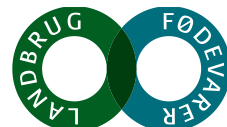


Allergene versus tolerogene egenskaber af komælksbaserede hydrolysater





Slutrapport for samarbejdsprojekter under Mejeribrugets Forskningsfond (MFF)

1. Projektets titel

Allergene versus tolerogene egenskaber af komælksbaserede hydrolysater
Allergenic versus tolerogenic capacities of cow's milk based hydrolysates

2. Projektleder

Katrine Lindholm Bøgh, Fødevareinstituttet, DTU, Kemitorvet, Bygning 202, 2800 Kgs. Lyngby, tlf. +45 35887092, e-mail: kalb@food.dtu.dk

3. Øvrige medarbejdere

Charlotte Bernhard Madsen, Fødevareinstituttet, DTU, charm@food.dtu.dk

Hans Bertelsen, Arla Foods Ingredients, hans.bertelsen@arlafoods.com

Heidi Frahm Christoffersen, Arla Foods Ingredients, heidi.frahm.christoffersen@arlafoods.com
(erstattede: Rune Rønhave Laursen, Arla Foods Ingredients, rune.roenhave.laursen@arlafoods.com)

Jacob Holm Nielsen, Arla Foods Ingredients, jacob.holm.nielsen@arlafoods.com

Lotte Neergaard Jacobsen, Arla Foods Ingredients, lotte.neergaard.jacobsen@arlafoods.com

Katrine Bækby Graversen, Fødevareinstituttet, DTU, katgr@food.dtu.dk (Erstattede: Louise Heydenreich Jensen, Fødevareinstituttet, DTU, louih@food.dtu.dk)

4. Finansieringskilder

Mælkeafgiftsfonden/Mejeribrugets Forskningsfond

Fødevareinstituttet, DTU

Arla Foods Ingredients

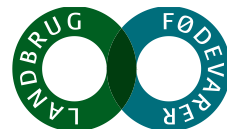
5. Projektperiode

Projektperiode med MFF finansiering: 01/2014 – 12/2015

Evt. revideret: 01/2014 – 12/2016

6. Projektresumé

Projektets hovedformål var at undersøge og karakterisere hvilke egenskaber ved mælkebase-rede produkter, der påvirker immunsystemet i retning af sensibilisering, og hvilke der påvirker udviklingen af tolerance. Dette blev gjort ved at etablere to dyremodeller til test af henholdsvis primær forebyggelse og desensibilisering (konvertering af allergi til tolerance), for derved at undersøge velkarakteriserede mælkeproteinprodukter med forskellige karakteristika i disse modeller for tolerance samt i vores veletablerede modeller for sensibilisering.



Projektet blev delt op i tre sub-projekter; 1) etablering af dyremodeller, 2) test af hydrolysater, og 3) test af intakte produkter.

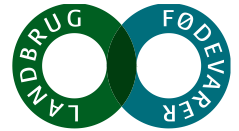
Etablering af dyremodeller: Vi lykkedes med at etablere to solide dyremodeller, som kan bruges til at teste komælksbaserede produkters evne til at forebygge komælksallergi samt til at teste komælksbaserede produkters evne til at konvertere komælksallergi til tolerance (desensibilisere). I disse modeller kunne vi efterligne data fra humane studier og vise, at både intakte mælkeprodukter samt komælksbaserede hydrolysater kan forebygge komælksallergi, men at den forebyggende evne afhænger af hydrolysegraden. Ydermere kunne vi vise, at intakte, men ikke hydrolyserede komælksbaserede produkter har evnen til at desensibilisere allerede allergiske individer og dermed har potentiale som et behandlende produkt.

Test af hydrolysater: Forskellige hydrolysater blev designet og testet for deres allergene versus tolerogene egenskaber ved dyreforsøg. Forsøgene viste generelt, at hydrolysater har en stærkt reduceret allergenicitet kombineret med en stærkt reduceret tolerogenicitet i sammenligning med intakte produkter. Forsøgene viste dog også at mængden af intakt protein, peptidstørrelsesfordelingen, samt aggregeringstendensen mere end blot hydrolysegraden er altafgørende for både de allergene samt tolerogene egenskaber af hydrolysaterne, og dermed deres potentiale som sikkert produkt til forebyggelse af komælksallergi. Det vil dermed sige at hydrolysegraden ikke er en tilstrækkelig parameter til at udtale sig om produkters egenskaber som proteiningrediens i hypoallergene modernælkserstatninger. Ligeledes viste forsøgene at det er vigtigt ikke kun at teste de allergene egenskaber men også de tolerogene egenskaber af hydrolysater, for sammenholdt at kunne udtale sig om produkternes sikkerhed og effektivitet som ingrediens i hypoallergene modernælkserstatning der kan forebygge udviklingen af komælksallergi hos børn disponeret til at udvikle denne sygdom.

Test af intakte produkter: Forskellige intakte mælkeprodukter blev designet og testet for deres allergene versus tolerogene egenskaber. Forsøgene viste generelt at intakte produkter besidder en høj allergenicitet kombineret med en høj tolerogenicitet. Derved viste produkterne sig at være yderst gode til at både forebygge komælksallergi men også yderst anvendelige til at konvertere allergi til tolerance og dermed besidder egenskaber til at behandle komælksallergi. Dog viste forsøgene også at man ved at modificere på produkterne, fx ved at varmebehandle, hvor proteinerne delvist denaturere og aggregere, kan modificere på produkternes allergene og tolerogene egenskaber. Forsøget viste at en varmebehandling havde gavnlige effekter ved at reducere produktets allergene egenskaber uden at reducere produktet tolerogene egenskaber. Et sådant produkt vil være en potentiel alternativ til hypoallergene modernælkserstatninger baseret på hydrolysater, idet de kombinerer høj effektivitet med en samtidig højere sikkerhed end ubehandlede intakte produkter.

Ved dette projekt kan man konkludere at dyremodeller for test af allergene og tolerogene egenskaber er et godt og solidt værktøj til at lave en overordnet vurdering af komælksproteinprodukters potentiale som ingrediens i modernælkserstatninger til enten forebyggelse, management eller behandling af komælksallergiske individer. Projektet viste med tydelighed vigtigheden af at lave grundige protein-kemiske karakteriseringer af produkter, da egenskaber ud over hydrolysegraden er afgørende for produkters allergene versus tolerogene egenskaber. Projektet belyste ydermere potentialet af modificerede intakte produkter som alternativer til hypoallergene modernælkserstatninger baseret på hydrolysater.

The main objective of the project was to investigate and characterise which properties of cow's milk based products that affect the immune system in the direction of sensitisation and which that affect in the direction of tolerance. This was done by establishing two animal models for the testing of primary prevention and desensitisation (conversion of allergy to tolerance), respectively, in order to investigate well-characterised cow's milk protein products with different characteristics in these tolerance models as well as in our well-established models for sensitisation. The project was divided into three sub-projects; 1) establishment of animal models, 2) testing of



hydrolysates, and 3) testing of intact products.

Establishment of animal models: We managed to establish two solid animal models that can be used to test the ability of cow's milk based products to prevent cow's milk allergy and convert cow's milk allergy to tolerance (desensitisation). In these models we were able to mimic data from human studies and show that both intact milk products and cow's milk based hydrolysates can prevent cow's milk allergy but that the preventive capacity depends on the degree of hydrolysis. Further we showed that intact but not hydrolysed cow's milk based products inhere the ability to desensitise allergic individuals and thus have potential as a therapeutic product.

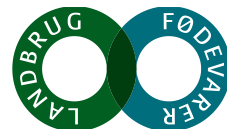
Test of hydrolysates: Various hydrolysates were designed and tested for their allergenic versus tolerogenic properties in animal models. The animal experiments generally showed that hydrolysates have a highly reduced allergenicity combined with a greatly reduced tolerogenicity in comparison with intact products. However, the experiments also showed that the amount of intact protein, peptide size distribution, and aggregation status rather than the degree of hydrolysis are crucial for both the allergenic and the tolerogenic properties of the hydrolysates, and hence their potential as a product for prevention of cow's milk allergy. This means that the degree of hydrolysis is not a sufficient parameter to assess the potential of a product as a protein ingredient in hypoallergenic infant formulas. Further, the experiments showed that it is important not only to test the allergenic properties but also the tolerogenic properties of hydrolysates, in order to be able to assess both the safety and efficacy. This will improve the evaluation of a product's potential as protein ingredients in hypoallergenic infant formulas that can prevent the development of cow's milk allergy in children predisposed to develop this disease.

Test of intact products: Different intact milk products were designed and tested for their allergenic versus tolerogenic properties. The animal experiments generally showed that intact products possess a high allergenicity combined with high tolerogenicity. Thus, the products proved to be extremely good for both preventing cow's milk allergy and for converting allergy to tolerance and thus possess capabilities for treating cow's milk allergy. However, the experiments also showed that by modifying the intact products, e.g. by heat-treatment by which proteins are partially denatured and aggregated, one can modify the allergenic as well as tolerogenic properties of the products. The experiment showed that a heat-treatment had beneficial effects by reducing the product's allergenic properties without reducing the product's tolerogenic properties. Such a product could be a potential alternative to hypoallergenic infant formulas based on hydrolysates as they provide high efficiency with a concomitant high safety.

