

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 746 258**

51 Int. Cl.:

A61K 38/04 (2006.01)

A61K 38/57 (2006.01)

A61P 3/04 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **18.03.2015 PCT/IL2015/050283**

87 Fecha y número de publicación internacional: **24.09.2015 WO15140798**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **18.03.2015 E 15731729 (8)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **07.08.2019 EP 3119414**

54 Título: **Ostreolisina para su uso en el tratamiento de sobrepeso y obesidad**

30 Prioridad:

19.03.2014 US 201461955338 P

20.03.2014 US 201461955874 P

20.11.2014 US 201462082308 P

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
05.03.2020

73 Titular/es:

**YISSUM RESEARCH DEVELOPMENT COMPANY
OF THE HEBREW UNIVERSITY OF JERUSALEM
LTD. (100.0%)
P.O. Box 39135
9139002 Jerusalem, IL**

72 Inventor/es:

**SCHWARTZ, BETTY;
YEHUDA-SHNAIDMAN, EINAV y
NIMRI, LILI**

74 Agente/Representante:

GARCÍA GONZÁLEZ, Sergio

ES 2 746 258 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

Ostreolisina para su uso en el tratamiento de sobrepeso y obesidad

5 **Campo de la invención**

La invención está dirigida a un extracto o extracto de hongo que comprende oly (ostreolisina) para su uso en el tratamiento o prevención de la obesidad.

10 **Antecedentes de la invención**

La obesidad está en proporciones epidémicas con más de 300 millones de personas obesas en todo el mundo y en constante aumento. La obesidad no es solo un problema cosmético, sino una enfermedad potencialmente mortal, que reduce la calidad de vida y su longevidad. La obesidad aumenta el riesgo de muchas enfermedades terribles, incluida la diabetes de tipo 2, enfermedades cardiovasculares y cáncer, y se asocia con resistencia a la insulina, intolerancia a la glucosa y dislipidemia. Por lo tanto, existe una necesidad importante de comprender los mecanismos relacionados con la obesidad y encontrar formas de combatir la enfermedad mortal y sus complicaciones.

20 Como perspectiva de tratamiento, encontrar una cura adecuada para la obesidad y las complicaciones relacionadas es extremadamente difícil debido a la complejidad fisiológica y bioquímica de la enfermedad. Sin embargo, está claro que el cambio de la homeostasis energética en favor del gasto de energía frente a la ingesta de energía ayudará a combatir la obesidad. Por lo tanto, la identificación de mecanismos celulares capaces de aumentar el gasto energético de todo el cuerpo ("balance energético negativo") es ventajosa como dianas para el tratamiento de la

25 obesidad.

Una opción para aumentar el gasto de energía es el desacoplamiento de la respiración mitocondrial en el tejido adiposo marrón (TAM). En este procedimiento, hay una fuga de protones regulada en la membrana mitocondrial interna a través de la proteína de desacoplamiento 1 (UCP1), lo que da como resultado la disipación de energía en forma de calor y aumenta la oxidación del combustible. Esto sugiere que serían beneficiosas altas cantidades de TAM activo en la batalla contra la obesidad. Desafortunadamente, sin embargo, no se considera que los adultos humanos tengan cantidades suficientes de BAT, a diferencia de los mamíferos pequeños y los seres humanos recién nacidos. Por lo tanto, encontrar maneras de aumentar la actividad del TAM en la edad adulta sería beneficioso para combatir la obesidad al aumentar la oxidación de nutrientes en el cuerpo.

35 El reciente descubrimiento de TAM en adultos humanos y una mejor comprensión del desarrollo de TAM han alentado la búsqueda de nuevas alternativas para tratar la obesidad ya que las personas obesas parecen tener menos masa/actividad de tejido adiposo marrón que sus homólogas magras. Es de destacar que la actividad de TAM es aproximadamente cuatro veces mayor en el grupo magro que en el grupo con sobrepeso/obesidad.

40 Desde un punto de vista anatómico, las células grasas marrones se localizan en dos tipos de depósitos: discreto y difuso. En seres humanos, el TAM de localización discreta se encuentra en las regiones cervical-supraclavicular, perirrenal/suprarrenal y paravertebral alrededor de los vasos principales y probablemente esté presente para generar y distribuir calor para mantener la temperatura base. A diferencia, existen células grasas marrones difusas en

45 adiposo blanco y aparecen en respuesta a la exposición al frío o la estimulación crónica por catecolaminas.

El síndrome metabólico, que comprende un grupo de anomalías metabólicas como la hiperlipidemia, diabetes mellitus e hipertensión, es una enfermedad generalizada y cada vez más frecuente en los países occidentales e industrializados.

50 **Sumario de la invención**

En el presente documento, se divulga un procedimiento para tratar, prevenir o reducir la gravedad de una o más afecciones o complicaciones asociadas con el síndrome metabólico en un sujeto que lo necesite, que comprende:

55 administrar una composición que comprende una cantidad eficaz de oly, variante de oly funcionalmente relacionada o una combinación de las mismas para el sujeto que lo necesita.

Por consiguiente, la presente invención proporciona un extracto o extracto de hongo que comprende oly para su uso en el tratamiento o prevención del sobrepeso u obesidad.

60 En una realización, el extracto está formulado como una formulación nutracéutica, un aditivo alimentario o un complemento alimenticio.

65 En una realización, el tratamiento de la obesidad o el sobrepeso se asocia con la diferenciación del adipocito blanco en adipocito marrón en una célula o la inducción de adipogénesis marrón en una célula. En una realización, se incrementa la expresión génica de los marcadores de adipogénesis marrón.

En una realización, el extracto de hongo procede de un hongo *Pleurotus*. El hongo *Pleurotus* puede ser el hongo *Pleurotus ostreatus* o el hongo *Pleurotus pulmonarius*.

- 5 En una realización, el extracto está en una formulación en forma de polvo, solución, suspensión, emulsión, comprimido o cápsula, un comprimido recubierto entérico, gel, crema, pomada, espuma, pasta o inyección. En una realización, la formulación es una composición nutracéutica o un suplemento dietético y comprende un vehículo apto para el consumo de alimentos. En otra realización, la formulación que comprende el extracto es una composición farmacéutica y comprende un vehículo farmacéuticamente aceptable.

10

Breve descripción de las figuras

15 La Figura 1 presenta una imagen de SDS-PAGE. La pureza del oly liofilizada se determinó mediante SDS-PAGE (15%) en presencia de un agente reductor. Los respectivos 40 a 5 µl corresponden a 10, 5, 3,75, 2,5 y 1,25 µg/carril.

La Figura 2 presenta la cromatografía de filtración en gel de oly sobre una columna analítica Superdex 75, desarrollada en condiciones no desnaturizantes con Tris-HCl + 300 mM correspondiente al tamaño molecular esperado de un monómero.

20 La Figura 3 es un gráfico que presenta la viabilidad celular de las líneas celulares HCT116 y FHS 74 Int. Se añadió Oly (62,5 µg/ml) durante 24 horas y se realizó un ensayo de MTT.

Figura 4 Análisis de transferencia Western de oly usando el anticuerpo policlonal de nuevo diseño. Las proteínas extraídas de los cuerpos fructíferos de *P. ostreatus* (50 µg, cuerpos fructíferos (FB por sus siglas en inglés)) y la proteína oly recombinante (2-4 µg) se cargaron en SDS-PAGE y se transfirieron a la membrana de nitrocelulosa. Se utilizó el anticuerpo policlonal de nuevo diseño contra oly (dilución 1:2.500).

25 Las Figuras 5A y 5B son imágenes microscópicas que demuestran la acumulación de gotitas de lípidos en las células HIB-1B y 3T3-L1. En particular, la figura 5A proporciona imágenes microscópicas de luz representativas de la acumulación de lípidos inducida por oly en células HIB-1B (10 µg/ml, 48 horas), en donde las imágenes superiores representan las células de control mientras que las imágenes inferiores representan las células tratadas con oly. Además, las imágenes del lado izquierdo representan el aumento X20 y las imágenes del lado derecho son para el aumento X 40. La Figura 5B proporciona imágenes microscópicas confocales representativas de células HIB-1B y 3T3-L1, tratadas (oly-10 µg/ml, 48 horas) o no (control) y teñidas con rojo Nilo, un tinte detector de lípidos.

30 Las Figuras 6A y 6B son gráficos que presentan los efectos de oly (oly, 10 µg/ml, 48 horas) sobre la expresión génica de marcadores de adipogénesis (6A) y marcadores de adipogénesis marrón específicos (6B). La expresión génica se midió por PCR en tiempo real y se normalizó a beta-actina.

35 La Figura 7 es un gráfico que presenta el aumento inducido por oly en la expresión génica de caveolina-1. La expresión génica se midió por PCR en tiempo real y se normalizó a beta-actina. El tratamiento con Oly fue de 10 µg/ml, 48 horas.

40 La figura 8 es un gráfico que representa el aumento de peso de los ratones sometidos a las diferentes condiciones dietéticas (dieta alta en grasa (HFD por sus siglas en inglés) y dieta baja en grasa (LFD, por sus siglas en inglés)) y diferentes tratamientos con oly. La IPGTT (por sus sigls en inglés) se realizó en la semana 16. La Figura 9 es un gráfico que representa el peso en el día del sacrificio de los ratones expuestos a las diferentes condiciones dietéticas y tratamientos con oly. * P< 0,05 de HFD.

45 Las Figuras 10A y 10B son gráficos que representan los resultados de la prueba de tolerancia a la glucosa intraperitoneal (IPGTT). (10A) Cambios en el nivel de glucosa en sangre de cuatro grupos experimentales. (10B) Áreas bajo la curva (ABC).

La figura 11 es un gráfico que representa el consumo de alimentos del ratón.

La Figura 12 es un gráfico que representa el peso del tejido adiposo epididimario el día del sacrificio * P <0,001 de HFD.

50 Las Figuras 13A-D son gráficos que representan la expresión de UCP-1 (13A), Cidea (13B), PRDM16 (13C), perilipina A en relación con B-actina (13D); La Figura 13E es un gráfico que representa la expresión de TNF-α en relación con la expresión de β-actina en el tejido adiposo visceral.

La Figura 14 es un gráfico que representa los pesos del hígado en el día del sacrificio (P <0,05 del grupo de HFD).

55 La Figura 15 es un gráfico que representa los niveles de GOT en el día del sacrificio (P <0,05 del grupo de HFD).

La Figura 16 es un gráfico que representa los niveles de GPT en el día del sacrificio (P <0,05 del grupo de HFD).

La Figura 17 es un gráfico que representa los niveles de triglicéridos en el día del sacrificio (P <0,05 del grupo de HFD).

60 La Figura 18 es un gráfico que representa los niveles de colesterol en el día del sacrificio (P <0,05 del grupo de HFD).

Las Figuras 19A-D son imágenes que presentan los resultados histológicos de los hígados de los ratones el día del sacrificio; Control LF (19A), Control LF + oly (19B), HF (19C) y HF + oly (19D).

La Figura 20 es un gráfico que representa la evaluación de la apoptosis (BAX/BCL2) en los hígados de los ratones el día del sacrificio (P <0,05).

