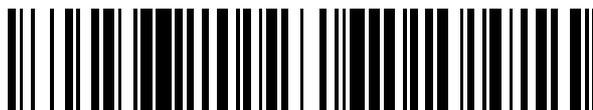


19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 545 749**

51 Int. Cl.:

**A61K 31/702** (2006.01)

**A61K 33/06** (2006.01)

**A61P 37/08** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **22.02.2011 E 11744815 (9)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **15.07.2015 EP 2540300**

54 Título: **Potenciador de la adhesión célula-célula epitelial para uso en la mejora, tratamiento y prevención de enfermedades alérgicas**

30 Prioridad:

**22.02.2010 JP 2010036698**

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:

**15.09.2015**

73 Titular/es:

**B FOOD SCIENCE CO., LTD. (100.0%)  
24-12, Kitahama-machi, Chita-shi  
Aichi, 478-0046, JP**

72 Inventor/es:

**KOGA, YASUHIRO;  
SUZUKI, YOSHIMITSU;  
MAKISHIMA, SATOSHI;  
OGASA, KAZUO;  
SUZUKI, MASAYUKI y  
IIZUKA, TOSHIKO**

74 Agente/Representante:

**DE ELZABURU MÁRQUEZ, Alberto**

**ES 2 545 749 T3**

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín europeo de patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre concesión de Patentes Europeas).

## DESCRIPCIÓN

Potenciador de la adhesión célula-célula epitelial para uso en la mejora, tratamiento y prevención de enfermedades alérgicas

**Campo técnico**

- 5 La presente invención se refiere a un potenciador de la adhesión célula-célula epitelial y a un agente mejorador, terapéutico o profiláctico para enfermedades alérgicas que lo usan. La presente invención se refiere particularmente a un potenciador de la adhesión célula-célula epitelial capaz de mejorar, tratar y prevenir enfermedades alérgicas potenciando la adhesión célula-célula en células epiteliales (adhesión célula-célula epitelial), que es una de las funciones barrera contra alérgenos, y un agente mejorador, terapéutico o profiláctico para enfermedades alérgicas que lo usan.

**Técnica antecedente**

Se considera que las enfermedades alérgicas están causadas por reacciones anómalas del sistema inmunitario contra cuerpos extraños. En el cuerpo humano, los órganos que encuentran principalmente sustancias extrañas en el entorno externo son la epidermis, los órganos respiratorios y los órganos digestivos.

- 15 Entre estos órganos, los órganos digestivos tienen un sistema inmunitario único, que recientemente les ha convertido en el centro de atención como órganos inmunitarios que tienen también un impacto tremendo sobre el sistema inmunitario sistémico.

- Actualmente, la elección predilecta para el tratamiento de enfermedades alérgicas son medicamentos esteroideos orales sintéticos, que presentan un mecanismo de inhibición de la expresión de citocinas inflamatorias, que se produce por la unión de alérgenos al receptor de glucocorticoides intranuclear. Sin embargo, se ha descrito que los medicamentos esteroideos orales sintéticos causan efectos secundarios tales como inducción de enfermedades infecciosas, lesión aterosclerótica, insuficiencia adrenal, deficiencia gastrointestinal, y además, anomalía menstrual en mujeres. Cuando se observan efectos secundarios graves, otros enfoques terapéuticos, un tratamiento concomitante, o similar deben ser tenidos también en consideración.

- 25 De hecho, recientemente, se han realizado una serie de informes acerca de la consecución de cierta eficacia terapéutica no solamente mediante medicamentos esteroideos orales sintéticos, sino también mejorando el equilibrio de células inmunocompetentes en el tracto intestinal, y también combinando diversos métodos para activar las células inmunitarias.

- Convencionalmente, como método profiláctico para enfermedades alérgicas, en base al hecho de que los niños que han desarrollado enfermedades alérgicas tienen un menor número de bifidobacterias entéricas que los niños sanos, un método de intentar una mejora en el equilibrio de la composición de la flora intestinal ha sido el más popular.

- Como un método basado en la idea de mejorar o prevenir enfermedades alérgicas estableciendo un buen equilibrio de la composición de la flora intestinal, la patente japonesa abierta a inspección pública Nº 8-157379 (bibliografía de patentes 1) describe un método que usa un agente profiláctico para enfermedades alérgicas que contiene un fructooligosacárido. La patente japonesa abierta a inspección pública Nº 2003-201239 (bibliografía de patentes 2) describe un producto alimenticio inmunoactivador que contiene un fructooligosacárido. Además, la patente japonesa Nº 4162147 (bibliografía de patentes 3) y la patente japonesa abierta a inspección pública Nº 2008-280354 (bibliografía de patentes 4) describen un método para inhibir enfermedades alérgicas.

- La bibliografía de patentes 1 describe un método que incluye ingerir una composición que contiene una fuente de magnesio, un fructooligosacárido y un alcohol de azúcar indigerible, para el empeoramiento de enfermedades alérgicas debido a la deficiencia de magnesio. Éste es un método profiláctico para empeoramiento de enfermedades alérgicas promoviendo la absorción de magnesio mediante un alcohol de azúcar indigerible y un ácido orgánico, que es producido por bacterias entéricas utilizando el fructooligosacárido. Sin embargo, aunque este método puede tratar el empeoramiento de enfermedades alérgicas debido a deficiencia de magnesio, es incapaz de tratar enfermedades alérgicas atribuibles a otras causas y, por lo tanto, los pacientes son limitados. La bibliografía de patentes 2 describe un método para activar la inmunidad intestinal induciendo la producción de IgA a partir de la placa de Peyer por ingestión de un fructooligosacárido. Sin embargo, de acuerdo con este método, la dosis eficaz es tan alta que la ingestión diaria es muy difícil.

- La bibliografía de patentes 3 describe un agente que inhibe una enfermedad alérgica en el que 1-kestosa es la primera composición que representa la proporción de composición más alta en un fructooligosacárido y la bibliografía de patentes 4 describe un oligosacárido que inhibe una enfermedad alérgica en el que 1-kestosa es la primera composición que representa la proporción de composición más alta en un fructooligosacárido. En comparación con el efecto ejercido sobre enfermedades alérgicas descritas en las bibliografías de patentes 1 y 2, los anteriores agente que inhibe una enfermedad alérgica y oligosacárido que inhibe una enfermedad alérgica tienen un mayor efecto inhibitor sobre enfermedades alérgicas. Mientras tanto, el documento *Clinical effects of kestose, a prebiotic oligosaccharide, on the treatment of atopic dermatitis in infants* (bibliografía no de patentes 1) ha descrito

que, como resultado de un estudio de ingestión de 1-cestosa en lactantes, no se ha observado una fuerte correlación entre la mejora de los síntomas alérgicos y la proliferación de bifidobacterias.