This project concludes that animal models for testing allergenic and tolerogenic properties of cow's milk based products are good and solid tools to make an overall assessment of the potential of a cow's milk based product as ingredients in infant formulas for either prevention, management or treatment of cow's allergy individuals. The project clearly demonstrated the importance of thorough protein-chemical characterisation of products, as properties other than the degree of hydrolysis are crucial for the allergenic versus tolerogenic properties of cow's milk based products. Furthermore, the project highlighted the potential of modified intact products as alternatives to hypoallergenic infant formulas.

7. Projektets formål

Moderermælkestatninger til børn med mælkeallergi, eller børn med en øget risiko for udvikling af allergi, fremstilles på to måder: ved næsten fuldstændig nedbrydning (højt hydrolyserede) og delvis nedbrydning (partielt hydrolyserede) af mælkeproteinerne. Immunsystemet kan reagere på proteiner i mæden på to væsensforskellige måder; Enten ved at sensibilisere, dvs. gøre individet allergisk, eller ved at immunsystemet erkender proteinet som noget ufarligt og derfor udvikler tolerance. I de højt hydrolyserede mælkeerstatninger ønskes proteinerne nedbrudt så al potentiel allergicitet fjernes. Dermed fjerner man sandsynligvis også nogle af de gode egenskaber,

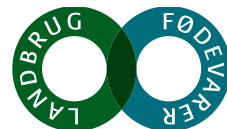


herunder evnen til at inducere tolerance. Formålet med partielt hydrolyserede mælkeerstatninger er at nedbryde proteinerne i en sådan grad, at de ikke kan forårsage allergi, mens deres evne til at inducere tolerance bevares. Kendskabet til hvilke egenskaber ved fødevarerproteiner og deres nedbrydningsprodukter, der bidrager til deres evne til at udvikle allergi eller tolerance er imidlertid meget begrænsede. For at kunne etablere vidensbaserede strategier for udvikling af nye og forbedrede modernælkserstatninger kræves derfor undersøgelser af, hvilke egenskaber ved mælkeproteinredienser der bidrager til deres allergene og hvilke der bidrager til deres tolerogene evner. Sådanne undersøgelser må baseres på studier i dyr. Derfor vil vi i dette projekt etablere dyremodeller til test for udvikling af tolerance som pendant til vores veletablerede dyremodel til test af sensibilisering. Efterfølgende vil vi undersøge, hvilke egenskaber ved modernælkserstatninger baseret på enten hydrolyserede eller intakte mælkeproteiner, som er afgørende for deres evne til at: (1) Inducere allergi, (2) Inducere tolerance hos ikke mælkeallergiske individer og (3) Ændre allergi til tolerance hos individer med mælkeallergi (desensibilisering). Projektet vil give viden, som kan danne basis for udvikling af nye forbedrede modernælkserstatninger baseret på komælk, som kan forhindre allergi samtidig med, at immunsystemet stimuleres til udvikling af tolerance. Yderligere vil projektet danne basis for udvikling af en ny og mere sikker strategi for oral immunoterapi, baseret på desensibilisering af komælksallergiske individer med hydrolyserede mælkeproteiner.

Hydrolysed infant formulas for children with cow's milk allergy or children with a high risk of cow's milk allergy are produced in two different ways: nearly all protein is broken down to very small fragments (extensively hydrolyses) or proteins are broken down to larger fragments (partial hydrolyses). The immune system may react to food proteins in two very different ways: *i)* The protein is seen as dangerous and the person is sensitised i.e. develops allergy, *ii)* The protein is seen as harmless and tolerance is developed. The extensively hydrolysed formulas are produced to prevent any allergenicity. This at the same time removes the beneficial ability of the hydrolysed formula to induce tolerance. The partial hydrolysed formulas are produced to prevent the development of allergy and promote the development of tolerance. There is at present only limited knowledge about which protein and peptide characteristics that promote allergy and which that promote tolerance. To develop a knowledge-based strategy for the development of new and improved infant formulas, based on either hydrolysed or intact proteins, insight into the characteristics of cow's milk products promoting allergy and the characteristics promoting tolerance is needed. We will develop animal models for tolerance inductions as counterparts to our models for sensitisation. We will use these models to study which characteristics of cow's milk products that are connected to the ability *i)* to sensitise, *ii)* induce tolerance in individuals that are not milk allergic, and *iii)* change sensitisation to tolerance. This project will generate knowledge that can be used to improve cow's milk based infant formulas to enable them not to induce allergy and at the same time promote the development of tolerance. The data may also be used to develop a safe strategy for oral immune therapy.

8. Projektets baggrund

Mælkeallergi er den hyppigst forekommende form for fødevarerallergi hos små børn. Mælkeallergi, er allergi mod proteinerne i kasein og/eller valle-fraktionen af komælk. Op mod 2% af danske børn udvikler mælkeallergi inden for deres første leveår. Den eneste nuværende behandling af mælkeallergi er en mælkefri diæt, hvor alle mælkeprodukter må udelukkes fra kosten. Oral immunoterapi er en forholdsvis ny tilgang til behandling af mælkeallergi. Formålet er at gøre patienten tolerant over for mælk. Ved at give gradvis øgede mængder mælk udvikles sekundær tolerance (desensibilisering). Oral immunoterapi er dog forbundet med en utilstrækkelig succesrate samt forbundet med en stor risiko for udvikling af svære allergiske reaktioner. Til mælkeallergiske spædbørn samt spædbørn med forøget risiko for at udvikle mælkeallergi, findes som alternativ særlige modernælkserstatninger baseret på hydrolyseret kasein og/eller valleprotein fra komælken. Disse hypoallergene modernælkserstatninger opdeles i højt og partielt hydroly-



seret mælkeerstatninger, baseret på hydrolyseringsgraden samt den molekulære vægt af peptiderne. Der findes ikke en klar definition på, hvornår en mælkeerstatning kategoriseres som et højt eller et partielt hydrolyseret produkt, men de højt hydrolyserede produkter indeholder generelt peptider hvor over 95% har en størrelse på under 3 kDa, mens de partielt hydrolyserede produkter indeholder peptider, hvor en højere procentdel ligger mellem 3 og 10 kDa og en meget mindre del under 3 kDa. Mens højt hydrolyseret modernælkserstatninger primært er tiltænkt børn med en allerede diagnosticeret mælkeallergi (sekundær forebyggelse), er partielt hydrolyseret modernælkserstatninger primært tiltænkt børn med øget risiko for udvikling af mælkeallergi, men som ikke er allergiske (primær forebyggelse). Ideen med de højt hydrolyserede mælkeerstatninger er derfor at nedbryde mælkeproteinerne i en sådan grad, at alt potentiel allergenicitet fjernes. Herved fjerner man med stor sandsynlighed også de toleranceinducerede egenskaber. Tanken bag de partielt hydrolyseret mælkeerstatninger er derimod at nedbryde proteiner i en sådan grad, at en inducering af mælkeallergi udebliver, mens man fastholder den toleranceinducerede egenskab. Disse tiltænkte egenskaber ved henholdsvis højt og partielt hydrolyserede mælkeprodukter er dog langt fra bevist, og studier har dog også vist at f.eks. højt hydrolyseret modernælkserstatning langt fra er uden allergen potentiale, og at partielt hydrolyseret modernælkserstatninger ikke nødvendigvis har større toleranceinducerende evne end højt hydrolyserede modernælkserstatninger.

Kendskabet til hvilke egenskaber ved fødevarerproteiner og deres nedbrydningsprodukter, der bidrager til deres allergene og hvilke der bidrager til deres tolerogene egenskaber er meget begrænsede. Vi har i et tidligere projekt vist, at peptiders (nedbrydningsprodukter fra fødevarerallergener) evne til at inducere allergi og omvendt til at inducere tolerance, ikke kun afhænger af størrelser af peptiderne, med tillige af andre faktorer, som peptidsammensætning, indhold af rest-protein og tendensen af peptiderne til at klistre sammen (aggregerer), og at disse faktorer er forskellige fra protein til protein (Bøgh *et al.* Clin Exp Allergy, 2009, 39, 1611-1621; Bøgh *et al.* J Agric Food Chem, 2012, 60, 2934-2942; Bøgh *et al.*, Mol Immunol, 2012, 51, 337-346; Bøgh *et al.* Int Arch Allergy Immunol, 2013, 161, 21-36). For at kunne etablere vidensbaserede strategier for etablering af nye og forbedrede modernælkserstatninger kræves en større viden om, hvilke egenskaber ved hydrolysater, der bidrager til deres allergene egenskaber, og hvilke der bidrager til deres tolerogene evner, to mekanismer der er uløseligt forbundet og induceres af vores immunsystem.

Dette projekt vil derfor fokusere på at undersøge, hvilke egenskaber ved modernælkserstatninger baseret på hydrolyserede mælkeproteiner, som er afgørende for deres evne til at:

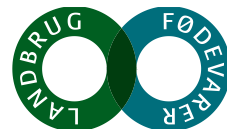
- 1) Inducere allergi (sensibilisering)
- 2) Inducere tolerance hos ikke mælkeallergiske individer (primær tolerance)
- 3) Inducere tolerance (desensibilisere) hos individer med påvist mælkeallergi (sekundær tolerance)

Dette vil blive udført i Brown Norway rottemodeller. Brown Norway rotten er en særlig god dyremodel til allergirelaterede studier, da denne rottestamme reagerer med et særligt højt antistof niveau (specielt IgE), hvorved disse rotter ligner mennesker disponeret for at udvikle allergi. Vi har i disse rotter allerede påvist deres evne til både at kunne blive sensibiliserede, samt udvikle tolerance mod fødevarerallergener og deres nedbrydningsprodukter. Vi har i Brown Norway rotten allerede etableret reproducerbare modeller for test af sensibiliserende evne af hydrolysater (ved både oral og i.p. immuniseringsmetoder uden brug af adjuvans). Fundamentet for etablering af modeller i Brown Norway rotten til test af både primær forebyggelse og desensibilisering er foretaget, men skal dog optimeres i forhold til test af hydrolysater fra mælk.