65 Las Figuras 21A-F muestran la actividad citotóxica de Ostreolisina (oly) hacia las células HCT 116 (21A, C y E) y las células HM7 clon n.º 1 y clon n.º 15 (21B, D y F). Las células se cultivaron durante la noche en medio Eagle

modificado por Dulbecco y se trataron con diversas concentraciones de Ostreolisina, como se indica en la Sección de Ejemplos durante 4 (21A y B), 8 (21C y D), 24 (21E y F) horas. La viabilidad celular se midió mediante el ensayo de MTT. La viabilidad (%) se expresó como la relación entre la absorbancia de formazán a 550 nm de las células tratadas a diferentes intervalos de tiempo y las células de control al comienzo del experimento. Cada punto representa la media \pm DE de cuatro experimentos independientes realizados en $n = 4$ repeticiones. Las barras de error no se distinguen ya que son más pequeñas que el tamaño del símbolo.

La Figura 22A y la Figura 22B muestran el análisis de clasificación celular activado por fluorescencia de la línea celular HCT116. En particular, la Figura 22A presenta células tratadas con Oly 125 $\mu\text{g/ml}$ o FBE al 0,01% (p/v), o se dejaron sin tratar como control durante 8 horas. Después de la incubación, las células se cosecharon, se permeabilizaron, se tiñeron con Yoduro de propidio y se analizaron. Los resultados son representativos de uno de cada dos experimentos independientes, cada uno realizado por triplicado. Los datos se obtuvieron de 15.000 células HCT116. Como se presenta en la figura 22B, el ciclo celular se analizó usando el software WinMDI 2.9 de la línea celular HCT116 tratada con Oly 125 $\mu\text{g/ml}$, FBE al 0,01% (p/v) o se dejó sin tratar como control y finalmente se permeabilizaron y se tiñeron como se describe anteriormente. Todas las fases celulares se representan como porcentaje. Los datos mostrados son la media \pm DE de dos experimentos independientes, cada uno realizado por triplicado. Los datos se obtuvieron de 15.000 células HCT116.

Las Figuras 23A-C representan el efecto de Oly recombinante sobre la escisión del nivel de expresión de PARP-1 y BAX en células HCT116. Las células se incubaron durante 8 horas en presencia o ausencia de Oly o FBE (extracto de cuerpos fructíferos). Los lisados celulares totales (para las proteínas PARP-1 y BAX) se procesaron para el análisis de transferencia Western como se describe en los procedimientos. Figura 23A: Los datos mostrados son representativos de uno de cada tres experimentos independientes, cada uno realizado por duplicado. Figura 23B: Los datos mostrados son representativos de uno de cada cuatro experimentos independientes, cada uno realizado por duplicado. La carga igual se confirmó probando cada transferencia para β -actina. Figura 23C: La cuantificación por análisis densitométrico se realizó utilizando el software analizador Gelpro32. Los resultados se expresan como media \pm DE ($n = 4$) y el análisis estadístico indicó una mayor expresión de BAX en células HCT116 tratadas con Oly frente a células no tratadas con un valor de $P < 0,05$ (prueba t de Student).

La Figura 24 demuestra que Ostreolisina penetra en la membrana celular y entra al citosol. Inmunofluorescencia representativa de células HCT116 tratadas durante 8 horas, en condiciones no tratadas (control), células tratadas con Oly a una concentración de 125 $\mu\text{g/ml}$, células tratadas con FBE a una concentración de 0,01% (p/v) que muestra la presencia de Ostreolisina dentro de las células, reconocida por el anticuerpo anti-Oly. Barra de escala de 20 μm .

La Figura 25 demuestra que Ostreolisina induce la reorganización de Caveolina-1 en balsas lipídicas. Inmunofluorescencia representativa de células HCT116 tratadas durante 8 h en condiciones no tratadas (control), células tratadas con Oly a una concentración de 125 $\mu\text{g/ml}$, células tratadas con FBE a una concentración de 0,01% (p/v) que muestra la agrupación de Cav -1 sobre la membrana, reconocida por el anticuerpo anti-Cav-1. Barra de escala de 20 μm . Como se puede ver, Oly recombinante aumenta la expresión del marcador de balsas lipídicas Flot-1 en células HCT116.

La Figura 26 demuestra que Ostreolisina no potencia la expresión de Flotilina-1 en balsas lipídicas. Por lo tanto, Oly es específica para la proteína de balsa Cav-1. Inmunofluorescencia representativa de células HCT116 tratadas durante 4 h en condiciones no tratadas, células tratadas con Oly a una concentración de 125 $\mu\text{g/ml}$ y células tratadas con FBE a una concentración de 0,01% (p/v) que muestra la expresión aumentada de Flot-1 en la membrana, reconocida por el anticuerpo anti-Flot-1. Barra de escala de 20 μm .

La Figura 27 representa el efecto de Oly sobre células de cáncer de colon derivadas de MC38 implantadas en ratones C57B1. Las células se inyectaron por vía subcutánea (2×10^5 células por ratón) en la cadera izquierda. Después de 10 días de inyección y después de la aparición de signos tumorales en algunos ratones, los ratones fueron tratados con 1 mg/kg de Oly, (3 veces a la semana por vía intraperitoneal). Los ratones de control recibieron PBS tres veces por semana por vía intraperitoneal. Cada barra representa el error estándar de la media. $N=8$ ratones; los ratones se sacrificaron en el día 39. $* = P < 0,001$.

La Figura 28 representa el efecto de Oly sobre células de cáncer de colon derivadas de MC38 implantadas en ratones C57B1. Los tumores se extirparon después del sacrificio y se pesaron. $N = 8$; $* = P < 0,001$.

La Figura 29 es una imagen de transferencia Western que muestra la concentración de oly en preparaciones de extracto de *Pleurotus ostreatus* después de congelar en nitrógeno líquido (Procedimiento 1, carriles 1 y 3) y *Pleurotus ostreatus* en polvo después de congelar a -20 °C. Procedimiento 2, carriles 2 y 4).

Las Figuras 30A-D muestran control (30A), 10 $\mu\text{g/ml}$ de oly (30B) y preparaciones de extracto de *Pleurotus ostreatus* después de congelar en nitrógeno líquido (30C), y *Pleurotus ostreatus* en polvo después de congelar en -20 °C (30D).

Descripción detallada de la invención

La presente invención proporciona un extracto o extracto de hongo que comprende oly para su uso en el tratamiento o prevención del sobrepeso u obesidad. En algunas realizaciones de la invención, el extracto de hongo es un extracto del hongo *Pleurotus*. En algunas realizaciones de la invención, el hongo *Pleurotus* procede del hongo *Pleurotus ostreatus*. En algunas realizaciones de la invención, el hongo *Pleurotus* procede del hongo *Pleurotus pulmonarius*. Cabe señalar que a lo largo de la solicitud, a menos que se mencione específicamente lo contrario, el término "tratar" pretende incluir "prevenir", "reducir los efectos/gravedad de la afección" "ralentizar la progresión de la

afección", reducir/eliminar al menos un efecto secundario no deseado de la afección " y similares. El término "prevenir" significa que los compuestos para su uso en la presente invención son útiles cuando se administran a un paciente que no ha sido diagnosticado como que posiblemente tenga la enfermedad en el momento de la administración, pero que se puede esperar que desarrolle la enfermedad o esté en mayor riesgo de enfermedad. El extracto que comprende oly o una composición que comprende un extracto que comprende oly para su uso en la invención retardará el desarrollo de síntomas de la enfermedad, retrasará la aparición de la enfermedad o evitará que el individuo desarrolle la enfermedad. La prevención también incluye la administración de los compuestos de la invención a aquellos individuos que se cree que están predispuestos a la enfermedad debido a la edad, antecedentes familiares, anomalías genéticas o cromosómicas, y/o debido a la presencia de uno o más marcadores biológicos para la enfermedad, tal como una mutación genética conocida.

Como se divulga en el presente documento, el uso de oly o un extracto que comprende oly puede prevenir, retrasar o mejorar diversas enfermedades o trastornos metabólicos (p. ej., obesidad, síndrome metabólico, resistencia a la insulina, diabetes, (incluida la diabetes tipo 2) y la dislipidemia) y sus complicaciones clínicas tales como el infarto agudo de miocardio ("ataque cardíaco") y la estenosis aórtica y otras complicaciones cardiovasculares tales como, pero sin limitación, aterosclerosis; enfermedad renal crónica (particularmente en vista del impacto de la diabetes en la vasculatura renal); calcificación arterial; calcificación valvular, que incluye pero sin limitación, calcificación aórtica o mitral; estenosis valvular, que incluye pero no sin limitación, estenosis valvular aórtica o mitral; infarto agudo de miocardio; reestenosis después de la intervención coronaria; daño tisular acelerado o cicatrización tardía después de la intervención coronaria, incluyendo, pero sin limitación: implantación de válvula (incluida la implantación de válvula bioprotésica); implantación de endoprótesis vascular; implantación de tejidos modificados, aloinjerto, homoinjerto (incluido, pero sin limitación, procedimiento de Ross), tejidos de bioprótesis, injertos de dacrón o cualquier conducto sintético o bioprotésico; trasplante de corazón; implantación de injerto arterial o venoso (incluidos, pero sin limitación, injertos de derivación de vena safena y derivaciones AV de hemodiálisis); accidente cerebrovascular; e insuficiencia cardíaca; fallo de injertos de vena para cirugía de derivación coronaria; nefropatía diabética; vasculitis; retinopatía; disfunción eréctil; y complicaciones no cardiovasculares tales como, pero sin limitación, pancreatitis; hepatopatía grasa no alcohólica; neuroinflamación; deterioro cognitivo; cáncer.

Al tratar o prevenir las enfermedades o afecciones descritas en la solicitud, los extractos se administran en una cantidad terapéuticamente eficaz. La cantidad terapéuticamente eficaz variará dependiendo del compuesto particular usado y la vía de administración, como saben los expertos en la materia.

Además, la cantidad de una composición a administrar dependerá, por supuesto, del sujeto a tratar, la gravedad de la afección, la forma de administración, el juicio del médico que prescribe y todos los demás factores relevantes. La determinación de la dosis exacta a administrar se realiza mediante procedimientos conocidos por un experto en la materia.

En algunas realizaciones de la invención, la cantidad de oly del mismo en un solo tratamiento se calcula entre 0,10-10 mg/kg de peso corporal (PC) por día. En algunas realizaciones de la invención, se usa una cantidad de oly entre aproximadamente 0,3-1,0 mg/kg por día. En algunas realizaciones, se usa una cantidad de entre aproximadamente 0,5-0,8 mg/kg por día.

En el caso de un extracto o un extracto de hongo que contenga oly, la cantidad del extracto seco a administrar puede calcularse de acuerdo con la cantidad de contenido de oly en el mismo. En algunas realizaciones, se usan entre aproximadamente 20-200 mg de *Pleurotus* o *Pleurotus ostreatus* en polvo liofilizado/Kg de peso corporal (PC) por día. En algunas realizaciones, se usa entre aproximadamente 20-60 mg de *Pleurotus ostreatus* en polvo liofilizado/Kg de PC por día. En algunas realizaciones, se usa entre aproximadamente 40-50 mg de *Pleurotus ostreatus* en polvo liofilizado/Kg de PC por día.

