

# Afslutningsrapport

Fortsat karakterisering af hypoallergene mælkeprodukter

Mejeribrugets ForskningsFond

Rapport nr. 1999-27

August 1999



**mejeri**foreningen

danish dairy board

## **Afslutningsrapport**

- Fortsat karakterisering af hypoallergene mælkeprodukter

Mejeribrugets ForskningsFond – FØTEK

August 1999

## Resumé

De tre hypoallergene moderermælksstatninger Nan HA, Profylac og Nutramigen er analyseret med henblik på at vurdere deres potentielle allergenicitet.

Fysisk-kemiske og immunkemiske analyser viste, at Nan HA indeholder så mange og så store fragmenter af mælkeproteiner, at de helt sikkert vil kunne udløse allergisk respons i personer, som har udviklet allergi mod komælk. Derimod er det ikke sikkert, at indtagelse af Nan HA vil give anledning til udvikling af allergi i samme grad som komælk.

Ved fysisk-kemiske analyser af profylac har det ikke været muligt at påvise komponenter med MW større end 3.500. De største af de påviste komponenter var glycopeptider. Det er med god margin indenfor den grænse, som producenten har deklareret, men det kan ikke udelukkes at fragmenter af den størrelse kan være immunogene.

I Nutramigen er kontaminerende proteiner med MW på ca. 20.000 blevet påvist. De er identificeret som zeiner, en gruppe proteiner fra majs.

I en model baseret på langtidsimmunisering af mus kunne der påvises immunogene komponenter i alle testede hypoallergene mælkeprodukter. Efter 8 mdr's immunisering var det maximale respons nået for alle de komponenter, der blev testet for. Immunogeniciteten af Nan HA, Profylac og Nutramigen imod mælkeproteiner var signifikant forskellig, faldende i den nævnte rækkefølge. Ved immunisering med Nutramigen dannes antistoffer imod de identificerede majsproteiner.

Resultaterne fra immunisering af mus er i overensstemmelse med de fysisk kemiske analyser, men viser at metoden er mere følsom. Således var der et klart respons imod  $\beta$ -lactoglobulin, som kun kunne påvises som små peptider, der ikke kan tænkes at være immunogene. Resultaterne er også i overensstemmelse med publicerede kliniske resultater, idet der dog ikke er kliniske data til støtte for en forskel på Nutramigen og Profylac.

Immunisering af kaniner bekræftede resultaterne fra immunisering af mus.

## Summary

Three hypoallergenic formula, Nan HA, Profylac and Nutramigen were analysed in order to evaluate their allergenic potential.

By physical-chemical and immunochemical analyses it was demonstrated that Nan HA consists of so large fragments of milk proteins that any milk allergic patient must be expected to react towards that product. This does not mean that the potential to induce allergy in a non-allergic person is the same as for ordinary cow's milk.

Physical-chemical analyses of Profylac has only revealed fragments well within the limits given by the manufacturer. Anyhow, the largest peptides were glycopeptides of MW 3.500, and it is not certain that glycopeptides of that size are not immunogenic.

In Nutramigen contaminating proteins of MW above 20.000 were detected. They were identified as proteins from maize, zeins.

In a model based on long-time immunisation of mice immunogenic components were demonstrated in all tested hypoallergenic products. After 8 months of immunisation the maximal response was reached for all tested antigens. The immunogenicities towards milk proteins differed significantly for the three products Nan HA, the highest, Profylac lower and Nutramigen the lowest.

Immunisation with Nutramigen gave rise to antibodies towards the maize proteins. The results from immunisation are in accordance with the results from the physical-chemical analyses, but the immunisation method is the more sensitive. There was a very well defined response towards  $\beta$ -lactoglobulin after immunisation with Profylac although only small peptides from  $\beta$ -lactoglobulin could be detected in Profylac. The results are also in agreement with published clinical data, although there is no evidence for differences between Profylac and Nutramigen.

The results from immunisation of mice were confirmed by immunisation of rabbits.