Dette projekt vil derfor etablere og optimere to modeller i Brown Norway rotten for test af:

- 1) Primær tolerance
- 2) Desensibilisering

Dette vil tillade os at undersøge hvorledes:



- 1) Peptidstørrelsesfordelingen/profilen (størrelsen af tilstedeværende peptider / DH)
- 2) Peptidsammensætningen (kløvningssteder i intakte protein / enzymspecificiteten)
- 3) Aggregeringstendensen (tendensen af peptiderne til at klumpe sammen)
- 4) Indholdet af rest-protein (indholdet af intakt protein)
- 5) Udgangsmateriale (proteinprofil)

vil påvirke immunsystemet og dets evne til at inducere tolerance versus sensibilisering.

9. Projektets delaktiviteter i hele projektperioden

A: Produktion af hydrolysater samt intakte mælkeproteiner til optimering af dyremodeller

B: Protein-kemisk karakterisering af produkter til optimering af dyremodeller

C: Optimering og etablering af dyremodel for test af primær tolerance

D: Optimering og etablering af dyremodel for test af desensibilisering

E: Design og produktion af yderligere 6 hydrolysater

F: Protein-kemiske analyser af de 6 hydrolysater

G: Test af den allergene kapacitet af de i alt 8 forskellige hydrolysater

H: Test af den primære tolerance inducerende evne af de i alt 8 hydrolysater

I: Udvælgelse af 4 intakte produkter til undersøgelse af desensibiliserende evne

J: Protein-kemisk karakterisering af de i alt 4 intakte produkter

K: Test af den allergene kapacitet af de i alt 4 intakte produkter

L: Test af den primære forebyggende evne af de i alt 4 intakte produkter

M: Test af den desensibiliserende evne af de i alt 4 intakte produkter

N: Test af tarmoptag af to af de 4 intakte produkter (Denne delaktivitet er også en del af MFF projektet "Mikrobiota og komælkstolerance")

O: Artikelskrivning og formidling

	2014				2015				2016			
	Q1	Q2	Q3	Q4	Q1	Q2	Q3	Q4	Q1	Q2	Q3	Q4
A	X											
B	X	X										
C	X	X	X									
D		X	X	X	X	X						
E				X	X							
F					X	X						
G					X	X						
H					X	X	X					
I							X					
J							X	X				
K								X	X	X		
L								X	X	X		

M							X	X	X	X		
N										X	X	
O				X	X	X	X	X	X	X	X	X

10. Projektets resultater

A: Produktion af hydrolysater samt intakte mælkeproteiner til optimering af dyremodeller

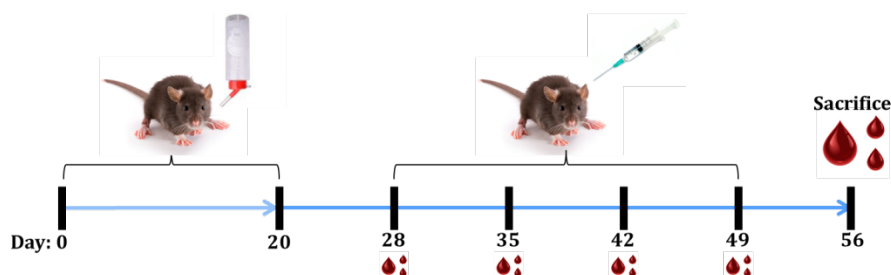
Tre proteinprodukter, 1) det højt-hydrolyserede produkt PEPTIGEN IF-3080 (eHF), 2) en ny prototype af et partielt-hydrolyserede produkt som senere kom til at hedde PEPTIGEN IF-3087 (pHF), samt 3) intakt oprenset β -lactoglobulin (BLG) blev produceret af Arla Foods Ingredients og leveret til Fødevareinstituttet til brug ved optimering og etablering af to dyremodeller for tolerance.

B: Protein-kemisk karakterisering af produkter til optimering af dyremodeller

De tre produkter blev analyseret for: 1) proteinkoncentration, 2) hydrolysagrad, 3) peptidstørresfordeling, og 4) restproteinindhold af Arla Foods Ingredients, mens de blev analyseret for endotoksinindhold af Fødevareinstituttet.

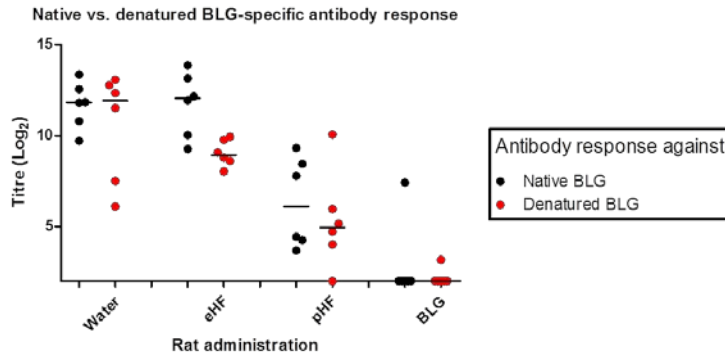
C: Optimering og etablering af dyremodel for test af primær tolerance

Dyremodellen for test af den primære tolerance-inducerende evne af komælksbaserede protein- ingredienser til modermælkserstatninger blev opdelt i to faser: 1) Oral administrering: *Ad libitum* administration af mælkeproduktet i drikkevandet (12,5 g protein/L) og 2) Post-immunisering: i.p. dosering med intakt BLG. Modellen blev optimeret for: 1) Alder ved start, 2) Varighed af *ad libitum* produkt-administrering, 3) Mængde BLG pr. post-immuniseringsgang, 4) Antal post-immuniseringer, 5) Post-immuniseringsintervallet, 6) Brug af adjuvans, samt 7) Tidspunkt for blodprøver, og endte med at se ud som i nedenstående (Fig. 1):



Figur 1. Dyremodel for test af forebyggende effekt af komælksprodukter.

Resultater fra etableringsforsøget viste lig resultater fra humane studier, at konventionelle modermælkserstatninger havde en større tolerance-inducerende evne end pHF, som igen havde en bedre toleranceinducerende evne end eHF (Fig. 2):

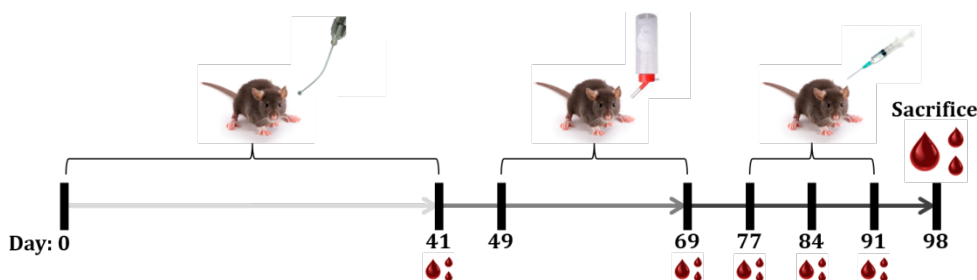


Figur 2. Det specifikke IgG1 respons hos dyr der har været på *ad libitum* administrering i tre uger med enten vand (water), højt-hydrolyseret (eHF), partielt-hydrolyseret (pHF), eller intakt produkt (BLG), og efterfølgende post-immuniseret fire gange med intakt BLG. Den forebyggende effekt af *ad libitum* administreringen blev testet over for både den konformationelle (sort) og den denaturerede form af BLG (rød). Det specifikke IgE respons lignede det specifikke IgG1 respons.

Ved ikke kun at måle den primære forebyggende evne over for den konformationelle version af BLG, men også den denaturerede version af BLG, kunne vi for første gang give en forklaring på de tidligere observerede forskelle mellem humane studier og dyrestudier, hvor vi for første gang har kunnet påvise en vis tolerance-inducerende evne af selv eHF. Dette grundet en analyse for den tolerance-inducerende evne over for den lineære (denaturerede) version af BLG (Fig. 2). Dette vidner om, at det i særdeleshed er meget vigtigt at designe ikke kun sine dyremodeller ordentligt, men ligeså de assays man bruger til at vurdere resultatet af sin dyremodel.