Por lo general, se contempla que el tratamiento con un extracto que contenga oly o un extracto de hongo que comprenda oly se administrará al menos una vez al día, generalmente una vez, dos veces, tres veces o cuatro veces al día con las dosis administradas a intervalos iguales durante el día y la noche con el fin de mantener una presencia constante del fármaco con el fin de inducir un efecto suficiente. Sin embargo, el experto en la materia sabrá que un programa de tratamiento puede optimizarse para cualquier paciente dado, y que la administración del compuesto puede ocurrir con menos frecuencia que una vez al día.

El tratamiento puede llevarse a cabo durante el tiempo que sea necesario. Por lo general, se contempla que el tratamiento se continuaría indefinidamente mientras persista el estado de la enfermedad, aunque la interrupción podría estar indicada si los compuestos ya no producen un efecto beneficioso. El médico a cargo del tratamiento sabrá cómo aumentar, disminuir o interrumpir el tratamiento según la respuesta del paciente.

En algunas realizaciones de la invención, el extracto o el extracto de hongo comprende oly en una concentración de al menos 0,001 mg/g de extracto en polvo. En algunas realizaciones de la invención, el extracto o el extracto de hongo comprende oly en una concentración de al menos 0,005 mg/g de extracto en polvo. En algunas realizaciones de la invención, el extracto o el extracto de hongo comprende oly en una concentración de al menos 0,01 mg/g de extracto en polvo. En algunas realizaciones de la invención, el extracto o el extracto de hongo comprende oly en una

concentración de al menos 0,02, 0,03, 0,04, 0,05, 0,06, 0,07, 0,08, 0,09, 0,1 mg/g de extracto en polvo o más.

Se entiende además que la oly utilizada puede formularse o administrarse junto con principios activos adicionales según se requiera para tratar la afección del paciente.

5 Ostreolisina (Oly) es una proteína que se encuentra en el hongo *Pleurotus ostreatus* (también conocido como hongo ostra y hongo Yarden) y en *Pleurotus pulmonarius*. Oly es una proteína citolítica de 15 kDa expresada durante la formación de cuerpos fructíferos que puede interactuar con dominios enriquecidos con colesterol.

10 La presente invención se basa en los sorprendentes efectos de oly y extractos que comprenden oly sobre modelos *in vivo* e *in vitro* y diversos parámetros relacionados con el síndrome metabólico y/o el hígado graso, obesidad, sobrepeso, cáncer y diabetes, así como el nivel de GOT, GPT, triglicéridos y colesterol.

15 Como se ve claramente en la sección de Ejemplos, las bajas cantidades de oly recombinante, así como los extractos que comprenden oly, mostraron un efecto significativo sobre la acumulación de gotitas de lípidos en las células (Figura 5), la expresión génica de marcadores de adipogénesis (Figura 6), aumento de peso (Figura 8), IPGTT (Figura 10), peso del tejido adiposo epididimal (Figura 12), peso del hígado y expresión de genes (Figuras 14 y 13, respectivamente) y otros parámetros como GOT, GPT, triglicéridos y colesterol.

20 Tal como se usa en el presente documento, el "síndrome metabólico" o "síndrome X" se define, en este caso, basándose en los criterios NCEP ATP III, que son la presencia de tres o más de los siguientes factores: 1) aumento de la circunferencia de la cintura (> 102 cm [> 40 in] para hombres, >88 cm [>35 in] para mujeres); 2) triglicéridos elevados (> 150 mg/dl); 3) colesterol HDL bajo (<40 mg/dl en hombres, <50 mg/dl en mujeres); 4) presión arterial no óptima (> 130 mmHg sistólica o mmHg diastólica); y 5) glucosa en ayunas alterada (> 110 mg/dl).

25 Para adultos, los intervalos de "sobrepeso" y "obesidad" se determinan utilizando el peso y la altura para calcular un número llamado "índice de masa corporal" (IMC). El IMC se usa porque, para la mayoría de las personas, se correlaciona con su cantidad de grasa corporal. Se considera que un adulto que tiene un índice de IMC entre 25 y 29,9 tiene sobrepeso. Un IMC de 30 o más se considera obeso, un IMC de 30 o más se considera obeso. Estas afecciones o trastornos se mejoran o se tratan mediante una composición que comprende un extracto que comprende oly, que puede ser extracto de hongo y, en algunas realizaciones, extractos de *Pleurotus*.

30 Tal como se usa en el presente documento, el término "oly" u "Ostreolisina" se refiere a la proteína Ostreolisina natural o a la proteína Ostreolisina recombinante, que comprende la secuencia de aminoácidos establecida en:

35
 AYAQWVMIHNVGSQDVKIKNLKASWGKLLHADGDKDAEVSASNYEGKIIKPDEKL
 QINACGRSDAAEGTTGTFDLVDPADGDKQVRHFYWDCPWGSKTNTWTVSGSNT
 KWMIEYSGQNLDSGALGTITVDTLKKGN (SEQ ID NO:1).

40 La mejora de un parámetro relacionado metabólicamente, enfermedad metabólica asociada y/o afección patológica relacionada con el metabolismo, se refiere a uno o más de los siguientes (por separado o en combinación de uno o más): reducción en el peso corporal, aumento en el consumo de energía (posiblemente por aumento en la producción de adipocitos de grasa marrón), mejora en los parámetros relacionados con el hígado, incluida la masa hepática, la función hepática (por ejemplo, mediante la mejora en la actividad de las enzimas hepáticas como GOT y GPT) y el número de gotitas de grasa, mejora en los parámetros clínicos asociados con la enfermedad del hígado graso no alcohólico (NAFLD), mejora en los parámetros relacionados con la glucosa, tales como, niveles de glucosa en sangre/plasma, mejora de la intolerancia a la glucosa y mejora en uno o más parámetros relacionados con los niveles de colesterol, lípidos, péptidos, leptinas y triglicéridos.

50 De acuerdo con algunas realizaciones, un extracto o extracto de hongo que comprende oly, o una composición que comprende un extracto o extracto de hongo que comprende oly puede usarse para el tratamiento de la obesidad y/o complicaciones de la misma, posiblemente promoviendo la diferenciación de adipocitos marrones y aumentando el gasto de energía.

55 En el presente documento se divulga un procedimiento para diferenciar el adipocito blanco en el adipocito marrón en una célula o inducir la adipogénesis marrón que comprende poner en contacto la célula con un extracto que comprende oly. El procedimiento puede usarse para pruebas *in-vitro*, por ejemplo, sin limitación, para evaluar los efectos sinérgicos entre oly y otros materiales activos.

60 Se divulga que la tasa metabólica se puede aumentar poniendo en contacto las células grasas con una cantidad eficaz de un extracto o extracto de hongo que comprende oly o una composición que comprende un extracto o extracto de hongo que comprende oly. Las células grasas pueden ser marrones, blancas o ambas. La mayor tasa metabólica puede ser causada por el aumento de la respiración y/o la oxidación de nutrientes.

También se divulga que la producción de adipocitos de grasa marrón se puede potenciar poniendo en contacto un precursor de adipocitos de grasa marrón con una cantidad eficaz de un extracto o extracto de hongo que comprende oly o una composición que comprende un extracto o extracto de hongo que comprende oly.

5 De acuerdo con algunas realizaciones, la oly utilizada de acuerdo con la presente invención es oly natural, producida por hongos.

10 Algunas realizaciones están dirigidas al uso de una composición farmacéutica o una composición nutracéutica que comprende como principio activo una cantidad terapéuticamente eficaz de un extracto o extracto de hongo que comprende oly, y un vehículo farmacéuticamente o nutracéuticamente aceptable. La presente invención proporciona además el uso de un suplemento dietético que comprende un extracto o un extracto de hongo que comprende oly. Las sales farmacéuticamente aceptables del principio activo (oly o una variante funcionalmente relacionada de la misma) también se pueden usar de acuerdo con algunas realizaciones. Las sales farmacéuticamente aceptables incluyen aquellas sales formadas con grupos amino libres tales como sales derivadas de ácidos inorgánicos u orgánicos no tóxicos como los ácidos clorhídrico, fosfórico, acético, oxálico, tartárico, y similares, y aquellas sales formadas con grupos carboxilo libres tales como sales derivadas de bases inorgánicas u orgánicas no tóxicas tales como sodio, potasio, amonio, calcio, hidróxidos férricos, isopropilamina, trietilamina, 2-etilamino etanol, histidina, procaína, y similares.

20 La composición farmacéutica o nutracéutica que comprende un extracto o extracto de hongo que comprende oly puede comprender uno o más principios activos adicionales que se requieren para tratar el síndrome metabólico, o una o más de las afecciones o complicaciones del síndrome metabólico descritas en el presente documento, así como la obesidad. Se observa que el principio activo adicional puede tener un efecto sinérgico con el extracto o extracto de hongo que comprende oly.

30 El extracto o extracto de hongo que comprende oly para su uso en la invención también se puede prescribir para tomarse en combinación con otros fármacos utilizados para tratar la obesidad, lipodistrofia, control del apetito en la obesidad, síndrome metabólico (como se define en el presente documento) así como uno o más de sus afecciones y/o complicaciones (como se define en el presente documento) e infertilidad u obesidad relacionada con la lipodistrofia, lipidosis hepática, diabetes, cáncer y alto nivel de colesterol y o triglicéridos. Cuando se usa en tales combinaciones, los extractos que comprenden oly y los fármacos convencionales pueden administrarse simultáneamente, por la misma o diferentes vías, o en diferentes momentos durante el tratamiento. La dosis del fármaco convencional seleccionado dependerá del compuesto particular que se utilice y la vía y frecuencia de administración.

40 La presente divulgación también proporciona un paquete o kit farmacéutico o nutracéutico que comprende uno o más recipientes llenos con uno o más de los ingredientes de las composiciones farmacéuticas o nutracéuticas de la invención. Opcionalmente, asociado con dicho recipiente o recipientes hay un aviso en la forma prescrita por una agencia gubernamental que regula la fabricación, el uso o la venta de agentes farmacéuticos o productos biológicos, cuyo aviso refleja la aprobación por la agencia de la fabricación, el uso o la venta para administración humana.