5 Recientemente, se ha demostrado que la actividad cisteína/serina proteasa, que se observa habitualmente entre potenciales sustancias alérgicas, degrada la proteína de la unión intercelular hermética entre células epiteliales, debilitando de este modo la adhesión célula-célula epitelial (bibliografías no de patentes 2 y 3). A la luz de lo anterior, se ha intentado un método basado en la idea de mejorar, tratar o prevenir enfermedades alérgicas previniendo la invasión de alérgenos en el cuerpo potenciando la adhesión célula-célula epitelial reparando, o promoviendo la formación de, la proteína de la unión intercelular hermética entre células epiteliales.

10 Hasta ahora, usando un modelo que emplea las células epiteliales intestinales, se ha llevado a cabo una búsqueda de una sustancia capaz de potenciar la adhesión célula-célula epitelial, y ejemplos de la misma incluyen un ácido nucleico derivado del esperma de peces o de levadura (bibliografía de patentes 5), un péptido derivado de una preparación de celulasa (bibliografía de patentes 6), monosialogangliósido 3 (bibliografía de patentes 7), ácido lipoteicoico derivado de bacterias del ácido láctico (bibliografía de patentes 8), y una proteína del suero (bibliografía de patentes 9). Todo lo anterior había demostrado tener un efecto inhibitorio sobre enfermedades alérgicas promoviendo la formación de la proteína de la unión intercelular hermética entre células epiteliales.

15 Sin embargo, las sustancias descritas en las bibliografías de patentes 5 a 8 implican complicados procesos de fabricación, y además, la producción en masa a escala industrial es extremadamente difícil. Mientras tanto, la sustancia descrita en la bibliografía de patentes 9 puede producirse fácilmente; sin embargo, para alcanzar el efecto, es necesario ingerirla en una gran cantidad, lo que hace difícil la toma diaria. Por las razones descritas anteriormente, un medicamento preparado con las sustancias anteriores que es capaz de mejorar, tratar o prevenir enfermedades alérgicas aún no ha sido elaborado.

Lista de citas

Bibliografía de patentes

Bibliografía de patentes 1: patente japonesa abierta a inspección pública N° 8-157379

25 Bibliografía de patentes 2: patente japonesa abierta a inspección pública N° 2003-201239

Bibliografía de patentes 3: patente japonesa N° 4162147

Bibliografía de patentes 4: patente japonesa abierta a inspección pública N° 2008-280354

Bibliografía de patentes 5: patente japonesa N° 4050799

Bibliografía de patentes 6: patente japonesa abierta a inspección pública N° 2002-275196

30 Bibliografía de patentes 7: patente japonesa N° 4034364

Bibliografía de patentes 8: patente japonesa abierta a inspección pública N° 2008-212006

Bibliografía de patentes 9: patente japonesa N° 4330088

Bibliografía no de patentes

Bibliografía no de patentes 1: Shibata R, et. al., Clin. Exp. Allergy, 2009 Sep, 39 (9), P1397 a 1403

35 Bibliografía no de patentes 2: Wan H. et. al., J. Clin. Invest. 1999, 104, P123 a 133

Bibliografía no de patentes 3: Runswick S, et. al., J. Allergy Clin. Immunol., 2003, 111, P704 a 713

### Sumario de la invención

Problema técnico

40 La presente invención se basa en la idea de mejorar, tratar o prevenir enfermedades alérgicas inhibiendo la invasión de alérgenos en el cuerpo potenciando la adhesión célula-célula epitelial. Los inventores de la presente invención han descubierto que una combinación de un catión metálico divalente y un oligosacárido específico puede potenciar adicionalmente la adhesión célula-célula epitelial en comparación con un catión metálico divalente, completando de este modo las siguientes invenciones. Es decir, un objeto de la presente invención es proporcionar una composición que contiene un oligosacárido específico y un catión metálico divalente, que es eficaz para mejora, tratamiento o

45 prevención de enfermedades alérgicas o para reacción inflamatoria tópica de una manera extremadamente segura y eficaz en comparación con medicamentos esteroideos orales sintéticos, a pesar del hecho de que normalmente, se usa un oligosacárido como producto alimenticio y un catión metálico divalente está presente en el organismo vivo, y de esta manera estas sustancias son familiares como sustancias no tóxicas al organismo vivo dentro del intervalo de concentración fisiológica.

Solución al problema

(1) Actuar como un potenciador de la adhesión célula-célula para activación de células epiteliales, para uso en mejora, tratamiento o prevención de enfermedades alérgicas que comprende 1-cestosa y/o nistosa y un catión metálico divalente es decir un ion de calcio.

5 (2) El potenciador de acuerdo con (1), en el que el potenciador comprende 1-cestosa e ion de calcio como ingredientes activos.

(3) El potenciador de acuerdo con (2), en el que la 1-cestosa es un oligosacárido que contiene 1-cestosa a una pureza de 95% en peso o más, y el catión metálico divalente está presente en una parte en peso o más por 10 partes en peso del oligosacárido que contiene 1-cestosa.

10 4) El potenciador de acuerdo con cualquiera de (1) a (4), en el que la célula epitelial es una célula epitelial intestinal.

Efectos ventajosos de la invención

15 El potenciador de la adhesión célula-célula epitelial y el agente mejorador, terapéutico o profiláctico para enfermedades alérgicas que lo usa de acuerdo con la presente invención pueden inhibir la alteración de la proteína de la unión intercelular hermética entre células epiteliales, que podría causar la invasión de alérgenos en el cuerpo, y además, pueden potenciar la adhesión célula-célula epitelial reparando, o promoviendo la formación de, la proteína de la unión intercelular hermética entre células epiteliales, permitiendo de este modo eficazmente la mejora, tratamiento y prevención de síntomas alérgicos.

**Breve descripción de los dibujos**

20 [Figura 1] La figura 1 es un gráfico que muestra los resultados de la medición de cambios cronológicos en TEER mediante la adición de 1-cestosa y nistosa en el ejemplo 1.

[Figura 2] La figura 2 es un gráfico que muestra los resultados de la medición de cambios cronológicos en TEER mediante la adición de 1-cestosa en el ejemplo 2.

[Figura 3] la figura 3 es un gráfico que muestra los resultados de la medición de cambios cronológicos en TEER mediante la adición de 1-cestosa en el ejemplo 3.

25 [Figura 4] La figura 4 es un gráfico que muestra los resultados de la medición de cambios cronológicos en TEER mediante la adición de 1-cestosa en el ejemplo 4.