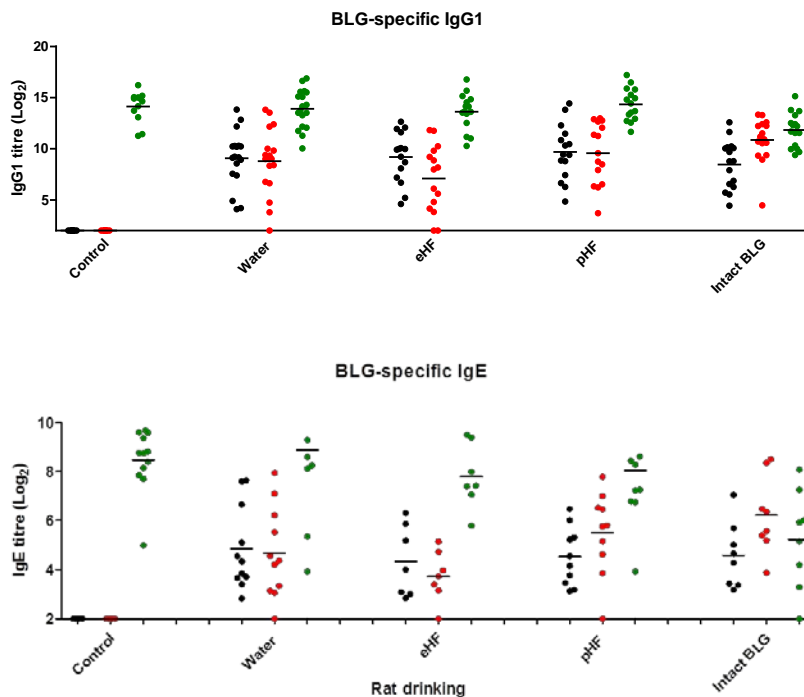
D: Optimering og etablering af dyremodel for test af desensibilisering

Dyremodeller for desensibilisering blev foruden de i ovenstående dyremodel nævnte parametre optimeret for: 1) Alder ved start, 2) Varighed af sondefodring, 3) Mængde af BLG pr. dag, 4) Brug af adjuvans, samt 5) Køn, og endte med at se ud som i nedenstående (Fig. 3):



Figur 3. Dyremodel for test af desensibiliserende effekt af komælksprodukter.

Resultatet fra etableringsforsøget viste, at mens både eHF og pHF har primær forebyggende evne, så har disse ikke desensibiliserende evne. Baseret på disse studier ser det ud til, at både det eHF og det pHF har mistet så meget af deres tolerogene egenskaber, at disse produkter ikke kan omvende allergi til tolerance og dermed virke desensibiliserende (Fig. 4). Det intakte produkt havde derimod gode desensibiliserende egenskaber og dermed potentiale til at bruges i immunoterapi.



Figur 4. Det specifikke IgG1 og IgE respons hos komælksallergiske dyr der har været på *ad libitum* administrering i tre uger med enten vand (water), højt-hydrolyseret (eHF), partielt-hydrolyseret (pHF), eller intakt produkt (BLG), og efterfølgende post-immuniseret tre gange med intakt BLG. Det specifikke respons blev målt efter sensibilisering (sort), efter *ad libitum* administrering (rød) og efter post-immuniseringer (grøn) ved test af det BLG-specifikke respons. Det ses tydeligt fra det specifikke IgE respons, at kun administrering af det intakte produkt kan hæmme udvikling af yderligere IgE antistoffer efter post-immuniseringer.

E: Design og produktion af yderligere 6 hydrolysater

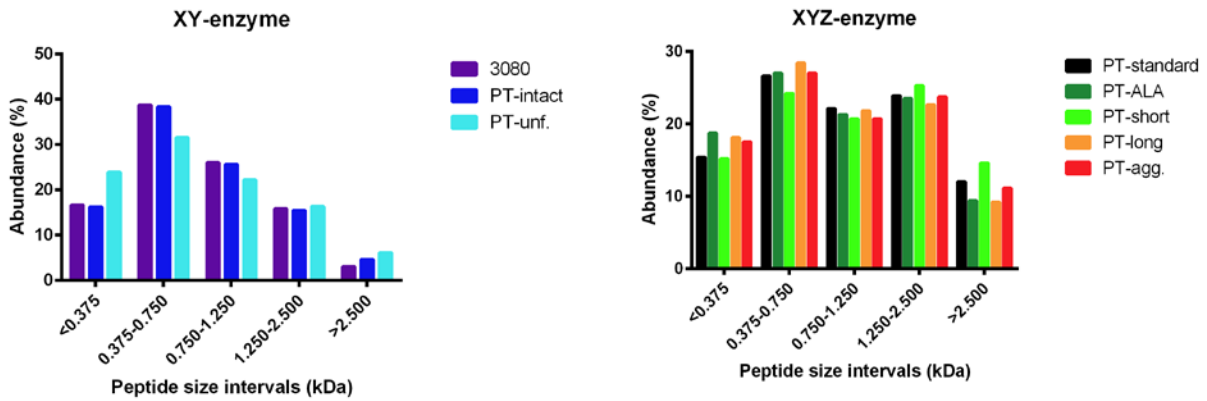
Yderligere seks produkter blev designet og fremstillet, således at vi endte op med følgende 8 hydrolysater, der adskilte sig fra hinanden ved: udgangsmateriale, peptidstørrelsesfordeling, aggregatstatus, filtrering, samt indhold af restprotein: 1) 3080, 2) PT-stnd, 3) PT-int., 4) PT-unf., 5) PT-ALA, 6) PT-short, 7) PT-long, og 8) PT-agg.

F: Protein-kemiske analyser af de 6 hydrolysater

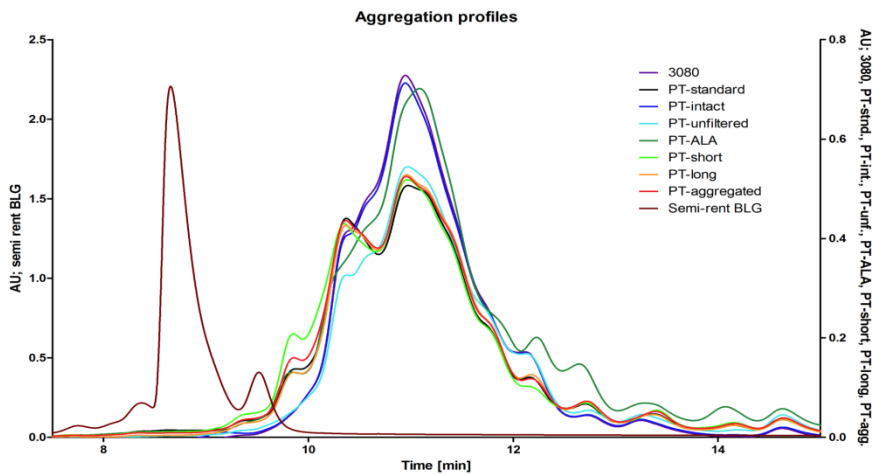
De i alt otte produkter blev analyseret for: 1) proteinkoncentration, 2) hydrolysegrad, 3) peptidstørrelsesfordeling, 4) aggregeringstensen, og 5) restproteinindhold af Arla Foods Ingredients, mens de blev analyseret for endotoksinindhold af Fødevareinstituttet (Tabel 1, Fig. 5-6).

Tabel 1. Oversigt over de protein-kemiske egenskaber for de i alt 8 hydrolysater samt intakt BLG.

	Protein koncentration (%)	Hydrolyse- grad (%)	Intakt rest- protein (%)	Immuno- reaktivitet ($\mu\text{g/g}$)	Endotoksin indhold (EU/mg)
3080	81.6	27.0	0	6	0.03
PT-standard	78.84	18.3	0	4290	12.46
PT-intact	81.71	26.6	1.6	8699	5.55
PT-unf.	78.83	20.2	0	2470	3.7
PT-ALA	83.2	17.7	0	700	6.33
PT-short	77.94	16.7	0	4338	7.79
PT-long	77.38	18.5	0	2501	10.98
PT-agg.	77.65	18.1	0	2211	6.02
Intact BLG	88.21	0	100	226427	0.08



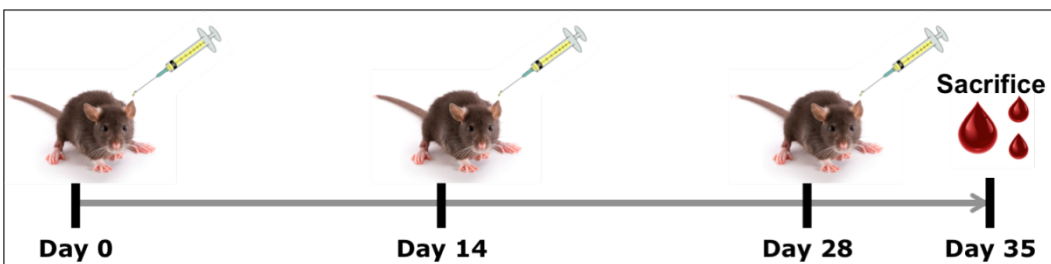
Figur 5. Peptidstørrelsesfordelingen for de 8 hydrolysater opdelt efter enzym-kombinationen brugt ved hydrolyse.



Figur 6. Størrelsesfordelingen af peptider i aggregerede tilstande ved gel filtreringskromatografi.