## **Fortsat karakterisering af hypoallergene mælkeprodukter**

Dette projekt er en fortsættelse af projektet "Fysisk-kemisk karakterisering og udvikling nye metoder til analyse af hypoallergene mælkeprodukter" (FØTEK I, Afslutningsrapport ved Annette Rosendal og Vibeke Barkholt september 1998). Projektet omfattede karakterisering af 12 hypoallergene modernælkserstatninger samt 6 andre proteinhydrolysater. Det projekt var den ene del af projektet "Relationer mellem allergiforebyggende effekt og kemisk sammensætning for nogle hypoallergene modernælkserstatninger". Den anden del af projektet var en klinisk undersøgelse af den allergiforebyggende effekt af tre hypoallergene modernælkserstatninger, Nan HA, Profylac og Nutramigen.

Udgangspunktet var resultaterne fra det første projekt:

- \* Ved SDS-PAGE kunne der i alle produkter påvises protein-komponenter med en tilsyneladende MW så stor, at de må antages at være immunogene, dvs. kunne give anledning til dannelse af antistoffer. immunogene komponenter er potentielt allergene.
- \* Langtidsimmunisering af mus med de hydrolyserede produkter gav hurtigt dannelse af antistoffer mod Nan HA langsomt imod Profylac, og tilsyneladende ikke imod Nutramigen.

Formålet var at karakterisere og om muligt identificere immunogene komponenter i de tre hypoallergene modernælkserstatninger, der indgik i den kliniske undersøgelse.

Den dyremodel, der var afprøvet på de tre produkter i det første projekt skulle valideres, dels ved gentagelse, dels ved inkludering af andre produkter, samt forskellige fraktioner af Profylac og Nutramigen.

Desuden var det målet på basis af kaninsera at udarbejde en metode til karakterisering af bindingen af IgE fra serum fra de børn i den kliniske del af undersøgelsen, der måtte have udviklet komælksallergi.

## **Resultater**

Karakterisering af proteiner og proteinfragmenter med MW over ca. 2.000, dvs. potentielt allergene komponenter

Nan HA indeholder, som vist i det tidligere projektet, så mange fragmenter med høje molekylvægte, at alle mælkeproteiner må formodes at være repræsenteret i denne fraktion. Der blev derfor ikke gjort forsøg på at identificere nogen af fragmenterne.

Nutramigen giver ved SDS-PAGE et dobbeltbånd svarende til MW 19 og 22 kDa. Det er akkurat detekterbart ved elektroforese af Nutramigen og meget tydeligt ved elektroforese af præcipitat af Nutramigen. Efter elektroblotning til PVDF-membraner blev båndene identificeret ved

proteinsekventering: Det er  $\alpha$ -zeiner, som stammer fra majs. De er opløselige i 70% ethanol, men har en meget ringe opløselighed i vand. Det forklarer den større koncentration i præcipitatet. Man må formode, at zeinerne er tilført som en forurening af den majsstivelse, der er i produktet Nutramigen. Proteiner af den størrelse må antages at være immunogene, og zein er derfor medtaget i alle undersøgelser af udvikling af antistoffer i dette projekt.

Profylac giver ved SDS-PAGE to bånd med tilsyneladende MW 12 og 6 kDa. De kan kun ses efter farvning med Coomassie, ikke med den sædvanligvis mere følsomme sølvfarvning. Det har ikke været muligt at overføre båndene til PVDF-membraner ved elektroblotning. Ved gelfiltrering på flere forskellige gelfiltreringsmedier kan man ligeledes detektere materiale med tilsyneladende MW 12 kDa og derunder. Proteinsekventering og massespektrometri viste imidlertid, at fraktionerne indeholder ikke et, men flere peptider, og ingen af dem er større end 3.500 Da. Gennem forskellige kromatografiske oprensninger (gelfiltrering efter reduktion og efter fraspaltning af N-bundet kulhydrat, reversed phase HPLC og ionbytning) blev peptiderne separeret og hovedparten af peptidmaterialet i 6-12 kDa området identificeret. Det er peptider fra 6-17 aminosyrerester. Rest 40-49, 44-49 og 74-90 fra  $\alpha$ -lactalbumin og rest 71-80 og 81-93 fra PP3. De er alle glycosyleret. Blandt de ikke-identificerede peptider kunne det desuden ved MS vises, at et var phosphoryleret. De posttranslationelle modifikationer forklarer peptidernes alt for store tilsyneladende molekylvægt, selektive farvning og manglende binding til PVDF. Det er ikke ud fra litteraturen klart hvorvidt glycopeptider af den størrelse kan være immunogene. Det kan ikke udelukkes.