[Figura 5] La figura 5 es un gráfico que muestra los resultados de la medición de cambios cronológicos en TEER mediante la adición de 1-cestosa en el ejemplo 4.

30 [Figura 6] La figura 6 es un gráfico que muestra los resultados de la medición de cambios en la cantidad de sustancias que penetran mediante la adición de 1-cestosa, sacarosa y nistosa en el ejemplo 5.

[Figura 7] La figura 7 es un gráfico que muestra los resultados de la medición de cambios en TEER mediante la adición de 1-cestosa en el ejemplo 6.

**Descripción**

35 La presente invención está definida por las reivindicaciones. A continuación en la presente memoria, el potenciador de la adhesión célula-célula epitelial y el agente mejorador, terapéutico o profiláctico para enfermedades alérgicas que lo usa de acuerdo con la presente invención se describirán en detalle. El potenciador de la adhesión célula-célula epitelial de acuerdo con la presente invención es un potenciador de la adhesión célula-célula en células epiteliales, que contiene 1-cestosa y/o nistosa y un ion de calcio, o 1-cestosa y un catión metálico divalente como ingredientes activos.

40 Tal como se ha descrito anteriormente, se sabe que la actividad cisteína/serina proteasa, que se observa habitualmente entre potenciales sustancias alérgicas, degrada la proteína de la unión intercelular hermética entre células epiteliales, debilitando de este modo la adhesión célula-célula epitelial (bibliografías no de patentes 2 y 3). El potenciador de la adhesión célula-célula epitelial de la presente invención repara, o promueve la formación de, la proteína de la unión intercelular hermética entre células epiteliales, potenciando de este modo la adhesión célula-célula epitelial e inhibiendo la invasión de alérgenos en el cuerpo. A la luz de lo anterior, el potenciador de la adhesión célula-célula epitelial, y el agente mejorador, terapéutico o profiláctico para enfermedades alérgicas que lo usa de acuerdo con la presente invención pueden mejorar, tratar o prevenir enfermedades alérgicas.

50 En la presente invención, ejemplos de la célula epitelial incluyen una célula epitelial absorbente, una célula epitelial queratinizada, epitelio barrera estratificado húmedo, epitelio de revestimiento, una célula epitelial exocrina, una célula epitelial endocrina, una célula epitelial secretora de la matriz extracelular y una célula epitelial contráctil. Los ejemplos específicos de la célula epitelial incluyen una célula epitelial intestinal tal como una célula epitelial del

intestino delgado, una célula epitelial del intestino grueso, una célula epitelial duodenal, una célula epitelial de la mucosa gástrica, una célula epitelial esofágica, una célula epitelial corneal, una célula epitelial conjuntival, una célula epitelial amniótica, una célula epitelial cutánea y una célula epitelial palatal.

Como catión metálico divalente, se usa un ion de calcio,

5 Convencionalmente, se ha demostrado que la adhesión célula-célula tiene plasticidad mediante el llamado "conmutador de calcio", que implica la retirada y adición extracelular de iones de calcio (Sarah L. D. et. al., B. B. A., 2008, 1778; Georgina C. et. al., J. Membrane Biol., 2010, 237, P115 a 123). Recientemente, se ha demostrado que un catión metálico divalente diferente de un ion de calcio, por ejemplo un ion de magnesio y un ion de zinc, también afecta positivamente a la formación de la adhesión célula-célula dentro del intervalo de concentración fisiológica (Sarah L. D. et. al., B. B. A., 2008, 1778, P2318 a 2324; Georgina C. et. al., J. Membrane Biol., 2010, 237, P115 a 123), y como una función celular común en los fenómenos anteriores, se ha sugerido la presencia de una función celular mediada por un catión metálico divalente que tiene un efecto similar a un ion de calcio. Por consiguiente, en la presente invención, una frase de que 1-cestosa y/o nistosa y un ion de calcio, o 1-cestosa y un ion de calcio muestran promoción de la formación de la adhesión célula-célula es sinónima con una frase de que 1-cestosa y/o nistosa y un catión metálico divalente, o 1-cestosa y un catión metálico divalente muestran promoción de la formación de la adhesión célula-célula.

Los ejemplos del oligosacárido que se usan en la presente invención incluyen un fructooligosacárido tal como 1-cestosa y/o nistosa. En los presentes ejemplos se usan tanto 1-cestosa como nistosa.

20 1-cestosa es un fructotrisacárido compuesto por una molécula de residuo de glucosa y dos moléculas de residuos de fructosa. Los ejemplos de una forma preferida de 1-cestosa que pueden usarse en la presente invención incluyen un oligosacárido que contiene 1-cestosa a una pureza de 95% en peso o más. Este oligosacárido que contiene 1-cestosa se obtiene llevando a cabo una reacción enzimática usando sacarosa como material de partida, y a partir del producto preparado de este modo, eliminando monosacáridos y sacarosa mediante separación cromatográfica para incrementar la pureza de 1-cestosa, y a continuación aplicando un método de cristalización. El oligosacárido que contiene 1-cestosa obtenido como anteriormente tiene excelente solubilidad y es indigerible, y tiene baja energía. Además, el oligosacárido que contiene 1-cestosa anterior tiene una acción potenciadora de la producción de IgA y una acción inhibitoria de la producción de IgE (bibliografías de patentes 3 y 4).

30 Además, como método mencionado anteriormente de preparación de un producto mediante una reacción enzimática usando sacarosa como material de partida, puede usarse el método descrito en la patente japonesa abierta a inspección pública N° 58-201980; como método mencionado anteriormente para incrementar la pureza eliminando monosacáridos y sacarosa mediante separación cromatográfica, puede usarse el método descrito en la solicitud de patente japonesa N° 11-34787 (patente japonesa abierta a inspección pública N° 2000-232878); y como método de cristalización mencionado anteriormente, puede usarse el método descrito en solicitud de patente japonesa N° 2-224312 (patente japonesa abierta a inspección pública N° 4-235192). Los contenidos de la solicitud de patente japonesa N° 11-34787, la solicitud de patente japonesa N° 2-224312 y la solicitud de patente japonesa N° 2005-371005 (bibliografía mencionada 3) y la solicitud de patente japonesa N° 2008-166463 (bibliografía mencionada 4) están abarcados por la presente memoria descriptiva.

40 La dosis diaria de 1-cestosa de acuerdo con la presente invención es preferentemente 0,015 g/kg de peso corporal o más. En lactantes, la dosis diaria de 1-cestosa es preferentemente aproximadamente 2,5 g, que se obtiene mediante conversión en base a una proporción de una parte en peso de ion metálico divalente por 10 partes en peso de 1-cestosa.