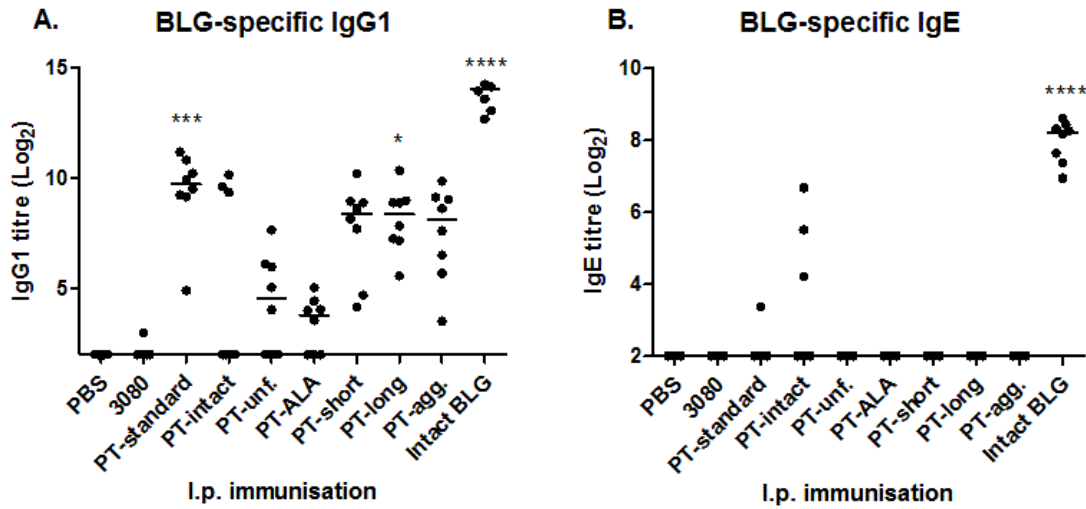
G: Test af den allergene kapacitet af de i alt 8 forskellige hydrolysater

Den sensibiliserende evne, immunogeniciteten, den antistof-bindende evne, samt den eliciterende evne af de i alt otte forskellige hydrolysater blev testet ved dyreforsøg hvor Brown Norway rotterne blev immuniseret i.p. med de respektive hydrolysater eller intakt BLG 3 gange, som vist i nedenstående (Fig 7):



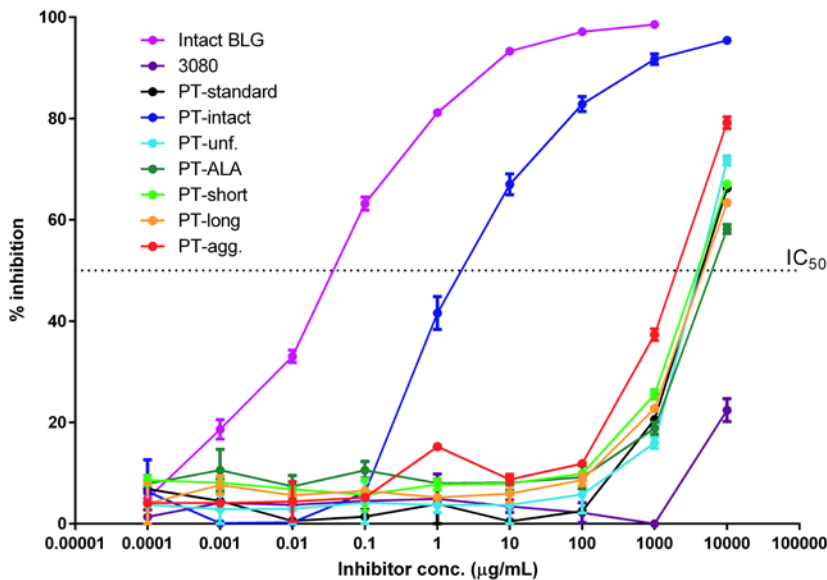
Figur 7. Dyremodellen for test af sensibiliserende evne af de i alt 8 hydrolysater.

Resultaterne viste, at specielt peptidstørrelsesfordelingen har indflydelse på immunogeneiciteten af hydrolysaterne. Derudover blev det set, at produkterne indeholdende intakt protein er de eneste med sensibiliserende evne (Fig 8).

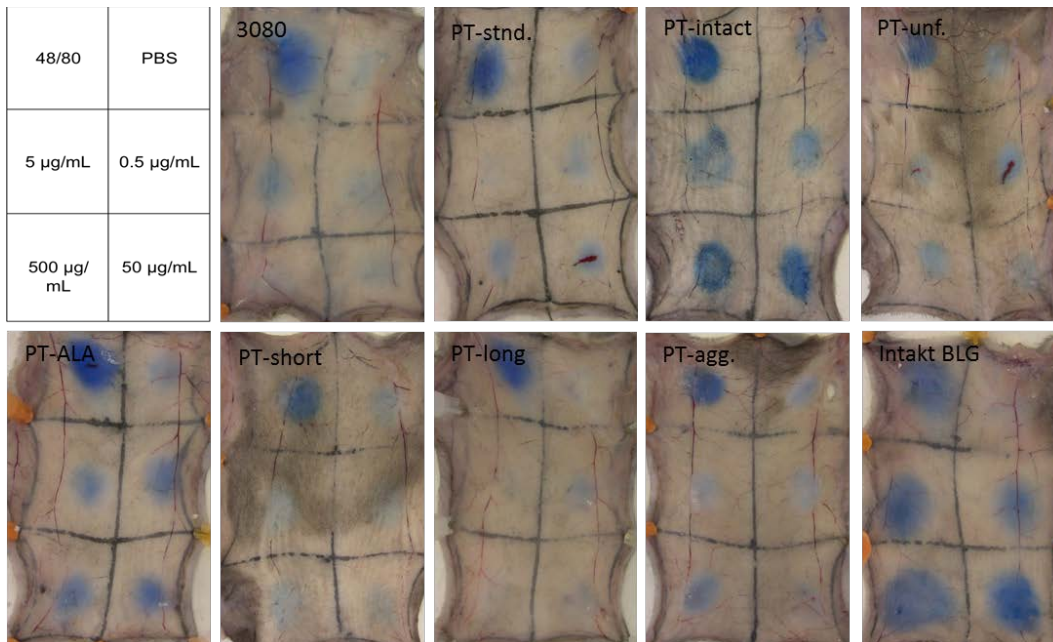


Figur 8. Det specifikke IgG1 og IgE respons i dyr immuniseret med et af de i alt 8 forskellige hydrolysater. Som det kan ses fra IgG1 responsen, indeholder alle hydrolysater på nær 3080 evnen til at rejse et immunrespons, dvs. de indeholder immunogenicitet. Dog kan det ses fra det specifikke IgE respons at kun de produkter der indeholder intakt protein kan sensibilisere, men de resterende produkter ingen sensibiliserende evne har.

Resultaterne viste, at hydrolysater, der indeholder intakt protein eller har tendens til at aggregere har en højere antistof-bindende evne end produkter uden, dog er den antistof-bindende evne højest i hydrolysatet med intakt protein. Dette blev testet ved inhibitory ELISAer (Fig 9).



Figur 9. Inhibitory ELISA for test af de i alt 8 hydrolysaters evne til at binde antistoffer rejst mod intakt BLG.

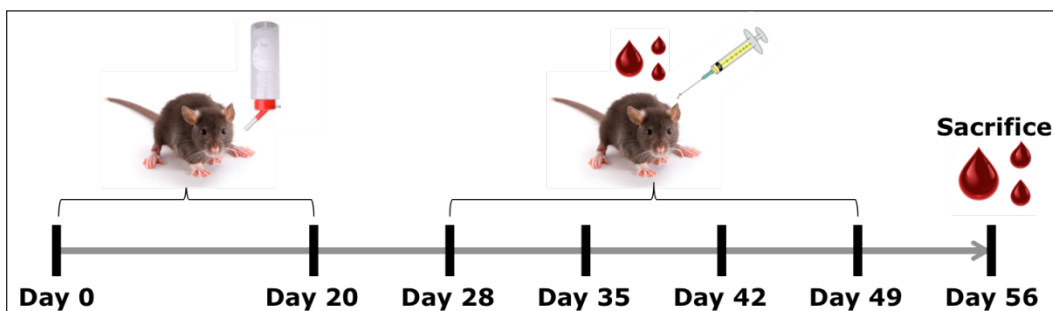


Figur 10. Hud-test (prik-test) for test af funktionaliteten af IgE antistoffer rejst i dyren immuniseret med et af de i alt 8 hydrolysater. Den blå farveudvikling er et resultat af en allergisk reaktion. 48/80 er positiv kontrol, men PBS er engativ kontrol.

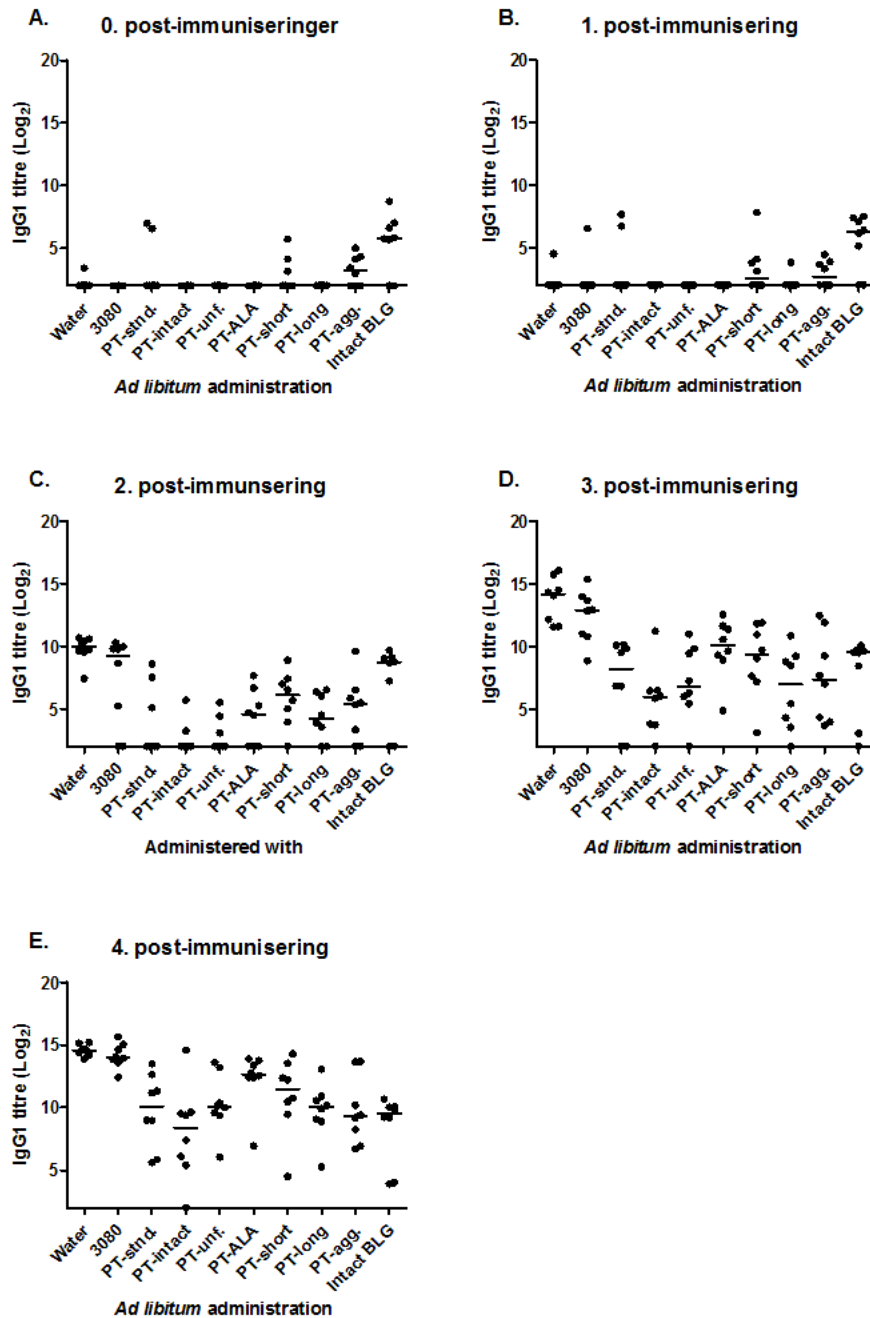
Resultater fra hudtest viste, at produkter indeholdende intakt protein har den højeste eliciterende evne. Derudover kan det ses, at det aggregerede produkt også kan have tendens til at elicitere et allergisk respons (Fig 10).