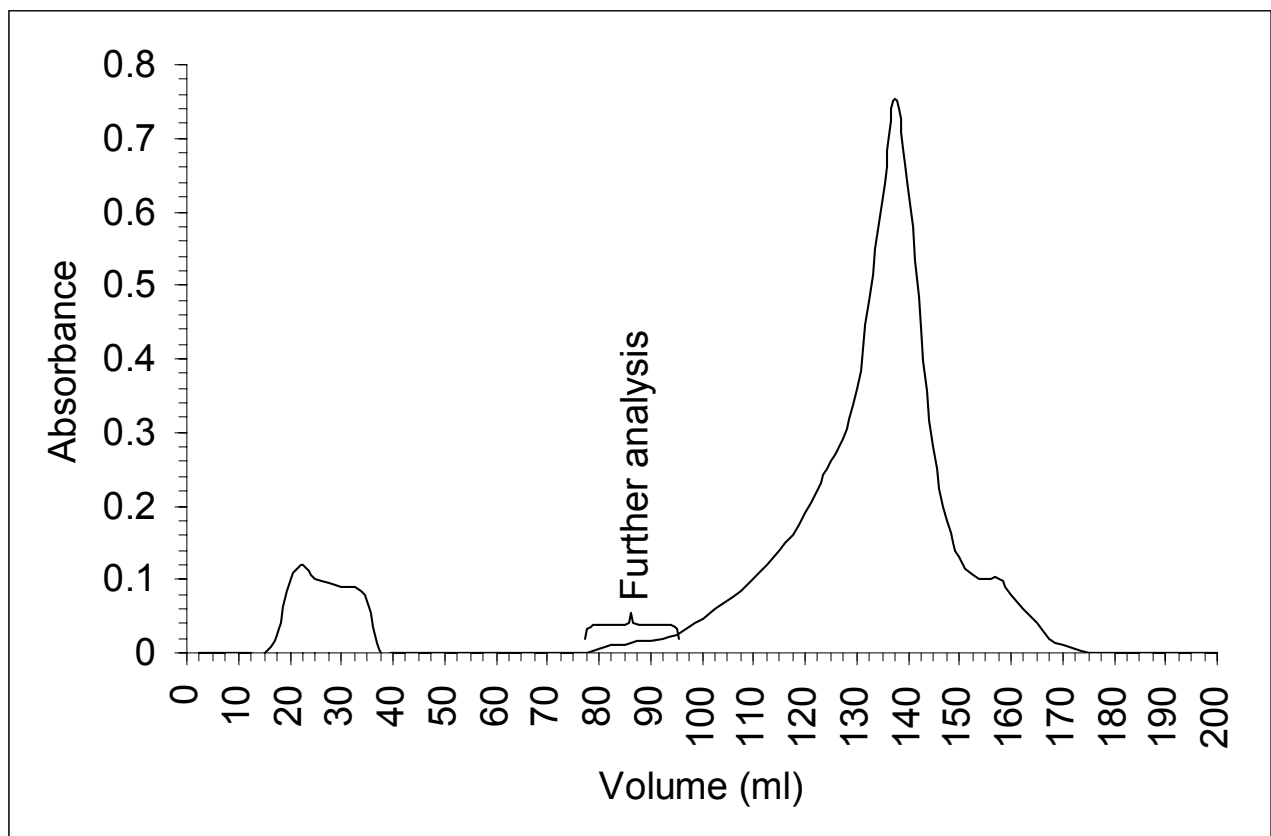


Fig 1 Gelfiltrering af centrifugeret Profylac på Sephadex G-75. Absorption ved 280 nm. Fraktionerne i det område, der er markeret med klamme er undersøgt ved SDS-PAGE (Fig 2).