Además, la adhesión célula-célula epitelial de acuerdo con la presente invención se consigue reparando, o promoviendo la formación de, la proteína de la unión intercelular hermética entre células epiteliales.

45 El término "potenciar" en la presente invención se usa de forma intercambiable con los términos tales como "activar", "promover", "reforzar" e "incrementar".

Los ejemplos de enfermedades alérgicas incluyen atopía, rinitis alérgica, conjuntivitis alérgica, gastroenteritis alérgica, asma bronquial, asma infantil, urticaria, alergia a animales, alergia alimentaria, alergia a metales, alergia a fármacos y anafilaxis. En la presente invención, preferentemente, atopía, rinitis alérgica, conjuntivitis alérgica y alergia alimentaria son dianas.

50 Para la formulación del potenciador de la adhesión célula-célula epitelial y el agente mejorador, terapéutico o profiláctico para enfermedades alérgicas que lo usa de acuerdo con la presente invención, puede usarse un método conocido públicamente entre los expertos en la materia. La forma farmacéutica puede ser seleccionada apropiadamente por los expertos en la materia. Los ejemplos de la forma farmacéutica incluyen, cuando se prepara como un fármaco administrado por vía oral, un comprimido, un gránulo, un polvo, una cápsula, un fármaco revestido, un líquido y una suspensión y, cuando se prepara como un fármaco administrado por vía parenteral, un inhalante, una inyección, un goteo, líquido de infusión, un supositorio, un linimento, un spray y un parche, y el potenciador de la adhesión célula-célula epitelial y el agente mejorador, terapéutico o profiláctico para enfermedades alérgicas que lo usa de acuerdo con la presente invención se aplican preferentemente a la zona de piel afectada por prurito o

erupción, o se administran a la mucosidad de la nariz o el ojo. Además, la dosis del potenciador de la adhesión célula-célula epitelial y el agente mejorador, terapéutico o profiláctico para enfermedades alérgicas que lo usa de acuerdo con la presente invención puede ajustarse apropiadamente de acuerdo con la formulación del fármaco, la vía de administración y el propósito de administración de la composición farmacéutica así como la edad, el peso corporal y los síntomas del individuo al que se le administra la composición farmacéutica.

A continuación en la presente memoria, el potenciador de la adhesión célula-célula epitelial y el agente mejorador, terapéutico o profiláctico para enfermedades alérgicas que lo usa de acuerdo con la presente invención se describirán con referencia a los ejemplos. Debe observarse que el alcance técnico de la presente invención no está limitado a las características mostradas por estos ejemplos.

## 10 Ejemplos

[Ejemplo 1: Un experimento que confirma el efecto de 1-cestosa sobre la promoción de la recuperación de adhesión célula-célula epitelial disminuida causada por deficiencia de calcio extracelular]

En el ejemplo 1, el efecto de 1-cestosa sobre la promoción de la recuperación de adhesión célula-célula epitelial disminuida causada por deficiencia de calcio extracelular se confirmó mediante un experimento que usaba células cultivadas.

El oligosacárido que contiene 1-cestosa usado en el presente ejemplo 1 está compuesto por 98% en peso de 1-cestosa, 1% en peso de nistosa y 1% en peso de sacarosa. Concretamente, es un oligosacárido que contiene 1-cestosa a una pureza de 98% en peso. Además, como índice para la fuerza de adhesión célula-célula el células cultivadas, se usó la resistencia eléctrica transepitelial (TEER). Este método de medición utiliza una propiedad de que cuanto más fuerte es la adhesión célula-célula epitelial, mayor es el valor de resistencia eléctrica entre la capa superior y la capa inferior del medio de cultivo celular, y esta técnica también se emplea para un experimento modelo que usa células epiteliales y similares.

Células Caco-2, que son las células epiteliales de carcinoma colorrectal, se subcultivaron en un medio DMEM que contenía FBS a 10% (GIBCO), y la 48ª generación de células cultivadas se crioconservaron y se usaron para los siguientes experimentos. Las células Caco-2 se sembraron en la capa superior de un soporte permeable Transwell (Corning Life Sciences) y se cultivaron en una incubadora en CO<sub>2</sub> a 5% a 37°C en presencia de un medio DMEM que contenía FBS a 10%. Se realizó el cultivo celular hasta que la resistencia eléctrica entre la capa superior y la capa inferior del Transwell (TEER) alcanzaba de 400 a 500  $\Omega \text{ cm}^2$ .

Las células Caco-2 que se cultivaron hasta que la TEER del Transwell alcanzaba de 400 a 500  $\Omega \cdot \text{cm}^2$  se cultivaron durante dos horas después de cambiar el medio DMEM que contenía FBS a 10% por un medio DMEM libre de calcio. Posteriormente, un medio DMEM que contenía calcio al que un oligosacárido que contenía 1-cestosa, o nistosa, se añadió a una concentración de 1% en peso, se añadió a la capa superior. A continuación, la TEER se midió cronológicamente cada media hora, y las células se cultivaron hasta 22 horas y a continuación se midió la TEER (grupo de 1-cestosa a 1%, grupo de nistosa a 1%, n = 3). Como grupo de control, se prepararon un grupo de células que se cultivaron solamente en un medio DMEM libre de calcio (grupo de control negativo, n = 3) y un grupo en el que el cultivo se realizó durante dos horas en un medio DMEM libre de calcio, y a continuación el medio se cambió solamente por un medio DMEM que contenía calcio (grupo de control positivo, n = 3), y se compararon los cambios cronológicos en TEER.

A continuación en la presente memoria, los resultados de la medición de la proporción de TEER en el ejemplo 1 se muestran en la figura 1. Aunque la recuperación de TEER apenas se observó en el grupo de control negativo, una recuperación significativa de TEER se observó en el grupo de 1-cestosa a 1%, el grupo de nistosa a 1% y el grupo de control positivo en comparación con el grupo de control negativo. Además, un efecto promotor de la recuperación significativo se observó en el grupo de 1-cestosa a 1% y el grupo de nistosa a 1% en comparación con el grupo de control positivo. Específicamente, el grupo de 1-cestosa a 1% 30 minutos después de cambiar un medio DMEM libre de calcio por un medio DMEM que contenía calcio mostraba un efecto promotor de la recuperación 2,4 veces mayor que el mostrado por el grupo de control positivo de promedio. Además, en comparación con el grupo de nistosa a 1%, el grupo de 1-cestosa a 1% mostraba una tendencia de promoción de la recuperación más potente. Estas observaciones confirmaron que 1-cestosa presentaba una potente acción promotora de la recuperación sobre la adhesión célula-célula epitelial disminuida.