H: Test af den primære tolerance inducerende evne af de i alt 8 hydrolysater

Den primær forebyggende inducerende evne af de i alt otte hydrolysater blev testet ved hjælp af den etablerede dyremodel, der så ud som følger (Fig 11):

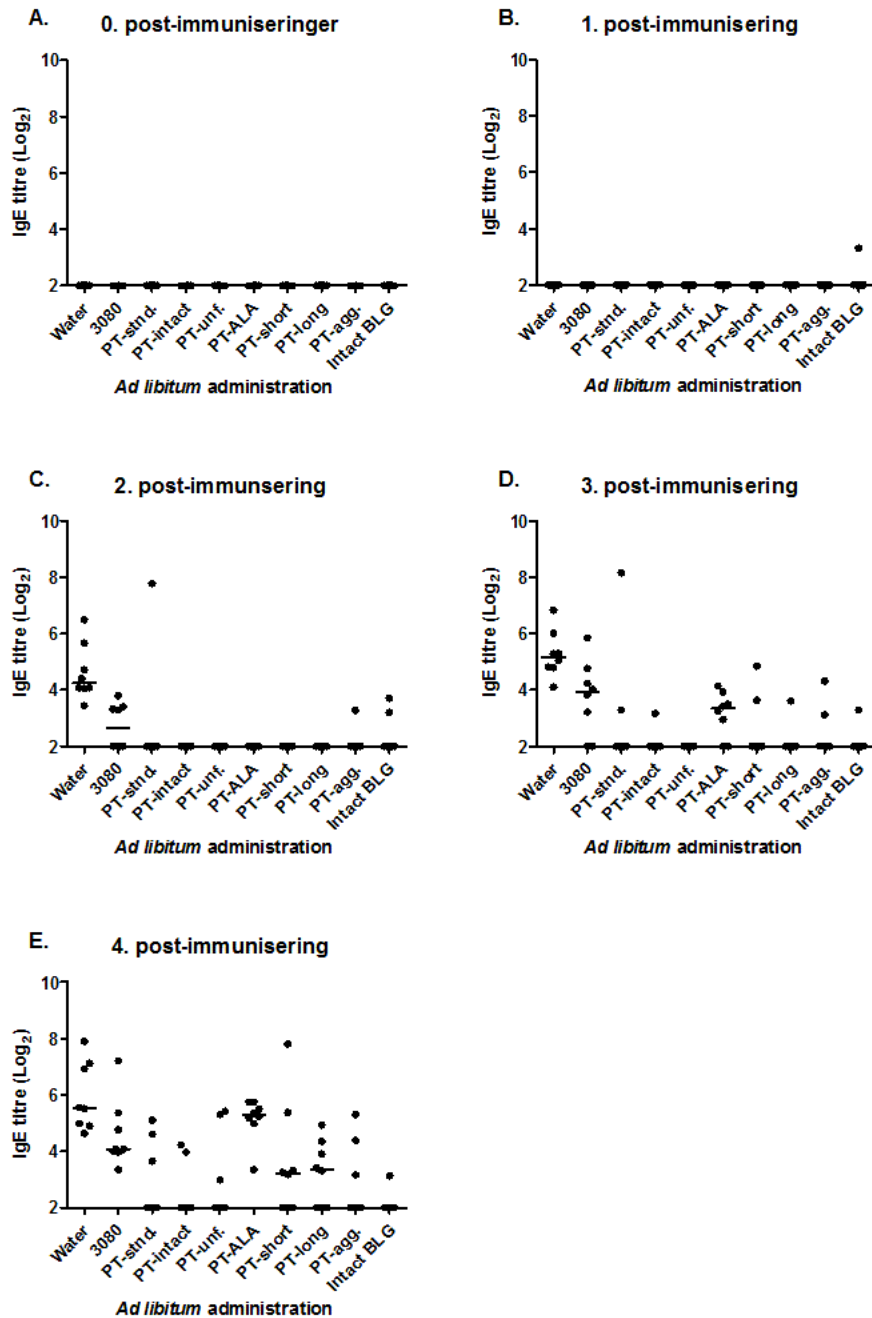


Efter de respektive post-immuniseringer sås følgende:



Figur 12. Den primær forebyggende effekt af de i alt 8 hydrolysater vist ved det specifikke IgG1 respons.

Resultaterne viser, at alle produkter med undtagelse af 3080 har primær forebyggende evne. Graden og holdbarheden af den tolerance inducerende evne varierer dog de resterende produkter imellem. Resultaterne viser, at ikke kun peptidstørrelserne men også mængden af intakt protein og tendensen af peptiderne til at aggregere er afgørende for produkternes tolerogene kapacitet (Fig 12-13).



Figur 13. Den primære forebyggende effekt af de i alt 8 hydrolysater vist ved det specifikke IgE respons. Det ses tydeligt at alle produkter forebygger sensibilisering ved det lavere IgE respons end responsen for dyr administreret med vand. Holdbarheden af den forebyggende evne adskiller sig også hydrolysaterne imellem.

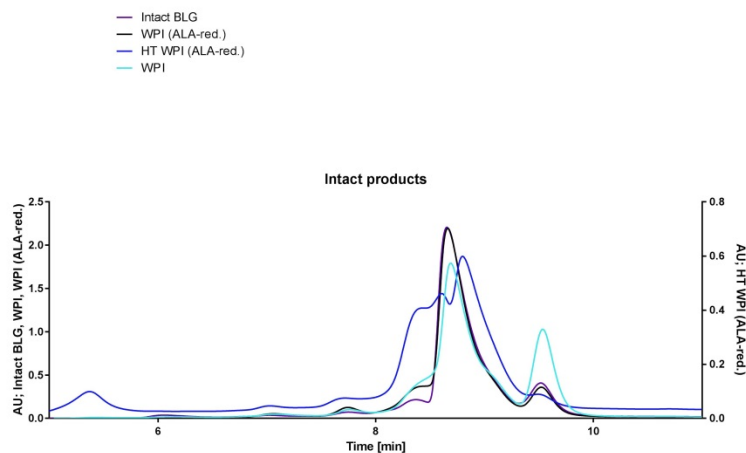
I: Udvælgelse af 4 intakte produkter til undersøgelse af desensibiliserende evne

De fire intakte produkter der blev udvalgt var intakt BLG og tre valleprotein-produkter, hvoraf det ene var det rene valle-protein produkt (WPI), det andet med reduceret ALA indhold (WPI (ALA-red.)) og det tredje med reduceret ALA indhold samt denatureret og aggregeret ved varmebehandling (HT WPI (ALA red.)).

J: Protein-kemisk karakterisering af de i alt 4 intakte produkter viste følgende (Tabel 2, Fig 14):

Tabel 2. Information of de i alt 4 intakte produkter.