45 La expresión "farmacéuticamente aceptable" significa adecuado para administración a un sujeto, por ejemplo, un ser humano. Por ejemplo, la expresión "farmacéuticamente aceptable" puede significar aprobado por una agencia reguladora del gobierno federal o estatal o enumerado en la Farmacopea de Estados Unidos u otra farmacopea reconocida generalmente para su uso en animales, y más concretamente en seres humanos. El término "vehículo" se refiere a un diluyente, adyuvante, excipiente o vehículo con el que se administra el compuesto terapéutico. Dichos vehículos farmacéuticos pueden ser líquidos estériles, tales como agua y aceites, incluidos aquellos de origen en el petróleo, animal, vegetal o sintético, tales como aceite de cacahuete, aceite de soja, aceite mineral, aceite de sésamo y similares, polietilenglicoles, glicerina, propilenglicol u otros disolventes sintéticos. El agua es un vehículo preferido cuando la composición farmacéutica se administra por vía intravenosa. Se pueden emplear también soluciones salinas y soluciones acuosas de dextrosa y glicerol como vehículos líquidos, particularmente para soluciones inyectables. Los excipientes farmacéuticos adecuados incluyen almidón, glucosa, lactosa, sacarosa, gelatina, malta, arroz, harina, creta, gel de sílice, estearato de sodio, monoestearato de glicerol, talco, cloruro de sodio, leche desnatada en polvo, glicerol, propilenglicol, agua, etanol y similares. La composición, si se desea, también puede contener cantidades menores de agentes humectantes o emulsionantes, o agentes tamponantes del pH tales como acetatos, citratos o fosfatos. También se prevén agentes antibacterianos, tales como alcohol bencílico o metilparabenos; antioxidantes, tales como ácido ascórbico o bisulfito de sodio; y agentes para el ajuste de la tonicidad tales como cloruro de sodio o dextrosa.

60 Las composiciones farmacéuticas o nutracéuticas o los suplementos dietéticos pueden tomar la forma de soluciones, suspensiones, emulsiones, comprimidos o cápsulas. Las composiciones farmacéuticas también pueden adoptar la forma de polvos, geles, cremas, pomadas, espumas, pastas, formulaciones de liberación sostenida y similares. Las composiciones también pueden formularse en forma de un supositorio, con aglutinantes y vehículos convencionales, tales como triglicéridos, celulosa microcristalina, goma de tragacanto o gelatina. La formulación oral puede incluir vehículos convencionales, tales como grados farmacéuticos de manitol, lactosa, almidón, estearato de magnesio,

sacarina sódica, celulosa, carbonato de magnesio, etc. Ejemplos de vehículos farmacéuticos adecuados se describen en: Remington's Pharmaceutical Sciences" por E.W. Martin. Tales composiciones contendrán una cantidad terapéuticamente eficaz de un oly, su variante relacionada funcionalmente, por ejemplo, en una forma sustancialmente purificada, junto con una cantidad adecuada de vehículo para proporcionar la forma de administración apropiada al sujeto. En algunas realizaciones de la invención, el suplemento nutracéutico o dietético se pueden agregar a un alimento como una goma de mascar, un producto lácteo o similares. En algunas realizaciones de la invención, el suplemento nutracéutico o dietético se pueden agregar al líquido, tal como agua, leche o zumo,

La cantidad del extracto o extracto de hongo que comprende la oly, que será eficaz en el tratamiento de un trastorno o afección particular, dependerá de la naturaleza del trastorno o afección, y puede determinarse mediante técnicas clínicas convencionales conocidas por una persona experta en la materia. Además, pueden emplearse opcionalmente ensayos *in-vitro* para ayudar a identificar los intervalos óptimos de dosificación. La dosis precisa que se empleará en la formulación dependerá también de la vía de administración, y la naturaleza de la enfermedad o trastorno, y deberá decidirse de acuerdo con el criterio del especialista a cargo del tratamiento y de las circunstancias de cada paciente. Las dosis eficaces se pueden extrapolar a partir de curvas de dosis-respuesta derivadas de sistemas o bioensayos de prueba en modelos animales *in vitro* o *in vivo*.

La vía de administración de la composición farmacéutica dependerá del paciente y/o enfermedad o afección a tratar. Las vías adecuadas de administración incluyen, pero sin limitación, administración parenteral, por ejemplo, intradérmica, intravenosa, intramuscular, intralesional, subcutánea, intratecal, intraperitoneal o cualquier otro modo de administración conocidos en la técnica. De acuerdo con algunas realizaciones, la composición se administra por vía oral, transdérmica, rectal, vaginal, tópica, nasal, inhalación y modos de tratamiento ocular. Se puede emplear también la administración pulmonar, por ejemplo, mediante el uso de un inhalador o nebulizador.

Para aplicaciones orales, la composición farmacéutica puede estar en forma de, por ejemplo, comprimidos o cápsulas, que pueden contener cualquiera de los ingredientes siguientes o compuestos de una naturaleza similar: un aglutinante, tal como celulosa microcristalina, goma de tragacanto o gelatina; un excipiente, tal como almidón o lactosa; un agente disgregante, tal como ácido algínico, Primogel o almidón de maíz; un lubricante, tal como estearato de magnesio; o un emoliente, tal como dióxido de silicio coloidal. Cuando la forma de dosificación unitaria es una cápsula, esta puede contener, además de los ingredientes del tipo anterior, un vehículo líquido, tal como un aceite graso. Además, las formas de dosificación unitarias pueden contener diversos materiales diferentes que modifiquen la forma física de la unidad de dosificación, por ejemplo, recubrimientos de azúcar, goma laca u otros agentes entéricos. Los comprimidos de la invención pueden recubrirse adicionalmente con película.

La expresión "precursor de los adipocitos de grasa marrón" se refiere a cualquier célula que puede diferenciarse directamente, o a través de tipos de células intermedias en adipocitos de grasa marrón, incluyendo, por ejemplo, células madre, células madre mesenquimatosas, precursor miogénico, preadipocito marrón y preadipocito blanco.

En algunas realizaciones de la invención, un extracto que comprende oly es para su uso en el tratamiento de la obesidad. En algunas realizaciones de la invención, el extracto es un extracto de hongo. El extracto de hongo puede ser extracto de *Pleurotus ostreatus*. El extracto puede prepararse como se detalla en el presente documento.

El polvo seco se puede preparar a partir de cuerpos fructíferos frescos de hongos *Pleurotus ostreatus* (Yarden) después de congelar los cuerpos fructíferos frescos con nitrógeno líquido, liofilizarlos y a continuación, molerlos en cualquier molinillo apropiado. Como alternativa, los hongos se congelan a una temperatura entre -4 °C a -40 °C, se liofilizan y se muelen usando cualquier molinillo apropiado. En algunas realizaciones, la molienda se realiza entre aproximadamente 20 segundos y 10 minutos. En algunas realizaciones, la molienda se realiza entre aproximadamente 30 segundos y dos minutos. En algunas realizaciones, la molienda se realiza durante aproximadamente un minuto. Los cuerpos fructíferos en polvo se pueden extraer con agua, en algunas realizaciones, se usa agua fría agitando durante la noche o durante un período de entre aproximadamente 20 minutos y 6 horas. El extracto se centrifuga a continuación, a, por ejemplo, entre aproximadamente 3.000 rpm y 30 rpm durante aproximadamente de 10 min a dos horas o más. Se filtra el sobrenadante. Se pueden analizar alícuotas para determinar la expresión o actividad de Oly en células HIB-1B de ratón.

Como se muestra en el Ejemplo 7, la congelación de cuerpos fructíferos frescos con nitrógeno líquido, seguida de liofilización y posterior molienda, proporcionó una mayor concentración de oly en comparación con los hongos que se congelaron a una temperatura de aproximadamente -20 °C, se liofilizaron y se molieron. Sin embargo, la actividad en células HIB-1B de ratón permaneció similar en las alícuotas de ambas preparaciones. En algunas realizaciones de la invención, se puede agregar oly adicional (que puede ser natural o sintética) al extracto para proporcionar un extracto enriquecido por oly.

Los siguientes ejemplos se presentan con el fin de ilustrar de manera más completa determinadas realizaciones de la invención.

65

Ejemplos

Procedimientos experimentales

Preparación de Ostreolisina

5 Oly se amplificó por PCR usando cebadores que contenían los sitios NcoI (en el extremo 5') y BamHI + XbaI (en el extremo 3') y se subclonó en el vector pTrc 99a en los sitios NcoI y XbaI. La masa molecular de la proteína era de 15.400 Da, y la absorbancia específica a 280 nm (calculada por el programa DNAMAN era de 2,62 para g/l. La proteína se expresó tras la inducción con IPTG como proteína soluble. La proteína se purificó por extracción sucesiva, precipitación en sulfato de amonio, diálisis, cromatografía de intercambio aniónico, filtración en gel preparativa, diálisis y liofilización en presencia de NaHCO₃ a una proporción aproximada de proteína: sal de 1:1. Su concentración se calculó de acuerdo con la absorbancia específica a 280 nm. La proteína es fácilmente soluble en DDW. Su pureza se determinó mediante SDS-PAGE en presencia de agente reductor (véase Figura 1) y mediante filtración analítica en gel en la columna Superdex 75 desarrollada en presencia de Tris-HCl 25 mM + NaCl 300 mM, Ph 8 (véase Figura 2). La pureza determinada por ambos procedimientos fue > 95% y la masa molecular en condiciones no desnaturalizantes indica que la proteína es un monómero. Con el fin de obtener elevadas cantidades de la oly, la proteína se sobreexpresó en E. coli y se purificó (véanse las Figuras 1 y 2).

Cultivos celulares

20 Los preadipocitos marrones HIB-1B [que derivan de un tumor de grasa marrón de un ratón transgénico, y son la primera línea celular de adipocitos marrón establecida capaz de expresar la proteína de desacoplamiento mitocondrial (UCP, por sus siglas en inglés) específica de grasa marrón] se cultivaron y diferenciaron o usando rosiglitazona o tratándolos con Oly. Los ratones 3T3-L1 se cultivaron y se diferenciaron con rosiglitazona.

Extracción de ARN y RT-PCR

25 El ARN total se aisló usando reactivo T (Sigma). La transcripción inversa se realizó utilizando ADNc de alta capacidad (Applied Biosystems). La RT-PCR se realizó utilizando SYBR Green (Applied Biosystems).

Transferencia Western

30 Los anticuerpos primarios y secundarios se obtuvieron de Cell Signaling Technology (Danvers, MA) o Santa Cruz Biotechnology (Santa Cruz, CA) y la transferencia Western se realizó como se describe en Yehuda-Shnaidman, E., et al., Acute stimulation of white adipocyte respiration by PKA-induced lipolysis. Diabetes, 2010. 59(10): págs. 2474-83.

Inmunofluorescencia y microscopía confocal

40 Las células se sembraron en placas de 12 pocillos, se cubrieron con cubreobjetos de vidrio y se recubrieron con gelatina al 0,1%. Un día después, se añadió oly (10-62,5 µg/ml) durante 8 horas. Las células se fijaron en PFA al 3,7% (v/v) y se permeabilizaron con Triton X-100 al 0,5% (v/v) durante tres minutos. Las células se incubaron con PFA al 3,7% durante 20 minutos y se lavaron con PBS. Después de bloquear durante 1 hora a temperatura ambiente con suero de burro al 5% (v/v), los cubreobjetos se incubaron con anticuerpo primario de caveolina-1 (dilución 1:100) o con anticuerpo primario de oly, durante la noche a 40 °C. Los cubreobjetos se lavaron con TBST y se incubaron con el anticuerpo secundario anti-IgG de conejo de cabra Alexa Fluor 488 y Faloidina-TRITC durante dos horas a temperatura ambiente. Se realizaron lavados adicionales y finalmente, se agregó una solución de montaje (70% (v/v)) que contenía DAPI (30% (v/v)). Las células se observaron bajo el microscopio confocal Zeiss Axiovert 100M (LSM 510, Alemania).

Tinción con Rojo Nilo

50 Las células se sembraron en placas de cultivo de 24 pocillos con fondo de vidrio recubiertas con gelatina al 0,1% (MatTak Corporation, Ashland, MA). Después de la incubación a 37 °C durante una noche, con CO₂ al 5 %, las células se lavaron con PBS, se incubaron con 1 µg/ml de rojo nilo durante 20 minutos a 37 °C y se analizaron con un microscopio confocal.

Ejemplo 1

60 Ensayo *in vitro* para evaluar la actividad antiproliferativa de la oly recombinante en la línea celular de cáncer de colon HCT-116

65 Usando un ensayo de viabilidad (ensayo de MTT), se probó la actividad biológica antiproliferativa de la oly recombinante en la línea celular de cáncer de colon HCT-116. De manera similar a la proteína natural, la oly recombinante tiene actividad antiproliferativa (Figura 3 gris). Para explorar más a fondo si la actividad antiproliferativa de oly es específica de las células cancerosas que poseen altas cantidades de refuerzos de lípidos, se probó el

efecto de oly sobre la viabilidad de la línea celular no cancerosa, FHS 74 Int (intestino delgado fetal humano). Como se muestra en las figuras 3 (columna negra), la actividad antiproliferativa de oly es mucho menor en las células no cancerosas (negro) frente a las células cancerosas (gris).

5 Ejemplo 2

Designación de un anticuerpo policlonal específico contra la oly recombinante completa

10 Se diseñó un anticuerpo policlonal específico contra la oly recombinante completa. La Figura 4 demuestra que el anticuerpo obtenido es altamente específico de oly y reconoce tanto la proteína recombinante como la proteína de tipo silvestre.

Ejemplo 3

15 Un ensayo *in vitro* para evaluar el papel de oly en la diferenciación de adipocitos

Una vez que se obtuvo una oly activa que puede penetrar en las células, se probó oly para determinar su supuesto papel en la diferenciación de adipocitos. En esta prueba se utilizaron la línea celular de preadipocitos marrones de ratón, HIB-1B, y la línea celular de preadipocitos blancos de ratón, 3T3-L1. Cuando las células HIB-1B se trataron con oly, se observaron alteraciones morfológicas debido a la acumulación de gotitas de lípidos en el citoplasma (Fig. 5A). Esto también se evidenció por la tinción con Rojo Nilo (Fig. 5B). Por el contrario, 3T3-L1 tratada con oly no mostraron acumulación de lípidos (Fig. 5B) pero afectó la expresión génica de algunos genes de diferenciación (como HSL y PGC-1 α , no mostrado). Observación: en ambas líneas celulares, el mejor efecto de oly se detectó después de 24 - 48 horas. Los períodos de tratamiento más largos no dieron como resultado cambios adicionales.

25 Para caracterizar aún más la adipogénesis marrón inducida por oly, se midió el efecto de oly sobre la expresión génica de algunos marcadores adipogénicos. La Figura 6A presenta que oly induce un aumento en la expresión génica de aP2, PGC-1 α y C/EBP α , mientras que la necdina (inhibidor adipogénico) disminuye, lo que sugiere una diferenciación de adipocitos. Además, oly aumenta la expresión génica de marcadores específicos de adipogénesis marrón, tales como: UCP1, CIDEA y prdm16 (Figura 6B).

30 Por lo tanto, se presume que oly induce la diferenciación de la grasa marrón y que oly podría conducir a la transformación de los adipocitos blancos en células "tipo marrones". Se sabe que las células blancas pueden transformarse en células marrones.

35 También se exploró la participación de proteínas relacionadas con las balsas lipídicas en la adipogénesis marrón inducida por oly. Esta pregunta es especialmente relevante por dos razones: (1) oly interactúa con balsas lipídicas que a su vez podrían conducir a su entrada a través de la membrana celular; (2) muchas evidencias acumulativas proponen un papel para la caveolina-1 en el metabolismo de los adipocitos. Por lo tanto, se probó el papel de la caveolina-1 en la adipogénesis inducida por oly. Se descubrió que oly aumenta la expresión del gen de la caveolina-1 en las células HIB-1B (Figura 7). Esto sugiere un papel para la caveolina-1 en el efecto oly y podría ser parte del procedimiento de diferenciación.

45 Ejemplo 4

Experimento *in-vivo* de toxicidad

La inyección IP a ratones de 0,2 mg/kg de peso corporal (PC) o 0,5 mg/kg de PC de oly recombinante no indujo mortalidad, ni ningún signo de enfermedad o toxicidad en los ratones inyectados, de la solicitud después de una semana después de la administración.

Ejemplo 5

55 Pruebas *in vivo* para evaluar el efecto de oly sobre la obesidad, la diabetes y el hígado graso Animales y diseño del experimento

Se adquirieron ratones C57BL/6 macho, 5 semanas de edad, de Hatlam Laboratories, Ein Karem, Jerusalem. Todos los ratones eran de la misma camada. Los ratones se mantuvieron en cuatro jaulas de plástico en la misma instalación para animales, cada jaula representando un grupo experimental diferente, en el que dos grupos se mantuvieron con una dieta regular y dos grupos recibieron una dieta alta en grasas (60% de grasa). Los ratones recibieron agua de acceso a voluntad. Los ratones se pesaron dos veces por semana. Después de catorce semanas durante las cuales los grupos de ratones recibieron los dos regímenes de dieta diferentes, comenzó el período de inyección con oly. Los grupos de tratamiento (una jaula de dieta regular y una jaula de ratones con dieta alta en grasas (HFD) se inyectaron a través de la cavidad peritoneal con una concentración fija de oly (1,0 mg/gr de PC) cada dos días; cada ratón se pesó antes de la inyección y el volumen de inyección de oly se ajustó de acuerdo con el peso del ratón. Los grupos de control fueron inyectados con volúmenes similares de solución salina. En todas las

inyecciones se usó una jeringa estéril de 1 ml con una aguja 26 Ga 3/8 ". El cuidado de los animales y los procedimientos experimentales estaban de acuerdo con el comité acreditado de ética animal de la Universidad Hebrea.

5 Efecto de oly sobre el peso corporal

El aumento de peso de los cuatro grupos de ratones durante el experimento se muestra en la Figura 8, y la Figura 9 presenta el peso de los ratones el día del sacrificio. Los resultados muestran que la administración de oly a ratones obesos, es decir, aquellos provistos de una dieta alta en grasas, indujo una reducción significativa en el peso corporal.

Efecto de oly en la prueba de tolerancia a la glucosa intraperitoneal (IPGTT)

Los niveles de glucosa en sangre en ayunas se obtuvieron de ratones que ayunaron durante 12 horas. La prueba se realizó 16 semanas después del día 1 del experimento. Se pesó cada ratón y se obtuvieron niveles de glucosa en ayunas a partir de sangre venosa de un pequeño clip de cola usando un glucómetro (Optimum Xceed, Abbot, Reino Unido) y las respectivas tiras reactivas de glucosa en sangre (Optimum, Abbot, RU). A continuación, se inyectó solución de glucosa (20% (p/v) en solución salina) usando una jeringa de 1 ml, aguja 26 Ga 3/8 ", de acuerdo con el peso del ratón (2 mg/gr de peso corporal). Los niveles de glucosa en sangre se midieron a los 30, 60, 90 y 120 minutos después de la inyección de la solución de glucosa (véase Figura la 10A). Se calculó el área bajo la curva (ABC) de IPGTT que representa la tolerancia a la glucosa del cuerpo para todos los grupos de ratones (véase la Figura 10B).

Efecto de oly sobre el consumo de alimentos

El consumo de alimentos de los ratones durante todo el experimento se controló y, como se muestra en la Figura 11, el consumo de alimentos de los ratones no se ve afectado por la administración de oly. Por consiguiente, la disminución evidente en el peso corporal no se debe a la falta de apetito o similar.

30 Efecto de oly sobre los tejidos corporales

Después de 20 semanas, se sacrificaron los ratones de los diferentes grupos y se analizaron diferentes tejidos, así como las muestras de sangre. El peso del tejido adiposo epididimario se presenta en la Figura 12. La Figura 13A presenta la expresión de UCP-1, Cidea, PRDM16, perilipina A (marcadores adipogénicos marrones), que, tal como se muestra allí, están regulados por la administración de oly. La expresión de TNF- α , por otro lado, fue regulado negativamente en el tejido adiposo visceral por la administración de oly. Por lo tanto, se concluye que la administración de oly indujo una reducción significativa en la masa de grasa epididimaria y controló la masa visceral hacia una característica más adipogénica marrón.

La Figura 14 presenta los pesos de los hígados de los ratones el día del sacrificio, mostrando que la administración de oly indujo una reducción significativa en la masa de los hígados. Además, se analizó la sangre para determinar las funciones hepáticas y, como se muestra en las Figuras 15 y 16, las transaminasas GOT y GPT se regularon significativamente de manera negativa por el tratamiento con oly. Además, como se muestra en las Figuras 17 y 18, los niveles de triglicéridos y colesterol también fueron significativamente regulados negativamente por el tratamiento con oly.

Además, las muestras de hígado se analizaron histológicamente. Como se muestra en la Figura 19, los hígados de los ratones a los que se proporcionó una dieta alta en grasas resultaron ser extremadamente grasos (véase el grupo control HF), como es evidente por el número relativamente alto de gotitas de grasa en comparación con el número de gotitas de grasa en los ratones a los que se proporcionó una dieta de bajo contenido de grasas. Además, parece que el tratamiento con oly redujo los niveles de grasa en el hígado, como es evidente por los resultados histológicos normales obtenidos de los ratones con HFD tratados con oly. También se evaluó la apoptosis en los hígados. Como se presenta en la Figura 20, oly regulaba negativamente el péptido proapoptótico Bax mientras regulaba positivamente el péptido antiapoptótico Bcl2, y por lo tanto BAX/BCL2 se regulaban negativamente en muestras de hígado por la administración de oly, inhibiendo así la muerte de las células hepáticas. Los resultados anteriores muestran que la administración de oly indujo una reducción significativa en la apariencia del hígado graso y las actividades hepáticas asociadas.

Además, se realizaron varias pruebas para evaluar el efecto de Oly en la enfermedad del hígado graso no alcohólico (NAFLD). Las pruebas y los resultados se presentan en la Tabla 1 a continuación.