[Ejemplo 2: Un experimento que confirma que el efecto de 1-cestosa sobre la promoción de la recuperación de adhesión célula-célula epitelial disminuida causada por deficiencia de calcio extracelular es dependiente de calcio]

En el ejemplo 2, se confirmó que el efecto de 1-cestosa sobre la promoción de la recuperación de adhesión célula-célula epitelial disminuida causada por deficiencia de calcio extracelular es dependiente de calcio mediante un experimento que usaba células cultivadas.

Se usó un oligosacárido que contenía 1-cestosa a la misma pureza que el usado en el ejemplo 1, y el cultivo celular se realizó en las mismas condiciones que en el ejemplo 1.

Las células Caco-2 que se cultivaron hasta que la TEER del Transwell alcanzaba de 400 a 500  $\Omega \text{ cm}^2$  se cultivaron durante dos horas después de cambiar el medio DMEM que contenía FBS a 10% por un medio DMEM libre de calcio. Posteriormente, un medio DMEM que contenía calcio al que se añadió un oligosacárido que contenía 1-cestosa a una concentración de 1% en peso se añadió a la capa superior. A continuación, la TEER se midió cronológicamente cada media hora, y las células se cultivaron hasta tres horas y a continuación se midió la TEER (grupo de cestosa a 1% calcio (+), n = 3). Además, se preparó un grupo en el que un oligosacárido que contenía 1-cestosa se añadió a una concentración de 1% en peso al medio DMEM libre de calcio, mientras que el medio no se cambiaba por un medio DMEM que contenía calcio, y el cultivo celular se realizó hasta tres horas y a continuación se midió la TEER (grupo de cestosa a 1% calcio (-), n = 3). Como grupo de control, se prepararon un grupo de células que se cultivaron solamente en un medio DMEM libre de calcio (grupo de control negativo, n = 3) y un grupo en el que el cultivo se realizó durante dos horas en un medio DMEM libre de calcio, y a continuación el medio se cambió solamente por un medio DMEM que contenía calcio (grupo de control positivo, n = 3), y se compararon los cambios cronológicos en TEER.

A continuación en la presente memoria, los resultados de la medición de la proporción de TEER en el ejemplo 2 se muestran en la figura 2. La recuperación de TEER apenas se observó en el grupo de control negativo y el grupo de cestosa a 1% calcio (-). Sin embargo, de forma similar al ejemplo 1, una recuperación significativa de TEER se observó en el grupo de cestosa a 1% calcio (+) y el grupo de control positivo, y de forma similar al ejemplo 1, un efecto significativo de promover la recuperación de TEER se observó en el grupo de cestosa a 1% calcio (+) también en comparación con el grupo de control positivo. Estas observaciones confirmaron que 1-cestosa no mostraba un efecto de recuperar TEER en ausencia de calcio extracelular, y un efecto promotor de la recuperación de 1-cestosa sobre adhesión célula-célula epitelial disminuida se producía de una manera dependiente de calcio extracelular.

[Ejemplo 3: Un experimento que confirma que el efecto de 1-cestosa sobre la promoción de la recuperación de adhesión célula-célula epitelial disminuida causada por deficiencia de calcio extracelular es dependiente de la concentración]

En el ejemplo 3, se confirmó que el efecto de 1-cestosa sobre la promoción de la recuperación de adhesión célula-célula epitelial disminuida causada por deficiencia de calcio extracelular es dependiente de la concentración mediante un experimento que usaba células cultivadas.

Se usó un oligosacárido que contenía 1-cestosa a la misma pureza que el usado en el ejemplo 1, y el cultivo celular se realizó en las mismas condiciones que en el ejemplo 1.

Las células Caco-2 que se cultivaron hasta que la TEER del Transwell alcanzaba de 400 a 500  $\Omega \cdot \text{cm}^2$  se cultivaron durante dos horas después de cambiar el medio DMEM que contenía FBS a 10% por un medio DMEM libre de calcio. Posteriormente, un medio DMEM que contenía calcio, al que se añadió un oligosacárido que contenía 1-cestosa a una concentración de 1% en peso o 0,1% en peso, se añadió a la capa superior. A continuación, la TEER se midió cronológicamente cada media hora, y las células se cultivaron hasta 3,5 horas y a continuación se midió la TEER (grupo de cestosa a 1%, grupo de cestosa a 0,1%, n = 3). Como grupo de control, se prepararon un grupo de células cultivadas solamente en un medio DMEM libre de calcio (grupo de control negativo, n = 3) y un grupo en el que el cultivo se realizó durante dos horas en un medio DMEM libre de calcio, y a continuación el medio se cambió solamente por un medio DMEM que contenía calcio (grupo de control positivo, n = 3), y se compararon los cambios cronológicos en TEER.

A continuación en la presente memoria, los resultados de la medición de la proporción de TEER en el ejemplo 3 se muestran en la figura 3. De forma similar al ejemplo 1, la recuperación de TEER apenas se observó en el grupo de control negativo. Sin embargo, una recuperación significativa de TEER se observó en el grupo de cestosa a 1%, el grupo de cestosa a 0,1% y el grupo de control positivo. Además, el grupo de cestosa a 1% mostraba una tendencia de promoción de la recuperación más potente de TEER que el grupo de cestosa a 0,1%. Estas observaciones confirmaron que un efecto promotor de la recuperación de 1-cestosa sobre adhesión célula-célula epitelial disminuida se producía de una manera dependiente de la concentración.

[Ejemplo 4: Un experimento que examina el efecto de administración anterior de 1-cestosa sobre la inhibición de una disminución de la adhesión célula-célula epitelial causada por deficiencia de calcio extracelular]

En el ejemplo 4, se examinó si una disminución de la adhesión célula-célula epitelial causada por deficiencia de calcio extracelular podía inhibirse o no mediante administración anterior de 1-cestosa mediante un experimento que usaba células cultivadas.

Se usó un oligosacárido que contenía 1-cestosa a la misma pureza que el usado en el ejemplo 1, y el cultivo celular se realizó en las mismas condiciones que en el ejemplo 1.

Las células Caco-2 se cultivaron hasta que la TEER del Transwell alcanzaba de 400 a 500  $\Omega \cdot \text{cm}^2$ . El medio DMEN que contenía FBS a 10% se cambió por un medio DMEM libre de calcio, y se añadió un oligosacárido que contenía 1-cestosa a una concentración de 1% en peso a la capa superior. El medio se cambió por un medio libre de calcio una hora o seis horas más tarde, y la TEER se midió cronológicamente tres veces, cada media hora (grupo de

5 cestosa a 1% calcio (+) de 1 hora, grupo de cestosa a 1% calcio (+) de 6 horas, n = 3). Como grupo de control, se prepararon un grupo en el que el cultivo se realizó durante una hora o seis horas en un medio DMEM que contenía calcio, y a continuación en un medio DMEM libre de calcio (grupo de control negativo calcio (+) de 1 hora, grupo de control negativo calcio (+) de 6 horas, n = 3) y un grupo de células que se cultivaron solamente en un medio DMEM que contenía calcio (grupo de control positivo, n = 3), y se compararon los cambios cronológicos en TEER.