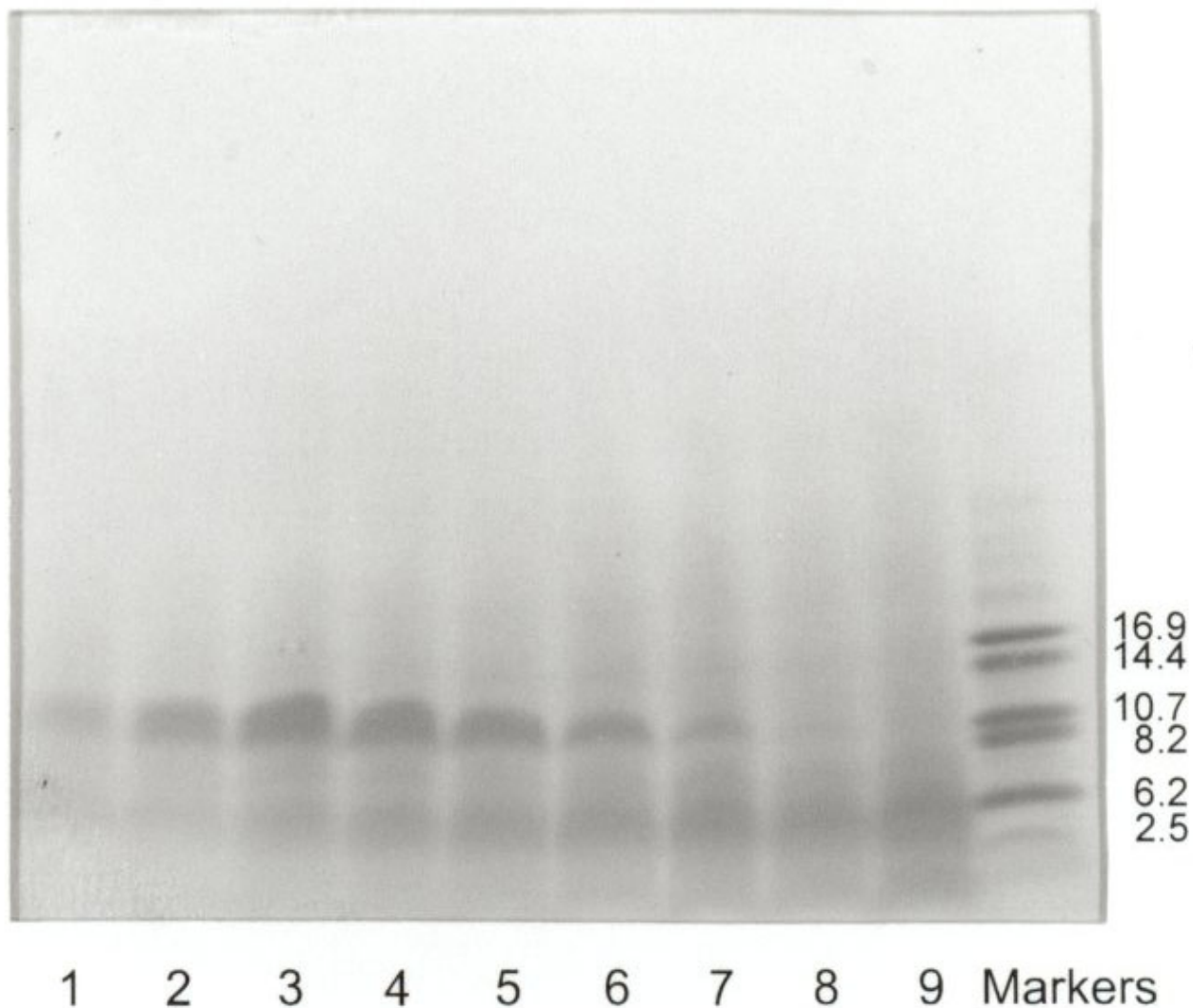


Fig.2 SDS-PAGE af de fraktioner fra gelfiltrering, der er markeret i Fig 1.  
Tricin-geler10-20%, Coomassie-farvet.

Peptider fra gelfiltreringsfraktioner svarende til MW under 6 kDa blev separeret ved ionbytning og en del af dem identificeret ved proteinsekventering. Det er peptider på op til 9 aminosyrerester fra  $\beta$ -lactoglobulin. Ingen af dem er glycosylerede, og er så små, at de ikke kan forventes at være immunogene.

#### Undersøgelser af hydrolyserede mælkeprodukters immunogenicitet i en dyremodel.

Den tidligere foreslåede dyremodel til vurdering af immunogenicitet er baseret på langtidsimmunisering af ikke-indavlede mus, 6 i hver gruppe. I dette projekt blev modellen testet på 1 alm. modermælkserstatning, to partielt hydrolyserede og fem intensivt hydrolyserede modermælkserstatninger (produkterne er angivet i Fig. 3). Desuden blev der immuniseret med det hydrolysat, som bruges i Profylac, samt præcipitater efter centrifugering af Nutramigen og Profylac. Udviklingen i titer blev testet for de mest relevante proteiner for hvert produkt. I Fig. 3 ses udviklingen i titer, målt med ELISA imod  $\beta$ -lactoglobulin efter immunisering med de forskellige produkter.