	Intakt BLG	WPI	WPI (ALA-red.)	HT WPI (ALA red.) og den.
Protein konc. (%)	88,21	89,37	88,15	88,50
Fedt	0	0,10	0,09	0,17
Endotoksin-indhold (EU/mg)	0,08	0,404	>200	0,197

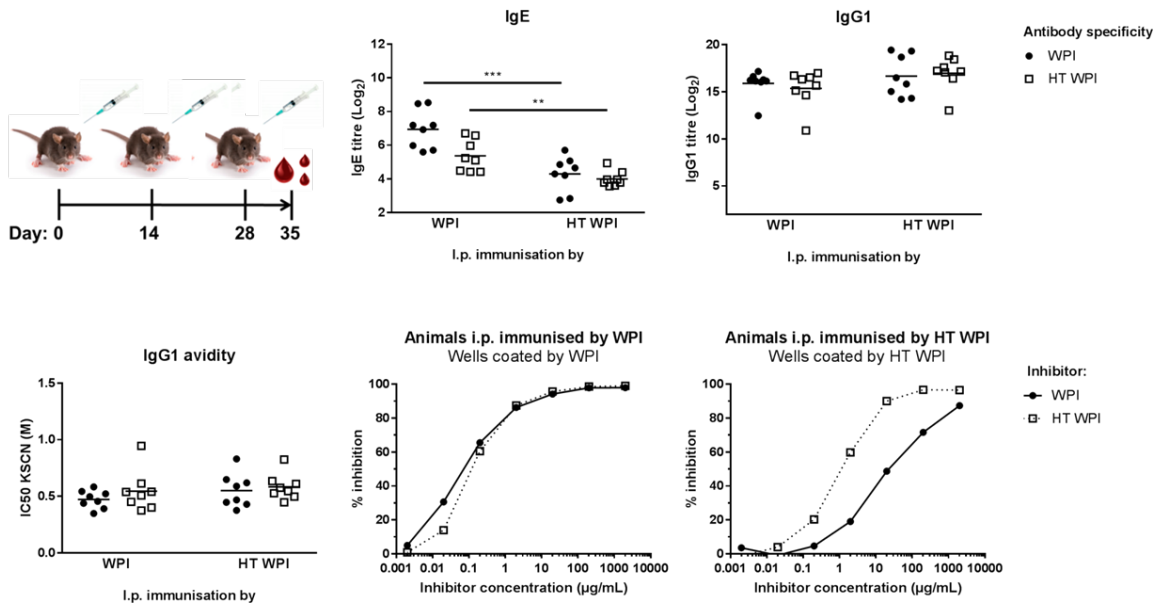


Figur 14. Størrelsesfordelingen af produkterne i aggregerede tilstande ved gel filtreringskromatografi.

Da de tre produkter, intakt BLG, WPI og ALA-reduceret WPI proteinkemisk lignede hinanden rigtig meget, valgte vi derfor efterfølgende primært at fokusere på de to produkter WPI (ALA-red.) og HT WPI (ALA-red.)

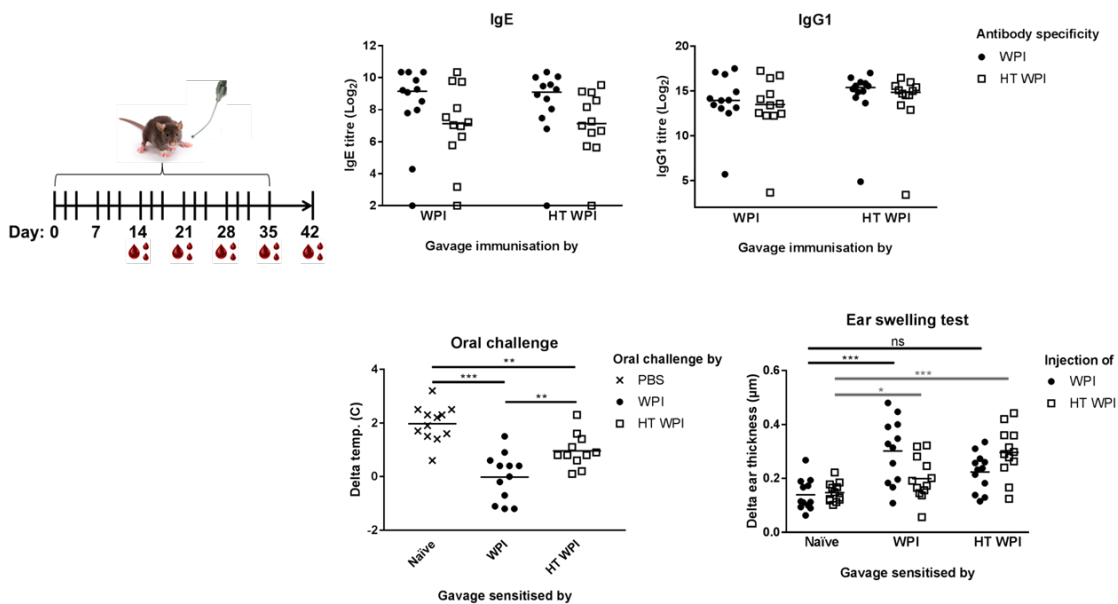
K: Test af den allergene kapacitet af de i alt 4 intakte produkter

Resultaterne fra i.p. sensibiliseringsforsøget viste, at varmebehandling af valleproduktet resulterede i en stærkt reduceret sensibiliserende evne, uden at det påvirkede immunogeniciteten eller aviditeten (bindingsstyrken) af de rejste antistoffer. Ligeledes blev det påvist, at varmebehandlingen påvirkede proteinerne således, at nye epitoper var blevet dannet i produktet i sammenligning med det ikke-behandlede produkt (Fig 15).



Figur 15. Resultater fra i.p. sensibiliseringsforsøget. Resultaterne viste at produkterne havde samme immunogenicitet (IgG1) og aviditet, men at det varmebehandlede produkt havde en stærkt reduceret sensibiliserende evne (IgE). Resultaterne viste også at ved varmebehandling opstod der nye epitoper (Inhibitory ELISA).

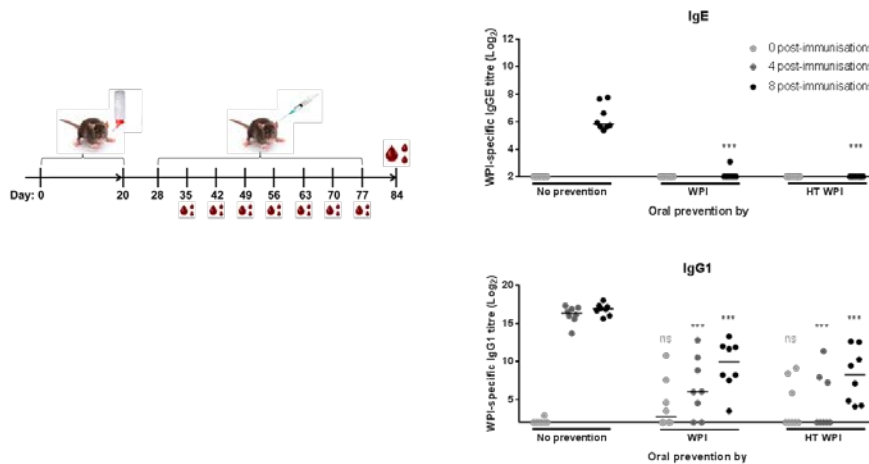
Resultaterne fra det orale sensibiliseringsforsøg viste ligeledes, at det varmebehandlede produkt havde en lavere allergenicitet, som kunne ses ved dets signifikante lavere evne til at udløse en allergisk respons i allerede sensibiliserede dyr (Fig 16).



Figur 16. Resultater fra det orale sensibiliseringsforsøg. Resultaterne viste at ved oral sensibilisering havde produkterne samme immunogenicitet (IgG1) såvel som sensibiliserende evne (IgE). Dog kunne det ses at det varmebehandlede produkt havde en lavere eliciterende evne end det ikke-varmebehandlede produkt (oral challenge).

L: Test af den primære forebyggende evne af de i alt 4 intakte produkter

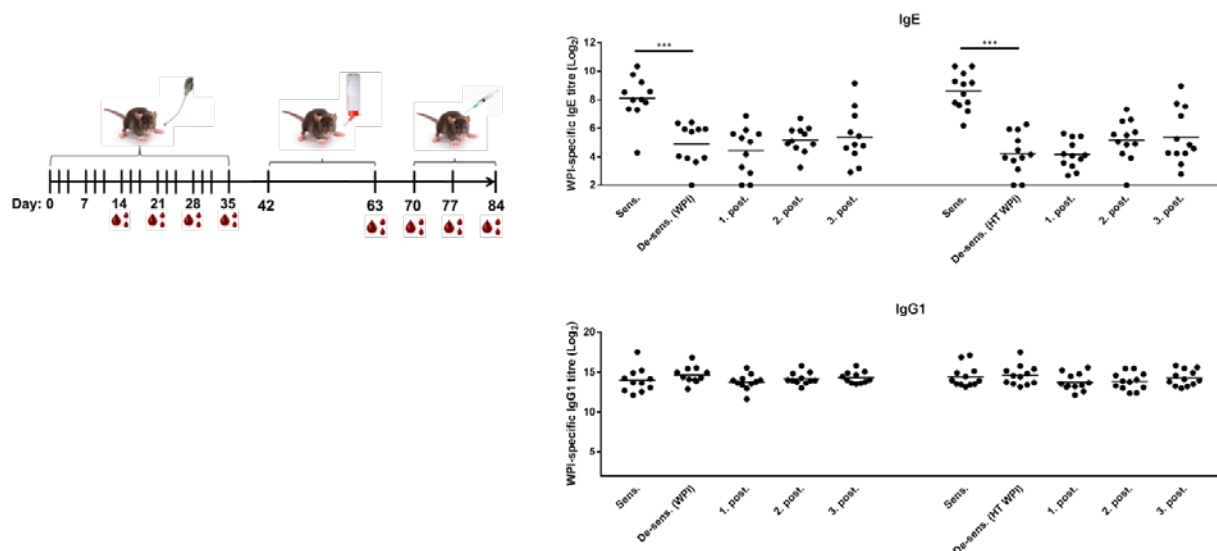
Resultaterne viste, at både det ikke-behandlede og det varmebehandlede produkt havde god primær forebyggende evne, og kunne inducere et særdeles solidt og holdbart tolerogent respons. Resultaterne viste dog også, at det varmebehandlede produkt havde en anelse bedre forebyggende effekt end det ikke-behandlede produkt (Fig. 17).