10 A continuación en la presente memoria, los resultados de la medición de la proporción de TEER en el ejemplo 4 se muestran en las figuras 4 y 5. La figura 4 muestra los resultados de la comparación entre el grupo de cestosa a 1% calcio (+) de 1 hora, el grupo de control negativo calcio (+) de 1 hora y el grupo de control positivo. El grupo de cestosa a 1% calcio (+) de 1 hora mostraba un incremento significativo de TEER en comparación con el grupo de control negativo calcio (+) de 1 hora y el grupo de control positivo en la medición de TEER llevada a cabo justo antes de cambiar el medio por un medio DMEM libre de calcio. Además, en un estado en el que el medio se cambió por un medio DMEM libre de calcio y se eliminó 1-cestosa, existía una tendencia de que una disminución de la TEER en el grupo de cestosa a 1% calcio (+) de 1 hora se inhibía en comparación con el grupo de control negativo calcio (+) de 1 hora.

15 A continuación, la figura 5 muestra los resultados de la comparación entre el grupo de cestosa a 1% calcio (+) de 6 horas, el grupo de control negativo calcio (+) de 6 horas y el grupo de control positivo. De forma similar a la figura 4, el grupo de cestosa a 1% calcio (+) de 6 horas mostraba un incremento significativo de TEER en comparación con el grupo de control negativo calcio (+) de 6 horas y el grupo de control positivo en la medición de TEER llevada a cabo justo antes de cambiar el medio por un medio DMEM libre de calcio. Análogamente, en un estado en el que el medio se cambió por un medio DMEM libre de calcio y un oligosacárido que contenía 1-cestosa se eliminó, existía una tendencia de que una disminución de la TEER en el grupo de cestosa a 1% calcio (+) de 6 horas se inhibía en comparación con el grupo de control negativo calcio (+) de 6 horas.

25 Las observaciones anteriores confirmaron que la administración anterior de 1-cestosa tenía una acción preventiva sobre una disminución de la adhesión célula-célula epitelial, y 1-cestosa mostraba una acción de promover la adhesión célula-célula epitelial en su presencia.

[Ejemplo 5: Un experimento que confirma el efecto inhibitorio sobre la penetración de una sustancia contra permeabilidad incrementada de la membrana celular causada por deficiencia de calcio extracelular]

30 En el ejemplo 5, el efecto inhibitorio de 1-cestosa sobre la penetración de una sustancia contra permeabilidad incrementada de la membrana celular causada por deficiencia de calcio extracelular se confirmó mediante un experimento que usaba células cultivadas, incluyendo una comparación con otros fructooligosacáridos.

Se usó un oligosacárido que contenía 1-cestosa a la misma pureza que el usado en el ejemplo 1, y el cultivo celular se realizó en las mismas condiciones que en el ejemplo 1.

35 Las células Caco-2 que se cultivaron hasta que la TEER del Transwell alcanzaba de 400 a 500  $\Omega \cdot \text{cm}^2$  se cultivaron durante dos horas después de cambiar el medio DMEM que contenía FBS a 10% por un medio HBSS incoloro libre de calcio (GIBCO). Posteriormente, un medio HBSS incoloro que contenía calcio (GIBCO) al que se le añadió un oligosacárido que contenía 1-cestosa, sacarosa o nistosa a una concentración de 1% en peso, se añadió a la capa superior. Al mismo tiempo, Amarillo Lucifer (MP Biomedical LLC.) se añadió a la capa superior a una concentración de 100  $\mu\text{M}$  como sustancia que pasa entre las células. Después de cultivar durante horas, el medio HBSS en la capa inferior se recogió, y la concentración residual de amarillo Lucifer que había penetrado desde la capa superior a la capa inferior se midió (grupo de cestosa a 1%, grupo de sacarosa a 1% y grupo de nistosa a 1%, n = 3). Como grupo de control, se prepararon un grupo de células cultivadas solamente en un medio HBSS libre de calcio (grupo de control negativo, n = 3) y un grupo en el que el cultivo se realizó durante dos horas en un medio HBSS libre de calcio, y a continuación el medio se cambió solamente por un medio HBSS que contenía calcio (grupo de control positivo, n = 3), y se compararon las cantidades de sustancias que pasaban entre las células.

45 A continuación en la presente memoria, los resultados de la medición de la concentración residual de amarillo Lucifer en la capa inferior en el ejemplo 5 se muestran en la figura 6. En comparación con el grupo de control negativo, una reducción significativa de la concentración residual se observó en el grupo de cestosa a 1%, el grupo de nistosa a 1% y el grupo de control positivo. Además, en comparación con el grupo de control positivo, existía una tendencia a que el grupo de cestosa a 1% y el grupo de nistosa a 1% muestre concentraciones residuales reducidas, y exista una tendencia a que el grupo de cestosa a 1% muestre la concentración residual más baja.

50 Las observaciones anteriores confirmaron que la 1-cestosa tenía un efecto inhibitorio sobre la permeabilidad de una proteína alérgica y similares promoviendo la adhesión célula-célula epitelial.

[Ejemplo 6: Un experimento que confirma el efecto sobre la inhibición de una disminución de la adhesión célula-célula epitelial causada por la citocina inflamatoria IL-1 $\beta$ ]

55 En el ejemplo 6, el efecto de 1-cestosa sobre la inhibición de una disminución de la adhesión célula-célula epitelial causada por una citocina inflamatoria se confirmó mediante un experimento que usaba células cultivadas.

Se usó un oligosacárido que contenía 1-cestosa a la misma pureza que el usado en el ejemplo 1, y el cultivo celular se realizó en las mismas condiciones que en el ejemplo 1.

5 A la capa superior de un medio DMEM en el que las células Caco-2 se cultivaron hasta que la TEER del Transwell alcanzaba de 400 a 500  $\Omega \cdot \text{cm}^2$ , se añadió un oligosacárido que contenía 1-cestosa a una concentración de 1% en peso. Después de cultivar durante 24 horas, la citocina inflamatoria IL-1 $\beta$  se añadió a la capa inferior a una concentración de 10 ng/ml. La TEER se midió 48 horas más tarde y se calculó una proporción del valor medido de este modo con el valor medido inicial de TEER (grupo de cestosa a 1% (+), IL-1 $\beta$  (+), n = 3). Como grupo de control, se prepararon un grupo en el que solamente se añadió IL-1 $\beta$  (grupo de cestosa a 1% (-), IL-1 $\beta$  (+), n = 3) o un grupo en el que no se añadió oligosacárido que contenía 1-cestosa ni IL-1 $\beta$  (grupo de cestosa a 1% (-), IL-1 $\beta$  (-), n = 3) y las proporciones de TEER se compararon.

10 A continuación en la presente memoria, en la figura 7 se muestran los resultados de la medición de la proporción de TEER en el ejemplo 6. El grupo de cestosa a 1% (-), IL-1 $\beta$  (-) mostraba una proporción de TEER promedio de 0,914 con una desviación típica de 0,031, mientras que el grupo de cestosa a 1% (-), IL-1 $\beta$  (+) mostraba una proporción de TEER promedio de 0,585 con una desviación típica de 0,002 y el grupo de cestosa a 1% (+), IL-1 $\beta$  (+) mostraba una proporción de TEER promedio de 0,849 con una desviación típica de 0,0003. Estos resultados mostraban que una disminución de TEER, que es causada por IL-1 $\beta$ , era inhibida en aproximadamente 26% mediante la adición del oligosacárido que contiene 1-cestosa. Estas observaciones confirmaron que la 1-cestosa tenía un efecto de inhibir una disminución de la adhesión célula-célula epitelial causada por reacción inflamatoria tóxica.

15 La presente invención repara, o promueve la formación de, la proteína de la unión intercelular hermética entre células epiteliales, que se supone que es una causa de enfermedades alérgicas, contribuyendo de este modo a la mejora, tratamiento y prevención de enfermedades alérgicas.

**REIVINDICACIONES**

- 5 1. 1-cestosa y/o nistosa y un catión metálico divalente para su uso en la mejora, tratamiento o prevención de enfermedades alérgicas, en el que la 1-cestosa y/o nistosa y el catión metálico divalente actúan como un potenciador de la adhesión célula-célula para la activación de células epiteliales, y en el que el catión metálico divalente es un ion de calcio.
2. 1-cestosa y/o nistosa y un catión metálico divalente para su uso de acuerdo con la reivindicación 1, en el que la 1-cestosa y/o nistosa es 1-cestosa.
- 10 3. 1-cestosa y/o nistosa y un catión metálico divalente para su uso de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 o 2, en el que la 1-cestosa es un oligosacárido que contiene 1-cestosa a una pureza de 95% en peso o más, y el catión metálico divalente está presente en una parte en peso o más por 10 partes en peso del oligosacárido que contiene 1-cestosa.
4. 1-cestosa y/o nistosa y un catión metálico divalente para su uso de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en el que la célula epitelial es una célula epitelial intestinal.
- 15 5. 1-cestosa y/o nistosa y un catión metálico divalente para su uso de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, en el que la 1-cestosa y/o nistosa y un catión metálico divalente se administran por vía oral o por vía parenteral.