Efter 3. grads polynomisk regressionsanalyse af kurverne for udvikling af titer mod forskellige mælkeproteiner blev kurverne sammenlignet ved Newman-Keuls test. Det giver basis for inddeling i fire grupper som vist i Tabel 2.

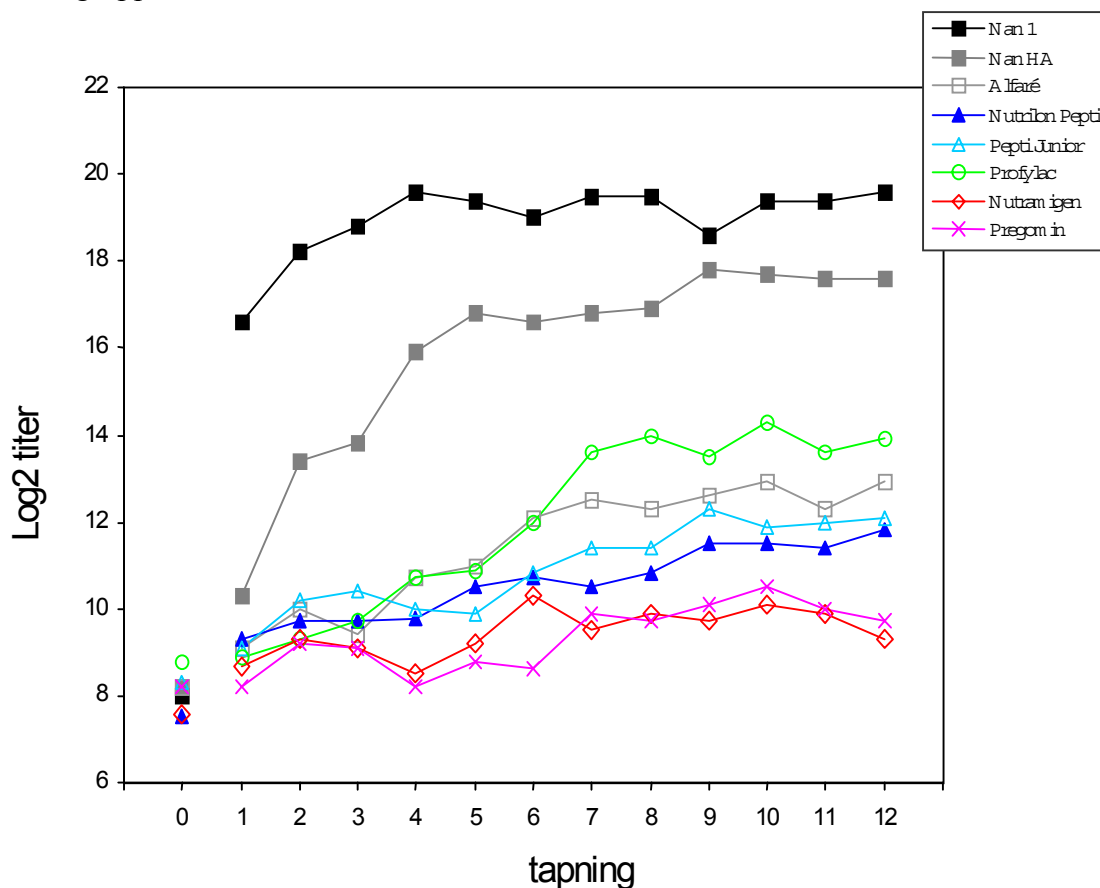


Fig. 3 Udviklingen af antistoffer mod  $\beta$ -lactoglobulin i løbet af 13 måneders immunisering.

Grupperingen i Tabel 2 er i overensstemmelse med de fysisk-kemiske analyser, og resultaterne er i overensstemmelse med det tidligere immuniseringsforsøg. For de antigener, hvor den tidsmæssige udvikling i titer er bestemt, er maximum-niveauet nået efter 8 mdr's immunisering.