Figur 17. Resultater fra det primær forebyggende forsøg vist ved det specifikke IgG1 og IgE respons.

M: Test af den desensibiliserende evne af de i alt 4 intakte produkter

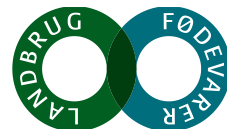
Resultaterne viste at begge produkter havde desensibiliserende evne og dermed evnen til at konvertere allergi til tolerance. Forsøget viste at den desensibiliserende evne af produkterne var identiske (Fig 18).



Figur 18. Resultater fra desensibiliseringsforsøget vist ved det specifikke IgG1 og IgE respons.

N: Test af tarmoptag af to af de 4 intakte produkter (Denne delaktivitet er også en del af MFF projektet "Mikrobiota og komælkstolerance")

Test af tarmoptag blev udført på de forskellige sensibiliseringsforsøg, men er en aktiv del af MFF projektet "Mikrobiota og komælkstolerance", så resultaterne vil blive beskrevet i statusrapporten for dette projekt.



O: Artikelskrivning og formidling

Formidling og vidensdeling er beskrevet i punkt 13.

Fra dette projekt kan man konkludere, at dyremodeller for test af allergene og tolerogene egenskaber er et godt og solidt værktøj til at lave en overordnet vurdering af komælksproteinprodukters potentiale som ingrediens i modernælkserstatninger til enten forebyggelse, management eller behandling af komælksallergi. Projektet viste med tydelighed vigtigheden af at lave grundige protein-kemiske karakteriseringer af produkter, da egenskaber ud over hydrolysegraden er afgørende for produkters allergene versus tolerogene egenskaber. Projektet belyste ydermere potentialet af modificerede intakte produkter som alternativer til hypoallergene modernælkserstatninger.

11. Afvigelser

11.1 Fagligt: Formålet med projektet var oprindeligt kun at fokusere på hydrolysater, men endte med også at fokusere på intakte produkter, da vi ellers ikke kunne gøre brug af vores ny-etablerede dyremodel for desensibilisering, da kun intakte produkter kunne påvises af have desensibiliserende effekt.

11.2 Økonomisk: Ingen afvigelser

11.3 Tidsplan: Projektet blev forlænget et år, for at kunne inkludere test af yderligere 4 intakte produkter.

12. Resultaternes betydning, herunder for mejeribrug

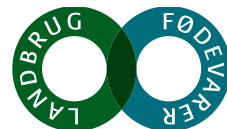
Udbyttet af projektet er to nye dyremodeller til test af tolerogene egenskaber af hydrolysater baseret på mælk. Disse vil umiddelbart efter projektafslutning muliggøre, at mælkeindustrien kan få testet ikke kun den sensibiliserende evne men også de tolerogene evner af nye prototyper på hydrolysater, inden de markedsføres.

Projektet vil bidrage med ny viden om, hvilke egenskaber af mælkeproteinbaserede produkter, der dirigerer immunsystemet mod sensibilisering, og hvilke egenskaber der dirigerer immunsystemet mod tolerance. Dette vil bidrage til fremtidige vidensbaserede strategier for etablering af nye og forbedrede hypoallergene modernælkserstatninger hos mælkeindustrien.

Yderligere vil projektet belyse muligheden for en ny og mere sikker strategi for oral immunoterapi (desensibilisering) baseret på intakte mælkeprodukter.

Effekten af projektet omfatter værdifuld viden i relation til design af nye og forbedrede hypoallergene modernælkserstatninger, der vil være af mere individuel og målrettet karakter, hvilket således vil muliggøre en skelnen mellem behovet hos individer med stor risiko for at udvikle mælkeallergi, men som endnu ikke har mælkeallergi, og individer med en allerede diagnosticeret mælkeallergi.

Projektet har genereret værdifuld viden der kan få betydning for design af nye og forbedrede komælksproteinbaserede modernælkserstatninger, der vil være af mere individuel og målrettet karakter. En mulig effekt af sådanne personaliserede modernælkserstatninger vil på længere sigt kunne måles, ikke alene på reduktion i antallet af børn, der udvikler mælkeallergi, men også på reduktion i antallet af børn med mælkeallergi, der udvikler allergiske reaktioner ved indtag af mælkebaserede produkter. Derudover er en mulig effekt at der blive flere børn der vokser sig ud af deres mælkeallergi. Dette vil være samfundsbesparende.



13. Formidling og vidensdeling vedr. projektet

Artikler i internationale tidsskrifter:

- Jensen LH, Laursen RR, Jacobsen LN, Madsen CB, Bøgh KL. Development of animal models for primary prevention and desensitisation – studies with cow's milk based proteins (Under udarbejdelse til "Clinical and Translational Allergy")
- Jensen LH, Laursen RR, Christoffersen HF, Jacobsen LN, Madsen CB, Bøgh KL. Allergenic versus tolerogenic properties of various cow's milk based hydrolysates – a study in Brown Norway rats (Under udarbejdelse til "International Archives of Allergy and Immunology")
- Graversen KB, Untersmayr E, Smit J, Jensen LH, Asukowit C, Reholt J, Hornslet SE, Christoffersen HF, Jacobsen LN, Allergenicity and tolerogenicity of two cow's milk protein products – Is there a correlation with the route of intestinal uptake (Under udarbejdelse til "Clinical and Experimental Allergy")

Populærvidenskabelige artikler:

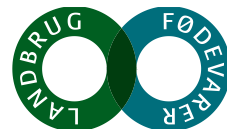
- Bøgh KL, Madsen CB. Modernmælkserstatninger og allergi. MÆLKERITIDENDE, 2014, 11, 10-11.
- Bøgh KL. Kan man designe modernmælkserstatninger der er særlig gode til at forebygge komælksallergi? (Under udarbejdelse til MÆLKERITIDENDE)

Studeropgaver:

- Kandidatafhandling: Louise Heydenreich Jensen,
- Bachelorafhandling: Sofie Emilie Hornslet,
- Bachelorafhandling: Chantida Asukowit & Julie Reholt,

Indlæg ved faglige kongresser, symposier etc.:

- Graversen KB, Asukowit C, Reholt J, Hornslet SE, Smit J, Christoffersen HF, Jacobsen LN, Bøgh KL. Correlation of the allergenicity and tolerogenicity of two cow's milk protein products with their intestinal uptake – a study in Brown Norway rats. The 3rd Improving Allergy Risk Assessment Strategy for new food proteins (ImpARAS) Congress, Elsinore, Denmark
- Graversen KB, Hornslet SE, Smit JJ, Jensen LH, Christoffersen HF, Jacobsen LN, Bøgh KL. Correlation of the allergenicity and tolerogenicity of two cow's milk protein products with intestinal uptake. The 36th European Academy of Allergy and Clinical Immunology Congress (EAACI), Helsinki, Finland, 2017.
- Jensen LH, Laursen RR, Madsen CB, Jacobsen LN, Bøgh KL. The influence of physico-chemical properties of cow's milk based hydrolysates on the allergenic versus primary preventive capacity. The 1st ImpARAS congress, Belgrade, Serbia, 2015.



- Bøgh KL, Laursen RR, Jacobsen LN, Madsen CB. Development of two Brown Norway rat models for the assessment of primary prevention and desensitising capacity of cow's milk based hydrolysates. The 34th European Academy of Allergy and Clinical Immunology Congress (EAACI), Barcelona, Spain, 2015.

Mødeindlæg:

- Indlæg ved de halvårslige styregruppemøder ved MFF – sundhed og ernæring
- Indlæg ved halvårslige møder med Arla Food Ingredients

Andet:

14. Bidrag til kandidat og forskeruddannelse

Projektet har bidraget til uddannelse af 4 DTU Bioteknologi Ingeniør studerende, ved at de har lavet deres kandidat- eller bachelor-opgaver i tilknytning til projektet. Se punkt 13.

Projektet har bidraget til forskeruddannelse af ph.d.-studerende Katrine Bækby Graversen.

15. Nye kontakter/projekter

Projektet har i særdeleshed haft aftryk på den videre forskning i Allergi-teamet på Fødevareinstituttet på DTU. De to nyetablerede dyremodeller for henholdsvis primær forebyggelse og desensibilisering har haft afgørende betydning for projekter, der efterfølgende er blevet taget hjem af projektleder, hvor dyremodellerne bliver anvendt:

- MFF-projektet: Mikrobiota og komælkstolerance
- Innovationsfondsprojektet: ALLEVIATE (A novel strategy for food allergy prevention and treatment)

Projektet har yderligere givet os et særligt indblik i hvor altafgørende de protein-kemiske karakteriseringer af mælkeprodukterne er for at kunne videreudvikle og forbedre protein-ingredienser til modermælkserstatninger.

Projektet har ledt til nye samarbejder af både national og international karakter, hvor samarbejde med tarmmikrobiota-forskerne på Fødevareinstituttet på DTU, Læger på HC. Andersens Hospital i Odense, samt allergiforskere i både Schweiz, Holland og Østrig, er blevet etableret.

16. Underskrift og dato

Projektet er formeldt afsluttet, når projektleder og MFF-repræsentant (fx styregruppeformanden for den respektive styregruppe) har underskrevet slutrapporten.

Dato: _____ Projektleders underskrift: _____

Dato: 2. november 2017 MFF-repræsentants underskrift: