

TABELL 3

Effekt av kasein-hydrolysert infant formula (PregestimilTM) og tilsvarende intakt kasein infant formula (PortagenTM) på hyppighet av diabetes i NOD-mus føret med disse dietter etter avsluttet diing

Type	Antall dyr	Antall dyr som utvikler diabetes	%	"p"-verdi (Fisher Exact Test)
Hydrolysert kasein	49	1	2	0,001*
Intakt kasein	29	8	28	

Eksempel 3: NOD-mus føret med A₁- og A₂-varianter av β -kasein fra ku og myseproteiner.

Tilsvarende grupper av mus ble føret med en diett av soya infant formula ProsobeeTM og 10% vekt/vekt av:

- a) β -kasein A1-variant,
- b) β -kasein A2-variant,
- c) myse,
- d) Bos indicus kasein, eller
- e) en 50/50-blanding av β -kasein A1-variant/A2-variant.

Den påfølgende hyppighet av diabetes i gruppene er vist i tabell 4. β -kasein A1-varianten utviklet diabetes i 9 eller 20 tilfeller, mens A2-varianten ikke utviklet diabetes i noen tilfeller, og A1/A2-blandingen i 4 av 20 tilfeller. Resultatene midt mellom A1 og A1 alene, er i samsvar med det at der er ingen interaksjon mellom A1 og A2. Kun 7% av mus føret med myseprotein utviklet diabetes.

TABELL 4

Effekt av bovin β -kasein A1- og A2-varianter og
 myseproteiner på hyppighet av diabetes
 i NOD-mus føret med disse proteiner
 som en 10% tilsetning til ProsobeeTM
 infant formula fra avsluttet diing

	Antall dyr	Antall dyr som har utviklet diabetes etter 250 dager	%	"p"-verdi (Fisher Exact Test)
a) 10% β -kasein A1-variant	20	9	45	avb 0,001* avc 0,003*
b) 10% β -kasein A2-variant	18	0	0	bvc N.S.
c) 10% myse	29	2	7	
d) 10% Bos indicus kasein*	20	0	0	bvd N.S
e) 10% β -kasein A1/A2- varianter (lik blanding)	20	4	20	

* Påvist å inneholde kun A2-varianten (se eks. 7).

Fra dyreforsøkene i eksempler 1-3 kan det konkluderes
 at den blandete kasein fra melk er diabetogen i NOD-mus og
 at denne egenskap representeres av β -kasein A1-varianten.

Eksempel 4: Sur ureaanalyse for å klassifisere melk for β - kasein-variant

Polyakrylamidgelelektroforese (PAGE) ble utført på et
 Biorad Mini Protean II system (tilgjengelig fra Biorad
 Laboratories, Hercules, California, USA). Metoden sepa-
 rerte kvalitativt varianter av β -kasein på grunnlag av
 nettoladning og molekylvekt.

Alle reagensene er av analytisk kvalitet dersom ikke
 annet er gitt.

28,5 ml is-eddik ble fortynnet til 500 ml med de-
 ionisert vann (Milli-Q-vann) for å tillage buffer. 500 ml
 buffer ble anvendt pr. kjøring.

Sur urea stacking gel løsning.

Den sure urea stacking gel løsning ble tillaget ved å veie opp de følgende reagenser og løse dem i Milli-Q-vann til ca. 80 ml. pH ble justert til 4,1 med eddiksyre, og

5 det ble fylt opp til 100 ml i en målesylinder.

- 36,04 g urea
- 6,0 g akrylamid/bis forhåndsblandet (5% C) Serva
- 0,113 g ammoniumacetat
- 0,178 g tiourea
- 10 1,48 ml is-eddik

Sur urea "Resolving" gel-løsning

De følgende reagenser ble oppløst i Milli-Q-vann til ca. 130 ml, pH justert til 3,86 med eddiksyre, og fylt på

15 til 150 ml i en målesylinder.

- 9,75 g akrylamid/bis forhåndsblending (5% C) Serva Research Grade
- 40,36 g urea
- 9,48 ml is-eddik
- 20 0,72 g ammoniumacetat
- 0,26 g tiourea

Sur ureaprøve-buffer

En sur ureaprøve-buffer ble tillaget ved å veie ut de

25 følgende reagenser og oppløse dem i ca. 350 ml Milli-Q-vann. pH ble justert til 4,16 med eddiksyre, og volumet ble fylt opp til 400 ml.