Der var ikke signifikant forskel på immunogeniciteten af Profylac og det hydrolysat, der er anvendt i Profylac, dvs. at den påviste immunogenicitet ikke er et resultat af processering i forbindelse med den videre produktion af Profylac, f.eks. aggregering eller modifikation af peptiderne. Der var ikke signifikant forskel på Nutramigen og præcipitat af Nutramigen. Derimod var responset mod  $\beta$ -lactoglobulin signifikant lavere efter immunisering med præcipitat af Profylac end med Profylac (efter immunisering med samme proteinmængde).

Tabel 2

- 
- 1) Nan (uhydrolyseret)
  - 2) Nan HA (pHf)
  - 3) Profylac, Alfaré, Pepti Junior (alle eHf) og Nutrilon Pepti (pHf)
  - 4) Nutramigen (eHf), Pregomin (eHf, soja + collagen)
- 

Grupper med signifikant forskellig udvikling af titer overfor mælkeproteiner. Faldende fra 1) til 4).



Når der ses bort fra det sojabaserede Pregomin er grupperingen også i overensstemmelse med kliniske data fra RAST-analyser, prik-test og proliferation af celler fra navlestrengsblod. Provokationstest og rapporter om allergiske reaktioner mod produkterne bekræfter at NanHA er mere allergent end de øvrige hydrolyserede produkter, men oplysning om reaktion mod disse produkter er så sparsomme, at der ikke kan foretages nogen gruppering. Det er dog en generel erfaring, at Nutramigen uhyre sjældent giver anledning til allergiske reaktioner. Der er endnu ikke i litteraturen tilstrækkeligt materiale til at sammenholde den forebyggende effekt af forskellige produkter med den fundne gruppering mht. immunogenicitet. I den kliniske del af dette projekt forekomsten af allergiske symptomer generelt lavere end forventet, men der var signifikant flere tilfælde af mælkeallergi blandt de børn, der havde fået Nan HA end blandt dem, der havde fået Profylac og Nutramigen. Materialet tillod ikke skelnen mellem Profylac og Nutramigen. Forskellen i titer før immunisering og ved sluttapningen efter 13 mdrs immunisering blev undersøgt for en række forskellige proteiner. Resultaterne er vist i Fig. 4. (SD for intern standard er 1,4)

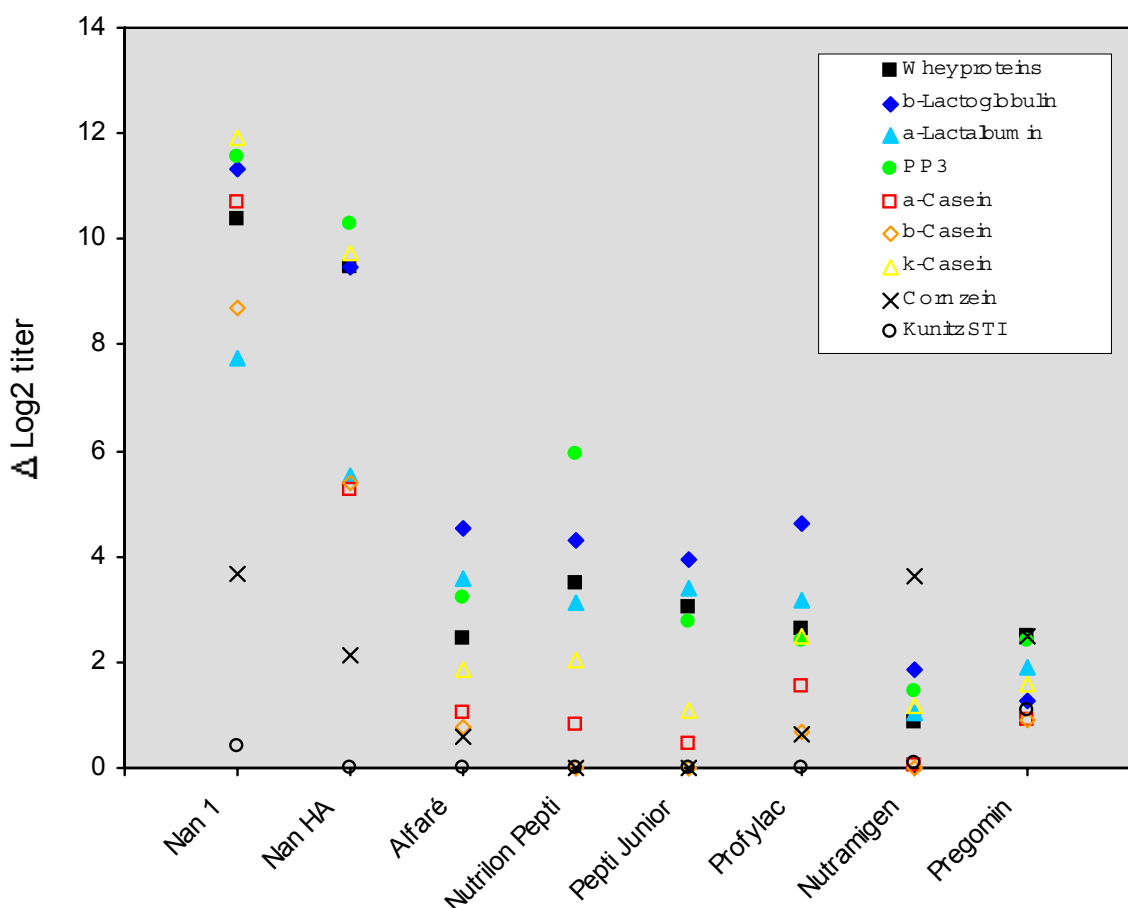


Fig. 4 Titerforøgelse fra før immunisering til sluttap.

Immunogeniciteten af de forskellige produkter er i god overensstemmelse med det, der må forventes ud fra kendskab til udgangsmaterialerne. Som antaget dannes der antistoffer mod zein ved immunisering med Nutramigen. Ved immunisering med Profylac dannes antistoffer mod både valleproteiner og kaseiner, især κ-kasein. Profylac er baseret på valle produceret af mælk ved reaktion med osteløbe, dvs. det indeholder κ-kaseinets glycomakropeptid.

Profylac har givet antistoffer imod alle de valleproteiner, der er testet for, også  $\beta$ -lactoglobulin, selv om de fysisk- kemiske undersøgelser ikke førte til påvisning af peptider der kan antages at være immunogene.

#### Immunisering af kaniner og etablering af metode til analyse af humane sera.

Formålet med at immunisere kaniner var at få en større mængde serum en den, der fås fra mus. Desuden vil man, skønt grupperne er små, have mulighed for at sammenligne responset fra mus med responset fra kaniner. Der blev gennemført immuniseringer med Nan, Nan HA, Profylac og Nutramigen over 13 måneder. To kaniner blev immuniseret for hvert produkt.

Måling af antistofbinding til komponenter i et hydrolysat kompliceres af, at fragmenterne er så små, at de ikke kan forventes at indeholde 2 epitoper og derfor ikke kan bruges i sandwich ELISA. Biotinylering af produkterne med henblik på kompetitiv ELISA viste sig uegnet både til kaninsera og humane sera. Ved coating af ELISA-plader med hydrolyserede produkter er der risiko for at en del små, hydrofile peptider ikke bindes, men metoden er i litteraturen beskrevet til karakterisering af immunsera imod hypoallergene modermælkserstatninger. Analyser af kaninsera er i dette projekt er baseret på coating af et produkt og detektion af binding af antistof, enten direkte eller efter reaktion mellem antiserum og en fortyndingsrække af en kompetitor. Efter forsøg med en pool af sera fra komælksallergikere vil den opsætning også blive brugt til analyse af de humane sera. Der er ved alle assays medtaget negative kontroller, både af antisera og antigener.