Fig. 1

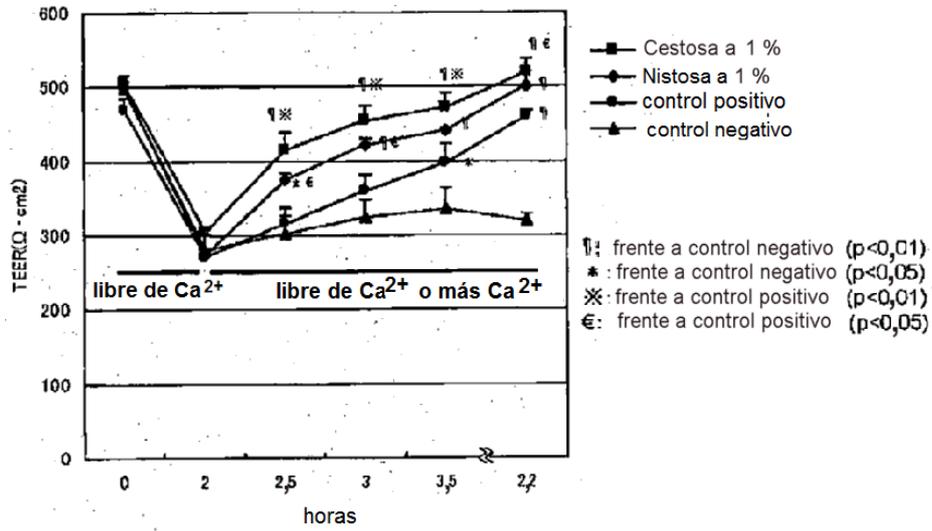


Fig. 2

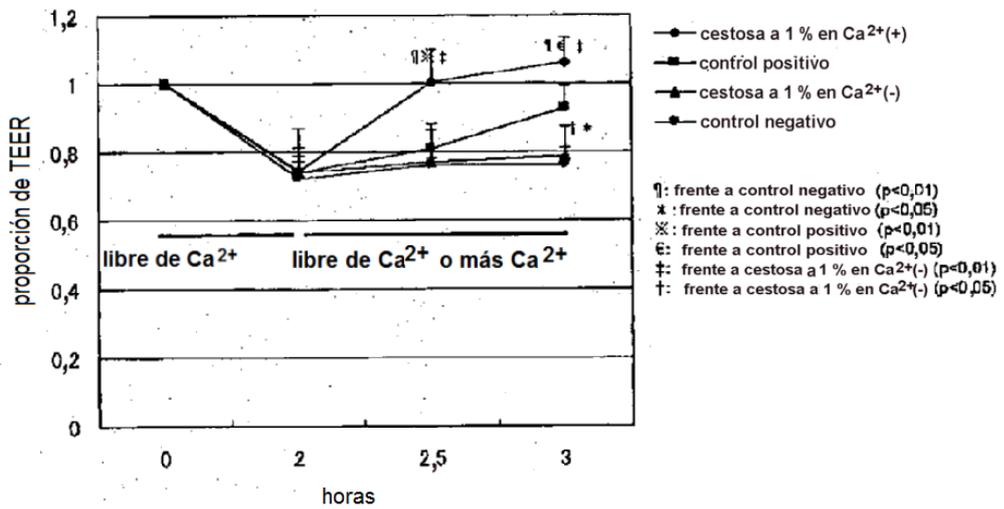


Fig. 3

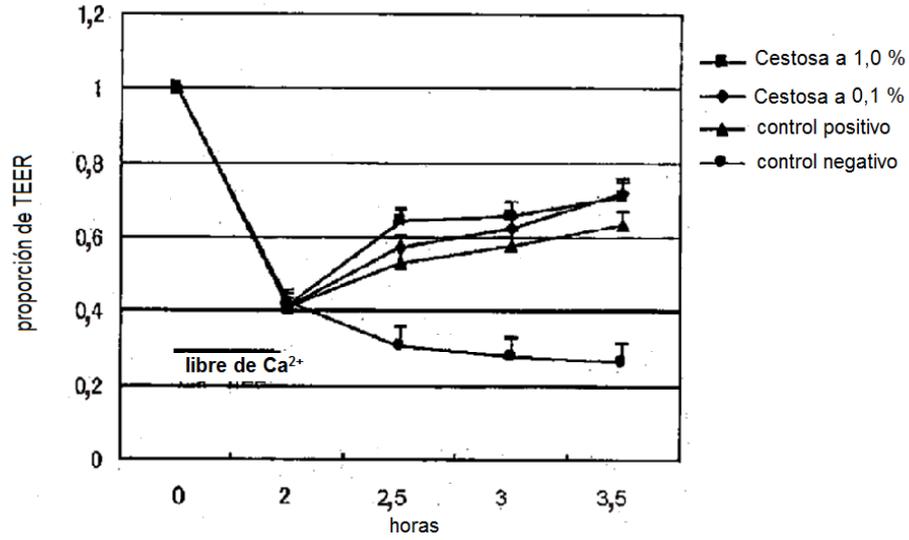


Fig. 4

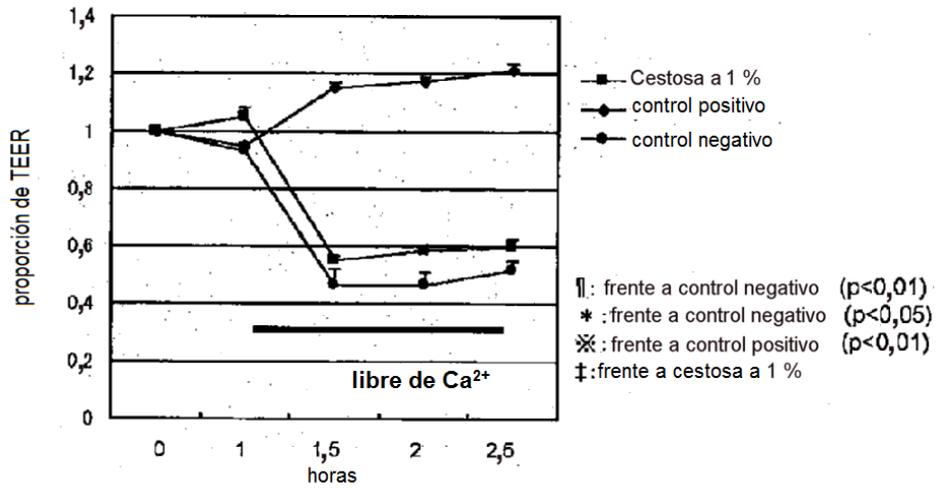


Fig. 5

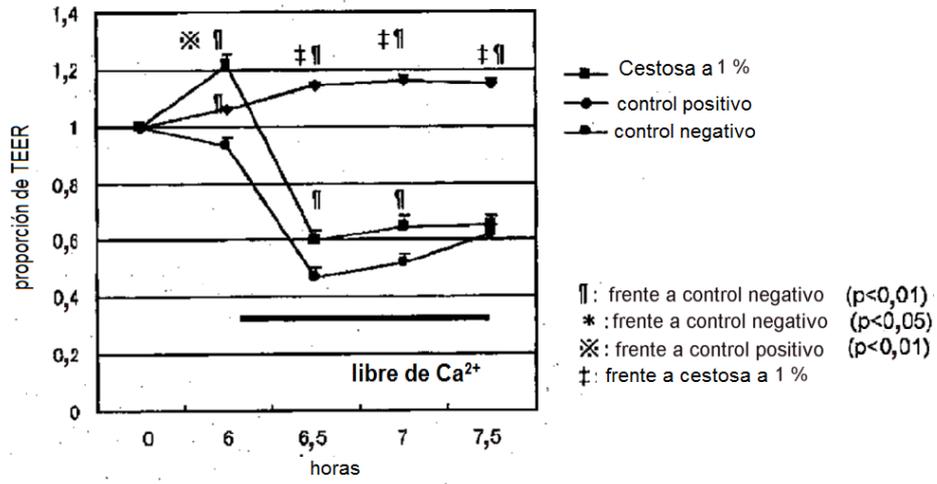


Fig. 6

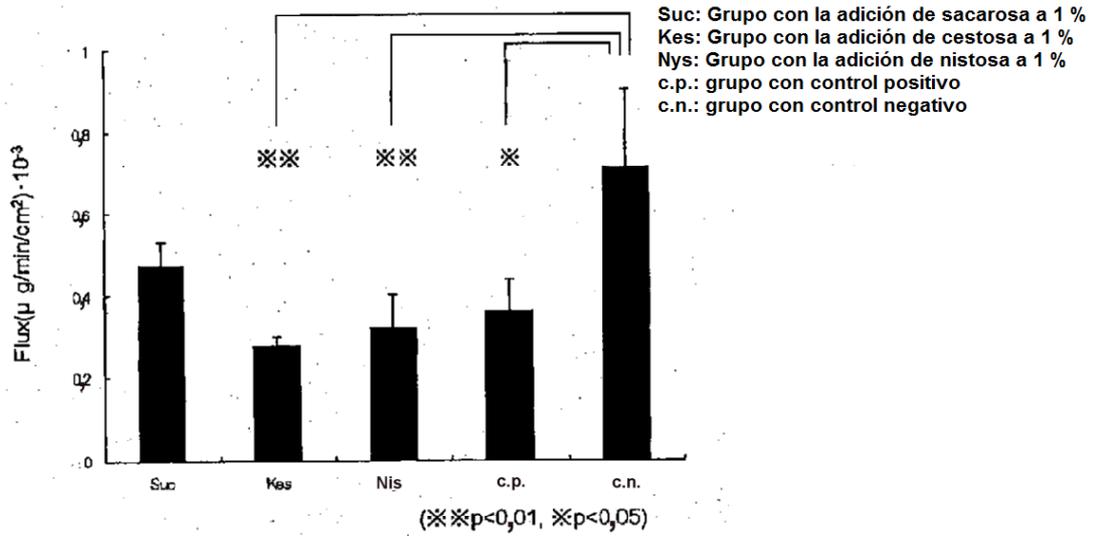


Fig. 7