- 163,18 g urea
- 6,69 ml is-eddik
- 30 0,451 g ammoniumacetat

En løsning a bromfenol Blue (0,4 vekt/volum) ble tillaget ved å oppløse 1,6 g bromfenol blue med 6,8 ml NaOH (0,1 M). Dette ble deretter fortynnet til 400 ml med

35 Milli-Q-vann.

En avfargingsløsning ble tillaget ved å blande 8 l Milli-Q-vann, 1.000 ml is-eddik og 1.000 ml isopropanol.

En fargeløsning av Coomassie blue R ble tillaget ved

å oppløse 1,00 g "brilliant blue R" i 500 ml isopropanol, tilsette 200 ml is-eddik og fylle på til 2 liter med Milli-Q-vann. Løsningen ble tildekket med gasstett vikle-
 5 ved å anvende en trakt av typen Buchner og filterpapir av typen Whatman nr. 1.

Oppløsnings-gelløsningen ble posisjonert mellom glassplatene i et elektroforeseapparat. "Stacking-gelen" ble også posisjonert mellom glassplatene, og den fikk
 10 polymerisere i samsvar med kjente teknikker.

Prøvene av β -kaseinvariantene ble i 25 μ l prøver tilsatt til 750 μ l prøvebuffer. 10 μ l 2-merkaptoetanol ble tilsatt, og prøvene ble satt til henstand i minst 1 time ved romtemperatur, eller over natten ved 4°C. Prøvene ble
 15 kjørt i prøvespor. Prøvene ble applisert med en sprøyte.

Kraftelementet i apparatet ble satt til følgende:

Program	=	T/V-H
Strøm	=	70 mA
Feltstyrke	=	210 V
20 Wattstyrke	=	6,5
Tid	=	1 time for 2 geler

Etter en kjøretid på 1 time ble krafttilførselen slått av, og energiforsyningskablene ble koblet fra.
 25 Gelene ble fjernet fra platen i apparatet og overført til et bad med fargeløsning (ca. 1 time). Etter avfarging i avfargingsløsning (mindre enn 1 time) ble gel-beholderen plassert på en lysboks og et fotografi ble tatt for å identifisere båndene.

30 Fotografier av båndene er vist i fig. 1. Prøvene i de forskjellige sporene er identifisert. Båndmønsteret for β -kasein-variantproteiner på en sur urea PAGE gel er (starter fra topp); A3-variant, A2-variant, A1-variant og B-variant.

Eksempel 5: Revers fase HPLC og massespektrometrianalysemetode for å klassifisere melk for β -kaseinvariant

β -kaseinvarianter i melk kan klassifiseres ved å anvende fremgangsmåten ifølge Visser et al (1995). Publikasjonen beskriver at F-varianten ble identifisert ved å anvende revers fase HPLC, etterfulgt av elektrostry-ionisering og "fast atom bombardment" for å bestemme molekylvekter og karakterisere aminosyre-substitusjoner i proteinet. De andre varianter kan bestemmes ved å anvende de samme teknikker.

Eksempel 6: Direkte klassifisering av genotype av kuer eller okser

DNA som er ekstrahert fra frossen sæd fra okser ble direkte sekvensert ved polymerasekjedereaksjon (PCR) for å detektere sekvensene for bovin- β -kasein-varianter i samsvar med fremgangsmåten ifølge Lien et al (1992).

Sæd som inneholder de ikke-diabetogene alleler som ble detektert kan anvendes i et avlsprogram.

Eksempel 7: Separering av β -kasein A1- og A2-varianter

1. Identifisering av fenotype.

Kuer (*Bos taurus*) som er homozygote for β -kasein-variantene A1 og A2-gener (β -kasein A1A1 og A2A2 fenotypekuer) ble identifisert ved polyakrylamidgelelektroforese (PAGE) i melkeprøver fra individuelle kuer ved å anvende sur ureagelsystem som beskrevet i eksempel 4.

Prøver av New Zealand kasein (Alacid 710TM) og kasein fremstilt fra melk som er innhentet fra en bøling av australske *Bos indicus*-kuer ble også underlagt PAGE som beskrevet ovenfor i eksempel 4. Alacid 710TM kasein fremstilles av et melkeforråd fra New Zealand, som er produsert fra flere tusen kuer med forskjellig β -kasein fenotyper.

De relative mengder av de forskjellige genetiske varianter av β -kasein i Alacid 710™ kasein ble bestemt ved computer-densiometri i en fremgangsmåte beskrevet av Hill (1993) og Singh og Creamer (1991). Resultatene er angitt i tabellform i tabell 5.

TABELL 5

β -kasein variant	% mengde i Alacid 710	Område (N=9)
A1	40,0	38,4-41,4
A2	51,5	48,1-53,3
B	7,5	6,5-8,5
A3	1,0	0,2-1,7

10

Australsk *Bos indicus* kasein ble funnet å inneholde kun β -kasein-A2-varianten.

2. Melkeproduksjon, segregasjon og innsamling

15

Fra et antall på 3.183 kuer, lokalisert ved 25 store gårder i områdene Manawatu og Waikato på New Zealand, ble ca. 400 kuer selektert og plassert på en enkelt farm som en blandet bøling, slik at β -kasein A1A1- og A2A2-fenotyper i denne bøling ble underlagt identisk farmdrift og fôringspraksis. Melk fra enten β -kasein A1A1- eller A2A2-fenotyper ble adskilt ved å anvende et dobbelt sett av forsyningslinjer, og innsamlet i separate avkjølte kar, slik som beskrevet av Hill (1993). Forrådet av β -kasein A1A1- og A2A2-fenotypemelk ble deretter pumpet over i separate beholdere i melketanker før det ble tanket over til "New Zealand Dairy Research Institute Pilot Plant".

20

25

3. Fremstilling av kasein

30

Melke-kasein ble fremstilt i "New Zealand Dairy Research Institute Pilot" fra β -kasein A1A1- og A2A2-fenotype-forrådsmelk ved å anvende fremgangsmåter som i hovedsak er identiske til de som anvendes i standard kommersiell fremstilling av melke-kasein i meierier på New

Zealand (se Muller, 1986). Dette kasein, sammen med andre bestanddeler, ble deretter anvendt i fôringsforsøkene som beskrevet i eksempler 2 og 3.

5 Eksempel 8: Immunostimulerende peptider fra β -kasein

Delvis hydrolyserte, blandete kaseiner inneholdende en rekke forskjellige peptider er også diabetogen, enten det gies som en soya-formel i dietten, eller ved injisering til mus føret på soya-materiale. Dette antyder at
10 det intakte kaseinmolekyl ikke er nødvendig for den diabetogene funksjon. Blant peptidene som er motstandsdyktig i forhold til hydrolyse er heksapeptidet Pro-Gly-Pro-Ile-His-Asn, vist i fig. 2.

Peptider av β -kasein har blitt funnet å stimulere de
15 humane immunsystemer (Meisel og Schlimme, 190, Fox og Flynn, 1992). M'Hamiel Jzairi et al (1992) har vist at der er et spesifikt bindingssete på human makrofag for det immunostimulerende peptid Val-54 til Tyr-59 fra humant β -kasein. Selv om heksapeptidet Pro-63 til Asn-68 fra bovin
20 β -kasein (uthevet i den fullstendige β -kasein A1-variant aminosyresekvens angitt i fig. 2) har blitt funnet å stimulere den fagocytiske aktivitet av murine makrofager (Migliore-Samour et al., 1989) har binding av dette peptid til humane makrofager til nå ikke blitt vist.

Ved å anvende fremgangsmåten beskrevet i M'Hamiel Jaziri et al (1992) ble den humane makrofagbinding av bovinpeptidene Pro-63 til Asn-68 (fra β -kasein A1- og A2-variantsekvensene) undersøkt og sammenlignet med bindingen av peptidet Val-54 til Tyr-59 fra human β -peptid til hver
30 av en normal human makrofag og en prediabetisk human makrofag. Resultatene er angitt nedenfor, i tabell 6. De viser at både bovin A1 og A2 og humane heksapeptider binder spesifikt både til normale humane makrofager og til prediabetiske makrofager, noe som innebærer en viss immun-
35 funksjon.

Med det lave antall involverte (tre individer i hver gruppe) binder de "prediabetiske" makrofager peptidene med en aktivitetsrekkefølge; A1>A2>human, mens normale makro-

fager binder A1=A2=human. A2 bindes i samme grad av normale og prediabetiske makrofager. Dette betyr at de prediabetiske makrofager er mer tilbøyelig enn normale til å presentere A1-peptidet til immunsystemet, noe som kan være grunnen til det høyere nivå av antistoff til A1-kaseinvarianten funnet i nylig diagnostiserte diabetikere.

TABELL 6

10 Binding av tritierte heksapeptider til PB-monocyt/ makrofager (+ glukose, NaN₃, Captopril, Benzylsuccinat, Elastatinal)

NORMAL PBM (N=3)		
Peptid	CPM	Forhold */**
Human	2.750*	1,2
Bovin A1	2.220**	
A2	2.900	
PREDIABETISK PBM (N=3)		
Human	1.400*	0,31
Bovin A1	4.500**	
A2	2.750	

15 β-kasein A3-, D- og E-variantene inneholder hver en heksapeptidsekvens mellom Pro-63 og Asn-68 som er identisk til den som finnes i β-kasein A2-varianten (prolin ved posisjon 67). Imidlertid er β-kasein A1-, B-, C- og F-variantene substituert i posisjon prolin-67 med en histidinenhet.

20 Antistoff til blandete kaseiner er funnet i høyere nivåer i nylig diagnostiserte diabetikere (IDDM) enn i normale kontroller (fig. 3) og denne forskjell synes å skyldes de høyere nivåer av antistoff som er rettet mot A1 istedenfor A2-kaseiner i diabetikerne. Testing av antistoffene ble utført med Enzym Immuno-analyse. I denne analysen bindes kaseinene til veggen av en plastikkbeholder og serum som inneholder antistoffene bringes i kontakt med bundet kasein. Etter inkubering dekanteres serum av, og

antistoff som foreligger vil være bundet til kaseinet. Det bundne antistoff måles deretter ved en fargereaksjon.

5 Fra det ovennevnte kan det konkluderes at kumelk β -kasein A1-varianten er diabetogenisk i NOD-musen, mens β -kasein A2-varianten ikke er det. Et fragment som er motstandsdyktig mot oppkutting av disse kaseiner kan binde til antigenpresenterende celler i mennesker, og i tilfelle diabetes kan en øket respons til β -kasein A1-varianten observeres.

10 Sammen med de epidemiologiske observasjoner som viser forskjell i hyppighet av diabetes i barn som mottar store mengder av β -kasein A1 og A2-varianter, såsom funnet i den finske diett sammenlignet med de som kun mottar β -kasein identisk med A2-variant, (Maasaiene), er det sannsynlig at
15 β -kasein A1-varianten er den hovedenhet i kumelk som er diabetogen for mennesker.

Eksempel 9: Måling av anti-kasein antistoff i nylig diagnostiserte diabetikere og alderstilpassete normaler

20 Antistoff ble målt ved en ELISA-teknikk der det benyttes immunoglobulin G subklasse måling for å utvikle det klasespesifikke antistoffnivå.

TABELL 7

Nivåer av antistoff til renset A1 og A2 β -kasein,
klassifisert ved Subtype IgG

5

Angrepet av diabetes (barn i alder 1-12 år)					Normale (alderstilpasset)			
Diabetisk					Normal			
IgG-klasse (OD)	1	2	3	4	1	2	3	4
nr. 1 A1	0,086	0	0	0	0	0	0	0
A2	0,072	0	0	0	0	0	0	0
nr. 2 A1	0,029	0	0,038	0	0	0	0	0
A2	0	0	0,022	0	0	0	0	0
nr. 3 A1	0,106	0,048	0,138	0,610	0	0	0	0
A2	0,045	0,056	0,104	0,529	0	0	0	0
nr. 4 A1	0	0	0	0	0	0	0	0
A2	0	0	0	0	0	0	0	0
nr. 5 A1	0,021	0	0,237	0	0	0	0	0
A2	0	0	0,250	0	0	0	0	0
nr. 6 A1	0,098	0,042	0,025	1,374	0	0	0	0
A2	0,052	0,022	0	1,110	0	0	0	0
nr. 7 A1	0,075	0	0	0,165	0	0	0	0,083
A2	0,057	0	0	0,099	0	0	0	0,052
nr. 8 A1	0,128	0	0,028	0,219	0	0	0	0
A2	0,068	0	0	0,066	0	0	0	0
nr. 9 A1	0,210	0,049	0,195	0,397	0	0	0	0,03
A2	0,197	0,043	0,155	0,397	0	0	0	0
nr. 10 A1	0,669	0	0,286	0,539	0	0	0	0
A2	0,606	0	0,272	0,525	0	0	0	0
nr. 11 A1	0	0	0,171	0,162	0,249	0,041	0,213	0,052
A2	0	0	0,144	0,171	0,272	0,043	0,174	0,044
nr. 12 A1	0,045	0	0,061	0,039	0,372	0	0,385	0,233
A2	0	0	0,046	0	0,256	0	0,362	0,031

Tabell 7 (forts.)

Angrepet av diabetes (barn i alder 1-12 år)					Normale (alder tilpasset)			
Diabetisk					Normal			
IgG-klasse (OD)	1	2	3	4	1	2	3	4
nr. 13 A1	0,023	0	0,066	0	0,051	0	0,026	0
A2	0	0	0,046	0	0,04	0	0,026	0
nr. 14 A1	0	0	0	0	0	0	0,056	0,021
A2	0	0	0	0	0	0	0,051	0
nr. 15 A1	0,042	0	0,124	0,035	0,083	0	0,242	0,129
A2	0,054	0	0,114	0,036	0,071	0	0,246	0,129
nr. 16 A1	0,154	0	0,234	0,061	0	0	0,092	0
A2	0,106	0	0,234	0,051	0	0	0,103	0
nr. 17 A1	0,132	0,069	0,285	0,139	0,073	0	0,147	0,079
A2	0,097	0,052	0,254	0,153	0,063	0	0,109	0,025
nr. 18 A1	0,076	0	0,131	0,059	0,075	0	0,116	0,029
A2	0,062	0	0,108	0,049	0,069	0	0,109	0,025
nr. 19 A1	0,049	0	0,056	0,023	0,044	0,056	0,056	0,097
A2	0,051	0	0,050	0,020	0,034	0,046	0,052	0,091
nr. 20 A1	0,149	0	0,220	0,077	0,237	0,304	0,333	0,294
A2	0,106	0	0,188	0,056	0,227	0,277	0,325	0,273

Best diskriminant er IgG1+3 mot A1 β -kasein 18/20 v 9/20 ($p=0,003$)

5

IgG2+4

13/20 v 9/20 ($p=0,204$)

Forholdstallene for respons for IgG1+3 til de to β -kaseiner synes også å være forskjellig mellom diabetikere og normale, idet de for diabetikere er høyere.

5 (9/20-diabetikere har et forholdstall på $>1,3$, mens 0/20 har dette høye forholdstall blant de normale ($p=0,001$)).

IgG(1+3) representerer en Th1 ("hjelper") respons mens (IgG+4) representerer en Th2 ("dempende") respons.

10 Fra disse data synes det sannsynlig at diabetikere, oftere enn normale:

1) utvikler en immunrespons til β -kaseiner,
2) at disse oftere er en IgG1+3 respons enn en IgG2+4 respons, og

15 3) at disse responser oftere er rettet mot A1 β -beta kasein enn A2.

REFERANSELISTE

- R. Aschaffenburg og J. Drewry, *Nature*, Vol 176, 1995, p 218-219.
- 5 K.F. Ng-Kwai-Hang, J.F. Hayes, J.E. Moxely og H.G. Monardes, *J. Dairy Sci*, Vol 67, 1984, p 835-840.
- L.K. Creamer, *Bulletin of the International Dairy Federation, Advanced Dairy Chemistry, Vol 1: Proteins*, 10 261. International Dairy Federation, Brussel, Belgia, 1991.
- F. Grosclaude, *Productions Animales, INRA*, Vol 1, 1988, p 15 5-17.
- P.F. Fox og A. Flynn, *Advanced Dairy Chemistry, Vol 1: Proteins* (Red. Fox P F) Elsevier Science Publishers, Ltd. London, 1992, p 255-284.
- 20 J.P. Hill, *J. Dairy Sci*, Vol 76, 1993, p 281-286.
- H. Meisel og E. Schlimme, *Trends in Food Science and Technology*, X, 1990, p 41-43.
- 25 T.B. Mepham, P. Gaye, P. Martin og J.C. Mercier, *Advanced Dairy Chemistry, Vol 1: Proteins* (Ed. Fox P F) Elsevier Science Publishers Ltd., London, 1992, p 491-543.
- 30 M'hamiel Jaziri et al, *Biochim, Biophys, Acta*, Vol 1160, 1992, p 251-261.
- D. Migliore-Samour, Floch og P. Jolles, *J. Dairy Res.*, Vol 56, 1989, p 357-362.
- 35 L.L. Muller, *Developments in Dairy Chemistry, Vol 1: Proteins* (Red. Fox P F) Elsevier Science Publishers Ltd., London, 1986, p 315-337.

K.F. Ng-Kwai-Hang og F. Grosclaude, Advanced Dairy Chemistry, Vol 1: Proteins (Ed. Fox P F) Elsevier Science Publishers Ltd, London, 1992, p 405-455.

5

H. Singh og L.K. Creamer, J. Dairy Res., Vol 58, 1991, p 269.

10 H.E. Swaisgood, Advanced Dairy Chemistry, Vol 1: Proteins (Ed. Fox P F) Elsevier Science Publishers Ltd., London, 1992, p 63-110.

N.F. Shcard, Nutrition Reviews, Vol 51, 1993, p 79-89.

15 R.D. Leslie og R.B. Elliott, Early Environmental Events As a Cause of IDDM, Evidence & Implications, Diabetes, Vol 43, 1994, p 843-850.

20 S.M. Virtanen, L. Rasanen, K. Ylonen, A. Aro, D. Clayton, B. Langholz, J. Pitkanieni, E. Savilahti, R. Lounamaa, J. Tuomilehto, H.K. Akerblom, Childhood Diabetes in Finland, (1993), Early Introduction of Dairy Products Associated with Increased Risk of IDDM in Finnish Children. The Childhood in Diabetes in Finland Study Group, Diabetes Vol 42 (12. desember), p 1786-1790.

30 R.B. Elliott og J.M. Martin, Dietary Protein: A Trigger of insulin-dependent diabetes in the B.B. Rat? Diabetologia, Vol 26, 1984, p 297-299.

R.B. Elliott, Epidemiology of Diabetes in Polynesia and New Zealand. In Epidemiology and etiology of Insulin-Dependent Diabetes in the Young, Vol 21, 1992, (Red.: C. Levy-Marchal, P. Czernichow), Pediatr. Adolesc. Endocrinol, Karger, Basel, p 66-71.

35

R.B. Elliott, N. Bibby, S. Reddy, "Casein Peptide
Precipitated diabetes in the NOD Mouse and Possibly
Humans". In Genetic and Environmental Risk Factors for
Type 1 Diabetes (IDDM), Including a Discussion on the
5 Autoimmune Basis. Red.: Z. Laron og M. Karp Freund
Publishing House Ltd.

S. Lien, P. Alstrom, H. Klunghand og S. Rogne, Animal
Genetics, Vol 23, 1992, p 333-338.

10

C.R. Southward & N.L. Walker, The Manufacture and
Industrial Use of Casein, New Zealand Journal of Dairy
Science and Technology, Vol 15, 1980, p 201-217.

15 Servaas Visser, Charles J. Slangen, Fija M. Lagerwerf,
William D. Van Dongen, Johan Haverkamp: Identification of
a new genetic variant of bovin β -kasein using reversed-
phase high-performance liquid chromatography and mass
spectrometric analysis, Journal of Chromatography A, Vol
20 711, 1995, p 141-150.

P A T E N T K R A V.

1. Fremgangsmåte for å selektere melk for
tilstedeværelse av en ikke-diabetogenisk variant av β -
5 kasein og fravær av en diabetogenisk variant,
k a r a k t e r i s e r t v e d at melk fra
identifiserte kuer testes for tilstedeværelse av varianter
av β -kasein, og selektering av de kuene hvis melk
inneholder A2, A3, D eller E varianter og ikke inneholder
10 A1, B, C eller F varianter, og separat melking av kuene
som produserer A2, A3, D eller E melkevarianter, og
tilveiebringelse og opprettholdelse av melken deres
separat fra melk fra enhver annen kilde.
- 15 2. Fremgangsmåte i samsvar med krav 1,
k a r a k t e r i s e r t v e d at den ikke-
diabetogeniske variant er A2 varianten av β -kasein.
3. Fremgangsmåte i samsvar med krav 1,
20 k a r a k t e r i s e r t v e d at den ikke-
diabetogeniske variant er A3, D eller E varianten av β -
kasein.
4. Fremgangsmåte i samsvar med et av kravene 1-3,
25 k a r a k t e r i s e r t v e d at den diabetogene
variant er A1 varianten av β -kasein.
5. Fremgangsmåte i samsvar med et av kravene 1-3,
k a r a k t e r i s e r t v e d at den diabetogene
30 variant er en B, C eller F variant.
6. Fremgangsmåte i samsvar med krav 1,
k a r a k t e r i s e r t v e d at analyse av melk fra
identifiserte kuer for tilstedeværelse av heksapeptidet
35 Pro-Gly-Pro-Ile-His-Asn som korresponderer med aminosyrer
63 til 68 i A1 varianten av β -kasein eller et protein-
fragment av β -kasein inneholdende heksapeptidet Pro-Gly-
Pro-Ile-His-Asn, og selektering av de kuer hvis melk ikke
inneholder heksapeptidet eller proteinfragmentet som

inneholder heksapeptidet, og separat melking av de kuer
hvis melk ikke inneholder heksapeptidet eller
proteinfragmentet som inneholder heksapeptidet, og
tilveiebringelse og opprettholdelse av melken deres
5 separat fra melk fra enhver annen kilde.

7. Fremgangsmåte i samsvar med krav 6,
k a r a k t e r i s e r t v e d at den selekterte melk
også testes for tilstedeværelse av heksapeptidet eller
10 proteinfragmentet inneholdende heksapeptidet, og at melk
som inneholder heksapeptidet eller proteinet som
inneholder heksapeptidet kastes.

8. Fremgangsmåte i samsvar med et av kravene 1-7,
15 k a r a k t e r i s e r t v e d at melken bearbeides
til et melkeprodukt.

9. Melk, k a r a k t e r i s e r t v e d at den er
selektert og tilveiebrakt ved fremgangsmåten ifølge et av
20 kravene 1-7.

10. Ikke-diabetogenisk melkeprodukt,
k a r a k t e r i s e r t v e d at det er fremstilt
ved fremgangsmåten ifølge krav 8.

25 11. Melk i samsvar med krav 9, eller et melkeprodukt i
samsvar med krav 10, k a r a k t e r i s e r t v e d
at melken eller melkeproduktet er fra geit, sau, bøffell,
eller et annet pattedyr hvis melk er egnet for menneskelig
30 konsum.

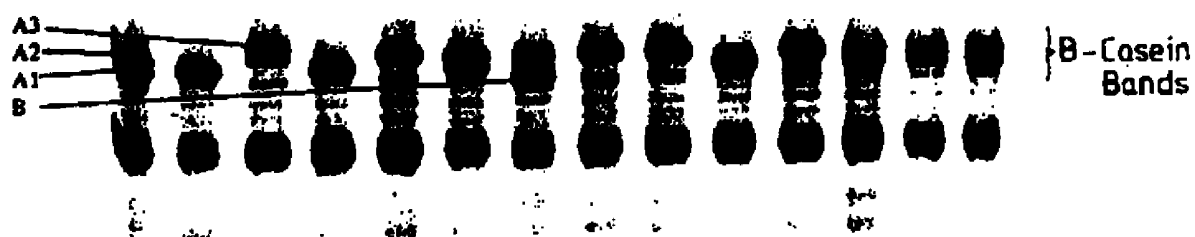
12. Fremgangsmåte for å redusere risikoen for å utvikle
diabetes Type-1 i et mottakelig individ,
k a r a k t e r i s e r t v e d at individets inntak
35 av melk eller melkeprodukter begrenses til melk ifølge
krav 9 eller melkeprodukter ifølge krav 10.

13. Fremgangsmåte for å selekttere avlskuer eller avlsokser som produserer hunnkalver hvis melk ikke inneholder A1, B, C eller F varianter av β -kasein, k a r a k t e r i s e r t v e d bestemmelse av 5 genotypen til kuene eller oksene og selektering av de kuer eller okser hvis hunnkalver produserer melk som ikke inneholder A1, B, C, eller F varianter av β -kasein.

14. Fremgangsmåte i samsvar med krav 14, 10 k a r a k t e r i s e r t v e d at selekteringen av hunnkalver for å bestemme oksenes genotype utføres ved å teste melk av hunnkalvene for fravær av A1, B, C, eller F varianter av β -kasein og tilstedeværelse av A2, A3, D eller E varianter av β -kasein.

15 15. Sød fra okser og deres avkom, k a r a k t e r i s e r t v e d at oksene og deres avkom er selektert ifølge krav 13.

1/3



A1A2 A1A1 A2A3 A1A1 A2A2 A1A2 A2B A2A2 A2A2 A1A1 A2A2 A1A2 A1A2 A1A2

Phenotypes

FIG 1

Bovine β -casein A1

Immuno stimulating peptide

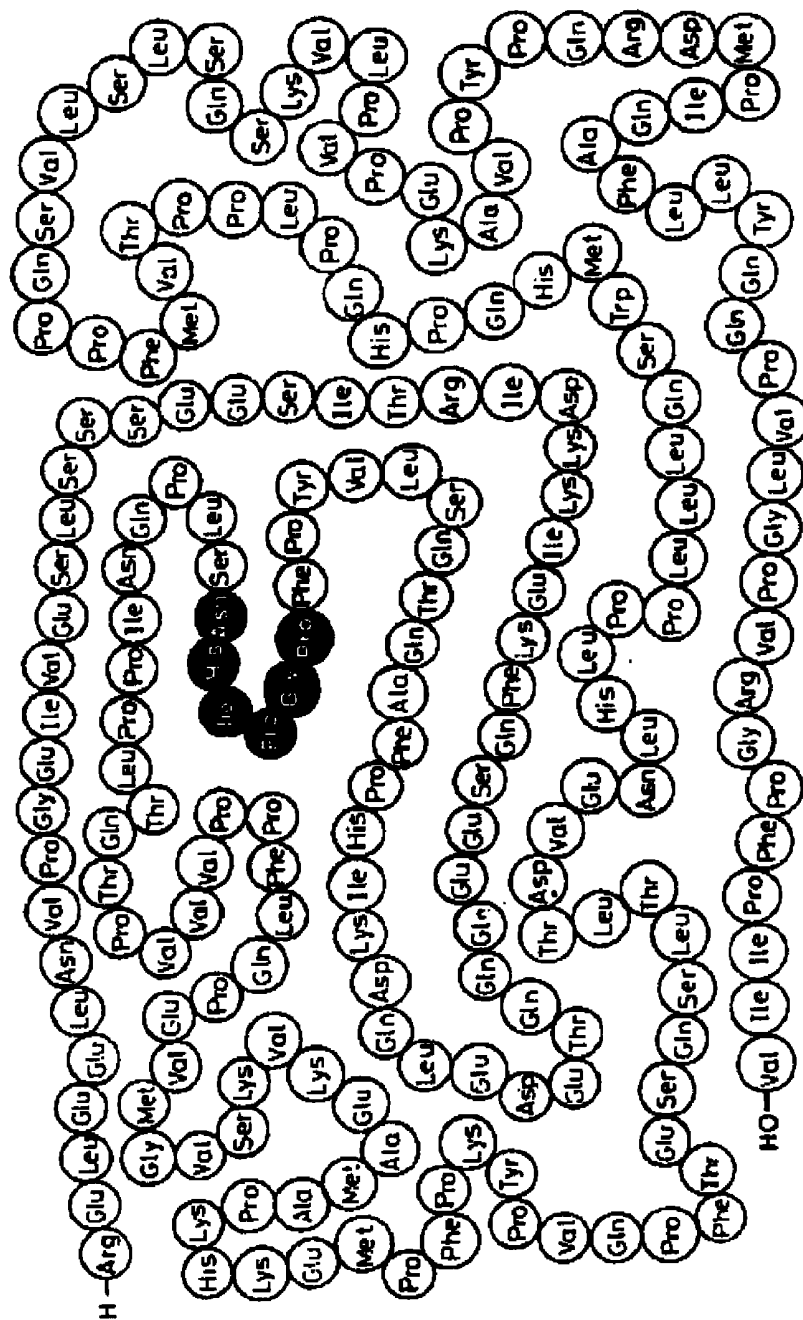


FIG 2

FIG 3