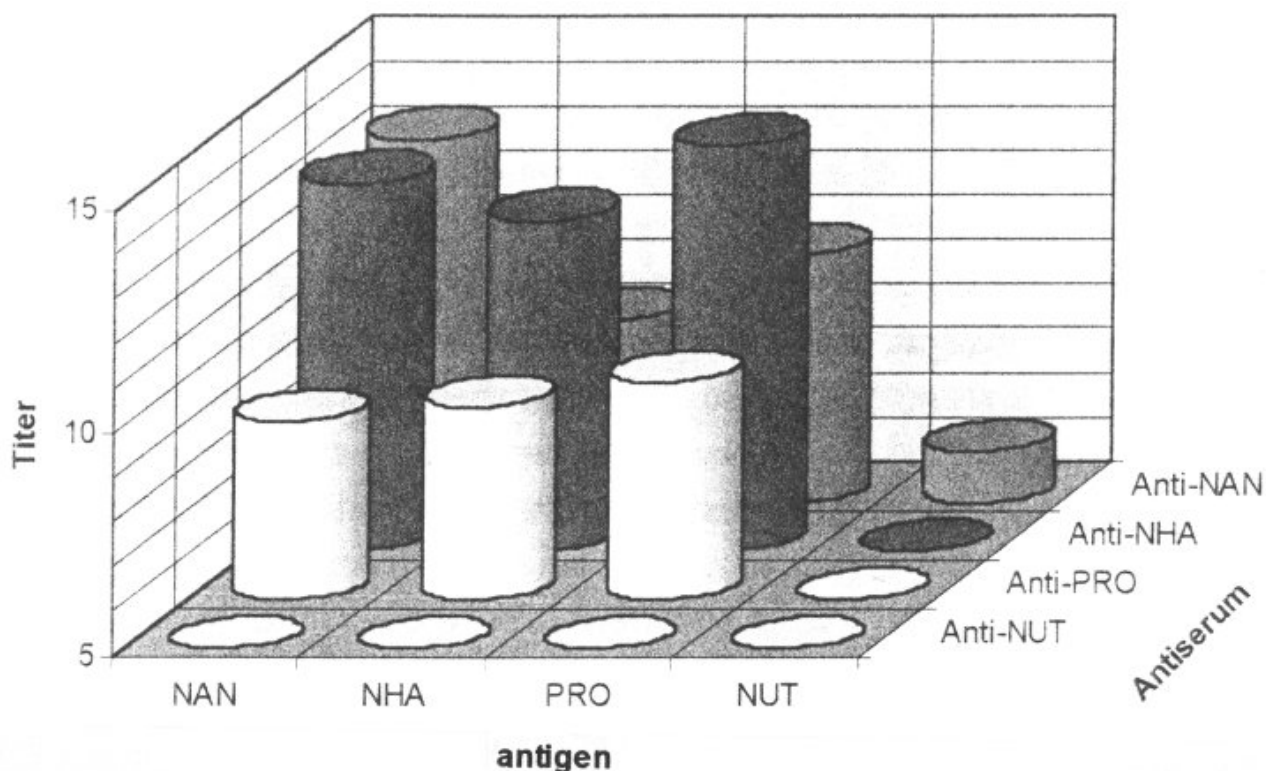


Fig. 5 Titer (log 2) imod forskellige produkter efter 13 måneders immunisering. Gennemsnittet af værdier for to kaniner.

Fig. 5 viser for hvert antiserum bindingen til hvert af de fire produkter (Log 2 titer minus titer før immunisering, SD 1,3). De to kaniner, som er immuniseret med Nan HA giver høje titre mod alle produkter undtagen Nutramigen. Reaktionen imod Profylac skal ses på baggrund af at proteinerne i

Nan HA og Profylac, men ikke Nan, er baseret på denaturerede proteiner. Sera fra de to kaniner, der er immuniseret med Profylac giver mindre, men absolut detekterbar binding imod både Nan, Nan HA og Profylac, ikke mod Nutramigen. Sera fra immunisering med Nutramigen giver kun binding til Nan, og kun svag binding. Bindingen kan tænkes at skyldes caseiner, mens zein, som også findes i Nan næppe vil coates til ELISA-bakken fra vandig opløsning.

Ligesom ved analyse af immunisering af mus blev antistoftiteren mod forskellige rene proteiner testet i ELISA. I hvert tilfælde er der en af de kaniner, der er immuniseret med Nan HA eller Profylac der, i lighed med mus har dannet antistoffer mod ethvert af de mælkeproteiner, der er brugt til coatning i assayet. Efter coatning i ethanol fremgår det, at udviklingen i titer imod zein og Nutramigen forløber parallelt ved immunisering med Nutramigen. Som følge af den større mængde serum kunne ELISA-resultaterne bekræftes ved immunblot efter SDS-PAGE.

---

*De massespektrometriske analyser er udført i samarbejde med ph.d., forskningslektor Esben Skipper Sørensen ved Laboratorium for proteinkemi, Aarhus Universitet. Esben Skipper Sørensen har desuden bidraget med oprenset PP3 og antistoffer imod PP3. Uden disse proteiner havde det ikke været muligt i dette projekt at påvise dannelse af antistoffer mod PP3.*