Tabla 1

Prueba	Explicación	Expresión Génica (Unidades Arbitrarias)			
		Dieta de control (CD)	CD+Oly	HFD	HFD+Oly
Expresión de transcritos de la enzima málica citosólica	Enzima que genera NADPH utilizada en la biosíntesis de ácidos grasos y colesterol. El trabajo previo ha correlacionado la expresión de la enzima málica hepática y adiposa con la susceptibilidad a la obesidad y la diabetes. Oly reduce la expresión de esta enzima.	0,48 ± 0,03	0,47 ± 0,03	0,26 ± 0,01	0,28 ± 0,01 Estadísticamente significativo
Expresión de transcritos de IRS2	La resistencia a la insulina hepática y el hígado graso es un componente crítico en el desarrollo de la diabetes mellitus tipo 2. La resistencia a la insulina en el hígado se asocia con una expresión reducida de ambas proteínas principales del sustrato del receptor de insulina (IRS), IRS-1 e IRS-2. Oly sensibiliza el hígado a la insulina regulando positivamente IRS2.	0,18 ± 0,02	0,19 ± 0,03	0,10 ± 0,01	0,14 ± 0,02 Estadísticamente significativo
Expresión de transcritos de FASN	La sintasa de ácidos grasos (FASN por sus siglas en inglés) cataliza la última etapa en la biosíntesis de ácidos grasos, y es un determinante principal de la capacidad hepática máxima para generar ácidos grasos por lipogénesis de novo. La expresión del ARNm de FASN en el control humano frente a hígados con NAFLD confirmó niveles de FASN significativamente más altos en esteatosis hepática. Oly regula negativamente la expresión de FASN.	0,10 ± 0,05	0,08 ± 0,02	0,14 ± 0,01	0,11 ± 0,02 Estadísticamente significativo
Expresión de transcritos de LPL	La sobreexpresión específica de tejido de la lipoproteína lipasa (LPL) causa resistencia a la insulina específica de tejido. Esto ocurre en el ácido graso. Oly inhibe la expresión de esta enzima.	0,12 ± 0,03	0,08 ± 0,02	0,14 ± 0,01	0,125 ± 0,02 Estadísticamente significativo
Expresión de transcritos de PKLR	PKLR es la proteína codificada por el gen piruvato quinasa que cataliza la transfosforilación de fosfoenolpiruvato en piruvato y ATP, que es la etapa limitante de la glucólisis. Proporciona el sustrato para la acumulación de glicerol y ácidos grasos en el hígado. Oly inhibe la expresión de esta enzima.	0,14 ± 0,04	0,08 ± 0,01	0,19 ± 0,02	0,09 ± 0,01 Estadísticamente significativo
Expresión de transcritos de IKKE	IKKE y TBK1 son parte de un procedimiento de inflamación relacionado con la obesidad y la resistencia a la insulina, la afección que precede a la diabetes de tipo 2. Oly los regula a la baja.	0,01 ± 0,001	0,01 ± 0,002	0,035 ± 0,003	0,01 ± 0,001 Estadísticamente significativo
Expresión de transcritos de TBK1	IKKE y TBK1 son parte de un procedimiento de inflamación relacionado con la obesidad y la resistencia a la insulina, la afección que precede a la diabetes de tipo 2. Oly los regula a la baja.	0,09 ± 0,01	0,07 ± 0,02	0,11 ± 0,01	0,06 ± 0,01 Estadísticamente significativo
Expresión de transcritos de CCL2 o MCP-1	CCL-2 o MCP-1 desempeñan un papel importante en la esteatosis hepática o en la lesión hepática temprana.	0,04 ± 0,01	0,05 ± 0,01	0,19 ± 0,02	0,06 ± 0,01 Estadísticamente significativo
Expresión de transcritos de CCL3	CCL3 está elevado en el plasma y los tejidos metabólicos (hígado y tejido adiposo) de pacientes con hiperlipidemia y enfermedad metabólica. Por lo tanto, CCL3 es una quimiocina importante en el reclutamiento de células inmunitarias a tejidos metabólicos. Oly regula negativamente su expresión	0,9 ± 0,1	ND	2,4 ± 0,3	0,4 ± 0,05 Estadísticamente significativo
Expresión de transcritos de EMR1	EMR1 o módulo tipo EGF que contiene el receptor 1 de la hormona tipo mucina [EMR1] es un marcador de inflamación en el hígado, regulado negativamente por Oly	0,041 ± 0,01	0,041 ± 0,01	0,05 ± 0,02	0,038 ± 0,01 Estadísticamente significativo

Ejemplo 6**Efecto de oly en el cáncer****5 Procedimientos****Líneas celulares y condiciones de cultivo**

10 Las células de carcinoma colorrectal HCT116 (número ATCC: CCL-247) se mantuvieron en medio Eagle modificado por Dulbecco (DMEM; Sigma-Aldrich, Israel) suplementado con suero bovino fetal al 10% (v/v) (FBS; Biological Industries, Beit Haemek, Israel)) y penicilina-estreptomicina-nistatina al 0,2% (v/v). Las células de cáncer de colon altamente metastásico HM7 del clon n.º 1 (células HM7 transfectadas con neo plásmido pcDNA3, que no expresa Caveolina-1) y clon n.º 15 (células HM7 transfectadas con pcDNA-Caveolina-1, plásmido con inserto de proteína Caveolina-1, que expresa alta los niveles de Caveolina-1) se mantuvieron en DMEM suplementado con FBS al 10% (v/v) de FBS y de G-418 al 0,275% (v/v) (Gibco, Paisley, Reino Unido). Todas las células se cultivaron en CO₂ al 5% en una atmósfera humidificada a 37 °C.

Actividad anticancerosa (ensayo de MTT)

20 Se sembraron células HCT116 y células HM7 del clon n.º 1 y clon n.º 15 en una placa de 96 pocillos (2,0x10⁴ por pocillo). Después de la incubación previa durante la noche a 37 °C en una incubadora de CO₂, la proteína Ostreolisina recombinante, preparada por expresión en E. coli, se añadió a cultivos celulares a una concentración de 125 µg/ml y 62,5 µg/ml. Se añadió medio fresco solo al control. Se añadió extracto de cuerpo fructífero a tres concentraciones: 0,01 % (p/v), 0,025 % (p/v), 0,05 % (p/v). Después de la incubación durante 4, 8, 12, 24 horas a 37 °C, se retiró el medio y se añadieron 50 µl de solución de bromuro de 3-(4-,5-dimetil-2-tiazolil) -2,5-difeniltetrazolio (MTT) (0,5 mg/ml). Las placas se incubaron durante 1 h a 37 °C. Después de eliminar la solución de MTT, se añadieron 100 µl de DMSO a cada pocillo y las placas se agitaron durante 20 minutos. La formación de formazán coloreado se evaluó a 550 nm en el lector de microplacas ELx 808 Ultra (BIO-TEK INSTRUMENTS INC) utilizando el software KC junior.

30

Análisis del ciclo celular

35 Las células HCT116 se sembraron en placas de 6 pocillos (9,0 x 10⁵ células por pocillo) y se dejaron adherir durante la noche. Se añadió medio fresco al cultivo celular con la proteína Ostreolisina recombinante a una concentración de 125 µg/ml. Se añadió medio fresco solo al control. Se añadió extracto de cuerpo fructífero a una concentración de 0,01% (p/v). Tras 8 horas de incubación, se lavaron las células en PBS, se tripsinizaron, se recolectaron y se resuspendieron en 0,5 ml de PBS estéril. Se añadieron 0,5 ml de etanol frío al 70 % (v/v) a las suspensiones celulares mientras se agitaba en vórtice y las muestras se almacenaron a 4 °C. Para la tinción, las células se centrifugaron durante 5 minutos a 1500 rpm (Hettich Zentrifugen Rotofix 32), la capa superior se descartó y la solución de fragmentación de ADN (0,05 mg/ml de yoduro de propidio, Triton X-100 al 0,1% (v/v) y citrato de sodio al 0,1% (p/v)) se añadió durante 1 hora de incubación en hielo. El contenido de ADN se midió excitando yoduro de propidio a 488 nm y midiendo la emisión a 575 nm (FL2) usando un citómetro de flujo (BD FACScalibur BD Biosciences, San José, CA). El análisis se llevó a cabo mediante el software WinMDI 2.9.

40

45 Transferencia Western y densitometría

Los lisados de células HCT116 se sometieron a electroforesis en SDS-PAGE al 12%, se transfirieron a membranas de transferencia de nitrocelulosa (Whatman, Schleicher, Schuell, Dassel, Alemania), se bloquearon en TBST que contenía leche desnatada en polvo al 5% (p/v) y se incubaron con PARP-1 (dilución 1:1000) o BAX (1:500) o anticuerpo β-actina (dilución 1:10.000) durante la noche a 4 °C. Las membranas se incubaron posteriormente con un anticuerpo secundario anti-conejo acoplado a peroxidasa de rábano picante (Jackson IR, Baltimore, PA, USA, dilución 1:10.000) durante 1 h a temperatura ambiente. Las proteínas se visualizaron usando un kit de ECL. La transferencia eficaz a la membrana de nitrocelulosa se confirmó mediante tinción con Ponceau S. Las películas se escanearon con un escáner Mustek 1200 UB Plus (Mustek systems Inc., CA, EE.UU.). La densitometría se evaluó utilizando el software analizador Gelpro32 y se usó β-actina como control de carga.

55

Inmunofluorescencia y microscopía confocal

60 Las células HCT116 se sembraron a una densidad de 3,6x10⁵ células por pocillo en cubreobjetos de vidrio (diámetro, 1,8 cm) recubiertos con gelatina al 0,1%, colocados en placas de 12 pocillos. Se permitió que las células se adhirieran durante la noche y los tratamientos se aplicaron de la siguiente manera: Se añadió medio fresco al cultivo celular con la proteína oly recombinante a una concentración de 125 µg/ml. Se añadió medio fresco solo al control. Se añadió extracto de cuerpo fructífero a una concentración de 0,01% (p/v). Tras 4 u 8 horas de incubación, las células se fijaron en PFA al 3,7% (v/v) y se permeabilizaron con Triton X-100 al 0,5% (v/v) durante 3 minutos. A continuación, las células se incubaron con PFA al 3,7% durante 20 minutos y se lavaron tres veces con PBS. Para bloquear la tinción inespecífica, las células se incubaron durante 1 hora a temperatura ambiente con suero de burro

65

al 5% (v/v) en TBST. Las células se tificaron secuencialmente con anticuerpo primario de Caveolina-1 (dilución 1:100) o anticuerpo primario de Osteolisina (dilución 1:500) o anticuerpo primario de Flotilina-1 (dilución 1:100) en una cámara de humedad durante la noche a 4 °C. Los cubreobjetos se lavaron tres veces durante 30 minutos con TBST y después se incubaron con el anticuerpo secundario anti-IgG de conejo de cabra (dilución 1:500) Alexa Fluor 488 y Faloidina-TRITC en una cámara de humedad durante dos horas a temperatura ambiente. Los cubreobjetos se lavaron cuatro veces con TBST y después se montaron al revés con solución de montaje (70% (v/v)) mezclada con solución de montaje con DAPI (30% (v/v)) en portaobjetos de vidrio. Las células se observaron bajo el microscopio confocal Leica CTR4000 (Mannheim, Alemania) a un aumento de x63 usando aceite de inmersión.

10 Resultados

La Osteolisina recombinante ejerce un efecto antiproliferativo sobre las células HCT116 y los clones de HM7

La exposición de HCT116 (células de carcinoma colorrectal) a oly ha mostrado citotoxicidad con una concentración eficaz de 125 µg/ml produciendo una disminución del 50% en la viabilidad celular a las 8 horas (Figura 21C). El efecto citotóxico de oly también se observó en HM7 (cáncer de colon altamente metastásico). El clon número 15 de HM7 (que expresa altos niveles de Cav-1) presentó una sensibilidad significativamente mayor a oly en comparación con el clon número 1 (sin expresión de Cav-1) cuando se administró durante 4 y 8 horas (Fig. 21B y 21D, respectivamente).

La observación directa con microscopio de la morfología celular confirmó que oly tenía un efecto similar en la línea celular HCT116 y en los clones de HM7, produciendo la contracción de las células (datos no mostrados). La actividad citotóxica de oly ya había alcanzado su punto máximo después de 4 horas de incubación en ambas líneas celulares.

Para probar si el efecto citotóxico de oly es específico para las células cancerosas, también se probó el efecto de oly sobre la viabilidad de la línea celular no cancerosa, FHS 74 Int (intestino delgado fetal humano). Como se ve en la Figura 3 (véase en el Ejemplo 1), la actividad antiproliferativa de oly es mucho menor en las células normales (FHS 74 Int, negro) frente a las células cancerosas (HCT116, gris), lo que implica un papel antiproliferativo específico de oly en células cancerosas.

El análisis del ciclo celular de la línea celular HCT116 indicó que oly recombinante induce apoptosis en estas células

Para cuantificar la distribución celular en apoptosis y ciclo celular, se analizó la línea celular HCT116 por citometría de flujo (Figura 22A) sin tratamiento (control) o con oly 125 µg/ml y FBE al 0,01% (p/v). Después de la tinción con un colorante cuantitativo de unión al ADN, las células que han perdido ADN por apoptosis captarán menos tinción y aparecerán como un máximo sub-G1 a la izquierda del máximo G1. Los resultados demuestran que en las células HCT116 no tratadas, la distribución del ciclo celular fue 1,238 ± 0,124, 42,482 ± 1,709, 13,198 ± 0,845, 27,997 ± 0,856 en apoptosis, G0/G1, S, G2/M respectivamente. En las células HCT116 tratadas con FBE al 0,01% (p/v), la distribución del ciclo celular fue 2,045 ± 0,326, 33,807 ± 1,109, 11,483 ± 0,726, 27,560 ± 1,102 en apoptosis, G0/G1, S, G2/M respectivamente. En las células HCT116 tratadas con 125 µg/ml de oly, la distribución del ciclo celular fue 7,380 ± 0,584, 46,048 ± 2,307, 13,022 ± 1,158, 25,988 ± 0,487 en apoptosis, G0/G1, S, G2/M respectivamente. Las diferencias entre las células HCT116 no tratadas y las células HCT-116 tratadas con 125 µg/ml fueron significativas con un valor de P < 0,05 (Figura 22B).

La Osteolisina recombinante promueve la escisión de PARP-1 y la expresión de marcadores proapoptóticos BAX en la línea celular HCT116 (línea celular humana de cáncer de colon)

La extensión de la apoptosis se evaluó mediante la detección de PARP-1 activo y la detección de proteína BAX usando transferencia Western. PARP, una polimerasa nuclear de poli (ADP-ribosa) de 116 kD es una de las principales dianas de escisión de caspasa-3 *in vivo*. La escisión separa el dominio de unión al ADN aminoterminal de PARP (24 kD) del dominio catalítico carboxiterminal (89 kD) (10) y sirve como marcador de células que sufren apoptosis. En la línea celular HCT116, el tratamiento con 125 µg/ml de oly induce la escisión de PARP (Figura 23A), revelada por un anticuerpo que reconoce tanto el fragmento de 116 kD de longitud completa como el fragmento escindido de 89 kD. BAX es una proteína proapoptótica de 23 kD, miembro de la familia Bcl-2. Los eventos críticos en el procedimiento de activación de BAX son su translocación a las mitocondrias y su cambio conformacional N-terminal estrechamente acoplado a la inserción y oligomerización de la membrana mitocondrial. La inserción de BAX en la membrana externa mitocondrial está estrechamente asociada con la liberación en el citosol de varias proteínas, tal como el citocromo c y la procaspasa-3, que son esenciales para la ejecución del programa apoptótico. La activación de BAX se investigó mediante transferencia Western usando un anticuerpo que reconoce específicamente la conformación activada de BAX. El tratamiento con 125 µg/ml de Oly de células HCT116 indujo un aumento en BAX activado en comparación con condiciones no tratadas (Figura 23B). La cuantificación del número de células apoptóticas positivas para BAX reveló que oly afecta significativamente la apoptosis general en comparación con las células de control no tratadas (Figura 23C).

La Ostreolisina recombinante interactúa con la membrana celular y entra al citosol en las células HCT116.

Como se indica anteriormente, la unión selectiva y el agrupamiento de oly sobre las membranas de los condrocitos, combinado con los resultados obtenidos de membranas artificiales y células de ovario de hámster chino, indican que la distribución de las moléculas de oly unidas a las membranas no se distribuyó uniformemente sobre la superficie celular, sino que se concentró en muchos grupos focales. Esto sugiere que oly reconoce distintos dominios de membrana que probablemente sirven como sitios de unión para proteínas tipo aerolisina que conducen a su agregación y formación del poro.

A continuación, se investigó la distribución de membrana de oly recombinante después de los tratamientos con oly y FBE de células HCT116 en comparación con las condiciones de control (Figura 24). Las células tratadas durante 8 horas con 125 µg/ml de oly recombinante presentaron una mayor distribución de dominios ricos en oly en comparación con las condiciones de control y FBE (Figura 24). Además, las imágenes de corte transversal de las células tratadas con oly demostraron que la oly recombinante penetra en la membrana celular y entra al citosol.

Oly recombinante induce la reorganización y agrupamiento de la membrana rica en Cav-1 en las células HCT116.

Se cree que con el estímulo extracelular, la membrana plasmática está preparada para la formación de dominios más y grupos moleculares estabilizados con mayor tamaño y vida útil, tal como Caveolas. Para comprender la implicación de la Caveolina-1 en la apoptosis de las células de cáncer de colon, se exploró el efecto de la estimulación por oly en la línea celular HCT116 (Figura 25). Las Caveolas son evidentes como perfiles circulares con forma uniforme y 50-100 nm de diámetro, que se forman por la polimerización de caveolinas que conducen a la agrupación e invaginación de dominios ricos en esfingolípidos de colesterol existentes (balsas lipídicas) en la membrana plasmática celular. Por lo tanto, se investigó la distribución de membrana de Cav-1 en condiciones de control y después del tratamiento. Las células tratadas durante 8 horas con 125 µg/ml de oly presentaron un número de dominios ricos en Cav-1 en comparación con las condiciones de control (Figura 25). Por el contrario, (Figura 26), Oly no indujo ninguna regulación positiva notable de la expresión de la proteína asociada a las balsas lipídicas Flotilina-1.

Experimentos anticancerosos *In vivo*

Los ratones C57Bl se inocularon por vía subcutánea con una línea celular de carcinoma de colon MC38, dando como resultado el desarrollo *in situ* de tumores muy agresivos dentro de las 3 semanas posteriores a la inoculación celular. La Figura 27 demuestra el efecto de Oly sobre células de cáncer de colon derivadas de MC38 implantadas en ratones C57B1. Las células se inyectaron por vía subcutánea (2×10^5 células por ratón) en la cadera izquierda. Después de 10 días de inyección y después de la aparición de signos tumorales en algunos ratones, los ratones fueron tratados con 1 mg/kg de Oly, (3 veces a la semana por vía intraperitoneal). Los ratones de control recibieron PBS 3 veces por semana por vía intraperitoneal. Cada barra representa el error estándar de la media. N=8 ratones; los ratones se sacrificaron en el día 39. * = $P < 0,001$. Como puede verse, oly redujo significativamente el tamaño del tumor. La Figura 28 demuestra el efecto beneficioso de oly sobre el peso del tumor (que es aproximadamente la mitad del tamaño del control).

Ejemplo 7

Preparación de extractos de *Pleurotus ostreatus*:

Procedimiento 1 de preparación de *Pleurotus ostreatus*:

El polvo seco se preparó a partir de cuerpos fructíferos frescos de hongos *Pleurotus ostreatus* (Yarden) después de la congelación de los cuerpos fructíferos frescos con nitrógeno líquido, liofilización y posterior molienda durante 1 minuto. Cada 10 gramos de cuerpos fructíferos en polvo se extrajeron con 100 ml de agua fría (4 °C) agitando durante la noche y la mezcla se centrifugó a 10.000 rpm durante 30 minutos. Se filtró el sobrenadante, se analizaron alícuotas para la expresión de Oly por transferencia Western (en el futuro se desarrollará la metodología ELISA para probar la concentración de Oly) y se usaron alícuotas de 10 microlitros para probar la actividad en células HIB-1B de ratón.

Procedimiento 2 de preparación de *Pleurotus ostreatus*:

El polvo seco se preparó a partir de cuerpos fructíferos frescos de hongos *Pleurotus ostreatus* (Yarden) congelando las muestras a -20 °C, se liofilizó y se molió en Moulinex durante 1 min. Cada 10 gramos de cuerpos fructíferos en polvo se extrajeron con 100 ml de agua fría (4 °C) agitando durante la noche y se centrifugó a 10.000 rpm durante 30 minutos. Se filtró el sobrenadante, se analizaron alícuotas para la expresión de Oly por transferencia Western y se usaron alícuotas de 10 microlitros para probar la actividad en células HIB-1B de ratón.

Comparación de la concentración de oly en las dos preparaciones de *Pleurotus ostreatus*

Como se puede ver en la Figura 29, que muestra el análisis de transferencia Western, la concentración de Oly en extractos de *Pleurotus ostreatus* en polvo después de congelar en nitrógeno líquido (procedimiento 1) es mayor que en los extractos de *Pleurotus ostreatus* en polvo después de congelar a - 20 °C (procedimiento 2).

5 Prueba biológica de las dos preparaciones de *Pleurotus ostreatus*

Las muestras se analizaron biológicamente.

10 La prueba biológica utilizada fue la aparición de cuerpos redondos que se asemejan a gotitas de lípidos intracelulares dentro de las células HIB-IB, que derivan de un tumor de grasa marrón de un ratón transgénico, y son la primera línea celular de adipocitos marrón establecida capaz de expresar la proteína de desacoplamiento mitocondrial específica de grasa marrón (UCP).

15 Las células HIB-IB se expusieron a 10 µl de una dilución de preparación 1/10 (dilución en agua estéril destilada) de preparación de *Pleurotus ostreatus* del Procedimiento 1 o una cantidad similar de preparación de *Pleurotus ostreatus* del Procedimiento 2.

Resultados

20 (Se observa que para la incubación de 24 h, se obtuvieron resultados similares para la incubación de 48 h; sin embargo, los datos no se muestran)

25 Como puede observarse a partir de la figura 30, en las células HIB-IB de control no se observaron gotitas de lípidos (Figura 31A). En las células HIB-IB tratadas con Oly (10 µg/ml) se pueden ver muchas gotitas de lípidos (Figura 31B). En las células HIB-IB tratadas con el Procedimiento 1 de preparación de *Pleurotus ostreatus*.

30 Las células HIB-IB tratadas con cuerpos fructíferos se extraen de *Pleurotus ostreatus* de acuerdo con el Procedimiento I. Se observaron gotitas de lípidos en una cantidad similar a la de las células tratadas con oly (Figura 31C). Análogamente, como puede observarse a partir de la Figura 31D, que muestra las células HIB-IB tratadas con el Procedimiento 2 de preparación de *Pleurotus ostreatus*, la cantidad de gotitas de lípidos en las células fue similar a la cantidad de gotas en el tratamiento con oly.

35 En conclusión, ambos procedimientos de preparación de los extractos dieron como resultado una actividad similar a Oly suficiente. Incluso a bajas concentraciones de oly, las preparaciones son eficaces. Por lo tanto, se espera que la administración *in vivo* de estos aislados de hongos *Pleurotus ostreatus* induzca efectos anti-obesidad, resistencia a la insulina, anti cáncer y anti hígado graso como se mostró para la oly recombinante.

40 Los expertos en la materia apreciarán que la presente invención no está limitada por lo que se ha mostrado y descrito particularmente en el presente documento anteriormente. Más bien, el alcance de la invención está definido por las reivindicaciones que siguen.

LISTADO DE SECUENCIAS

45 <110> Yissum Research Development Company of The Hebrew University of Jerusalem LTD. SCHWARTZ, Betty YEHUDA-SHNAIDMAN, Einav

<120> OSTREOLISINA, VARIANTE FUNCIONALMENTE RELACIONADA DE LA MISMA, EXTRACTO QUE COMPRENDE OSTREOLISINA Y USOS DE LA MISMA

50 <130> P-78736-PC

<150> 61/955.338

<151> 19-03-2014

55 <150> 61/955.874
<151> 20-03-2014

60 <150> 62/082.308
<151> 20-11-2014

<160> 1

<170> PatentIn versión 3.5

65 <210> 1

ES 2 746 258 T3

<211> 137
 <212> PRT
 <213> Pleurotus aff. ostreatus

5 <400> 1

Ala Tyr Ala Gln Trp Val Ile Ile Ile Ile His Asn Val Gly Ser Gln
 1 5 10 15

Asp Val Lys Ile Lys Asn Leu Lys Ala Ser Trp Gly Lys Leu His Ala
 20 25 30

Asp Gly Asp Lys Asp Ala Glu Val Ser Ala Ser Asn Tyr Glu Gly Lys
 35 40 45

Ile Ile Lys Pro Asp Glu Lys Leu Gln Ile Asn Ala Cys Gly Arg Ser
 50 55 60

Asp Ala Ala Glu Gly Thr Thr Gly Thr Phe Asp Leu Val Asp Pro Ala
 65 70 75 80

Asp Gly Asp Lys Gln Val Arg His Phe Tyr Trp Asp Cys Pro Trp Gly
 85 90 95

Ser Lys Thr Asn Thr Trp Thr Val Ser Gly Ser Asn Thr Lys Trp Met
 100 105 110

Ile Glu Tyr Ser Gly Gln Asn Leu Asp Ser Gly Ala Leu Gly Thr Ile
 115 120 125

Thr Val Asp Thr Leu Lys Lys Gly Asn
 130 135

10

REIVINDICACIONES

1. Un extracto o extracto de hongo que comprende ostreolisina (oly) para su uso en el tratamiento o prevención de sobrepeso u obesidad.
- 5
2. El extracto para su uso de acuerdo con la reivindicación 1, en el que el extracto está formulado como una formulación nutracéutica, un aditivo alimentario o un complemento alimenticio.
3. El extracto para su uso de acuerdo con la reivindicación 1, en el que el tratamiento de la obesidad o el sobrepeso está asociado con la diferenciación del adipocito blanco en adipocito marrón en una célula o la inducción de adipogénesis marrón en una célula.
- 10
4. El extracto para su uso de acuerdo con la reivindicación 3, en el que se incrementa la expresión génica de los marcadores de adipogénesis marrón.
- 15
5. El extracto para su uso de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1-4, en el que el extracto de hongo procede de un hongo *Pleurotus*.
6. El extracto para su uso de acuerdo con la reivindicación 5, en el que el hongo *Pleurotus* es el hongo *Pleurotus ostreatus* o el hongo *Pleurotus pulmonarius*.
- 20
7. El extracto para su uso de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1-6, en el que el extracto es una formulación en forma de polvo, solución, suspensión, emulsión, comprimido o cápsula, un comprimido recubierto entérico, gel, crema, pomada, espuma, pasta o inyección.
- 25
8. El extracto para su uso de acuerdo con la reivindicación 7, en el que la formulación es una composición nutracéutica o un suplemento dietético y comprende un vehículo apto para el consumo de alimentos.
9. El extracto para su uso de acuerdo con la reivindicación 7, en el que la formulación que comprende el extracto es una composición farmacéutica y comprende un vehículo farmacéuticamente aceptable.
- 30

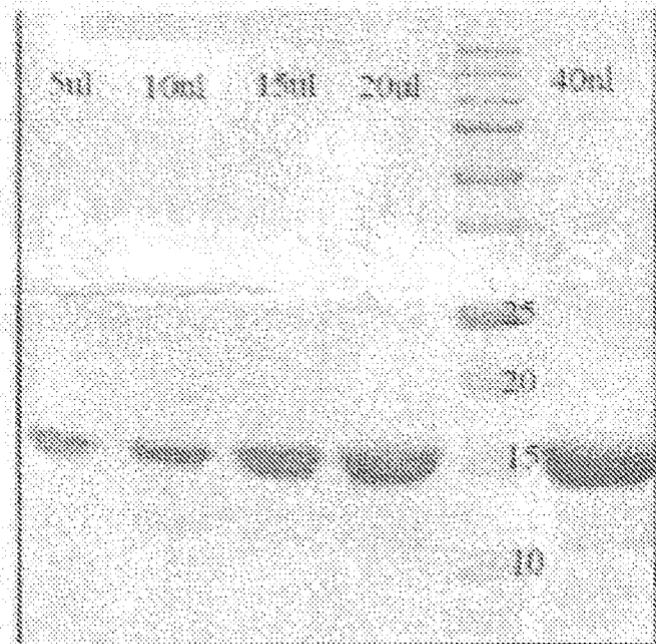


FIGURA 1

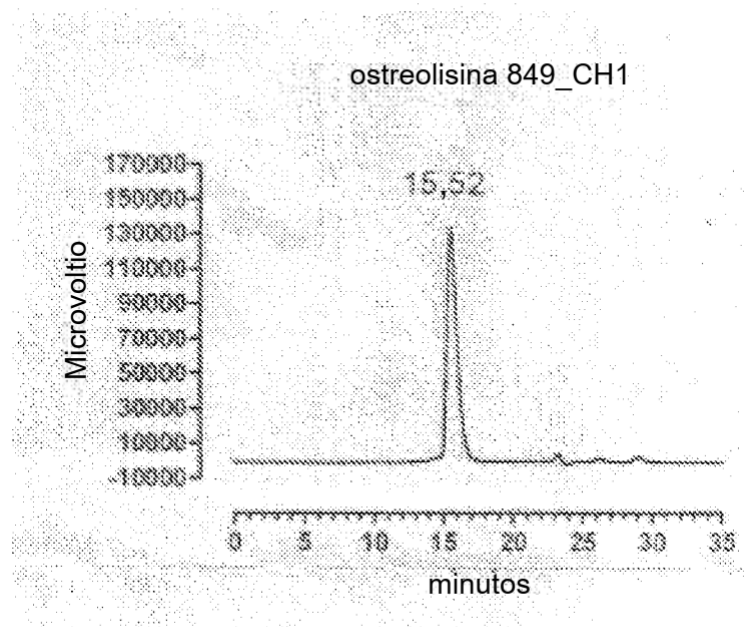


FIGURA 2

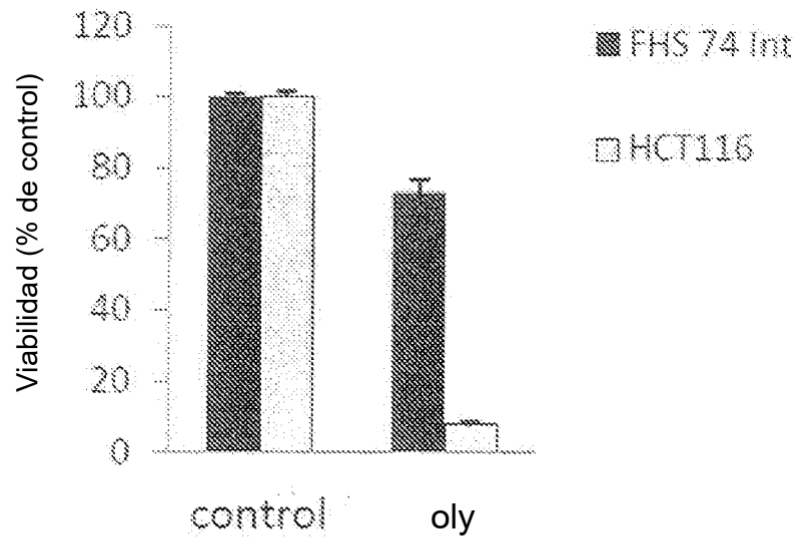


FIGURA 3

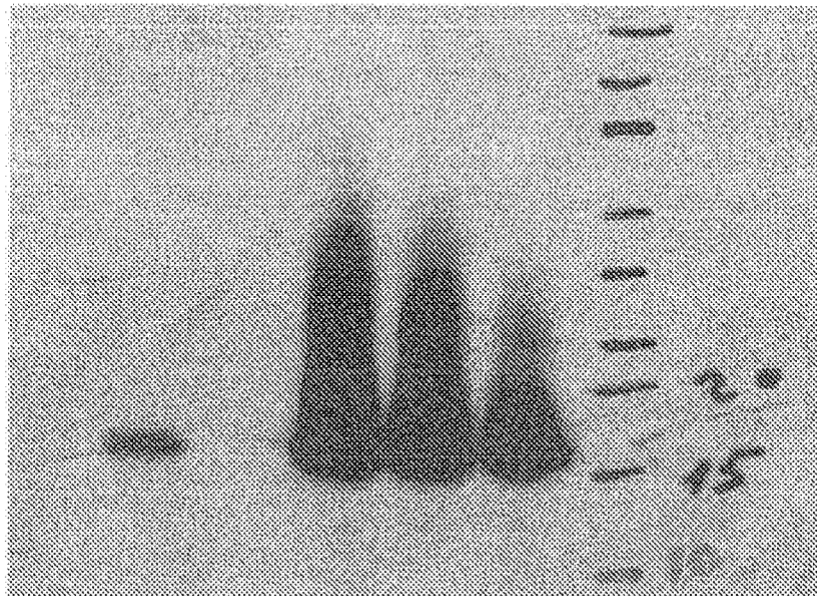


FIGURA 4

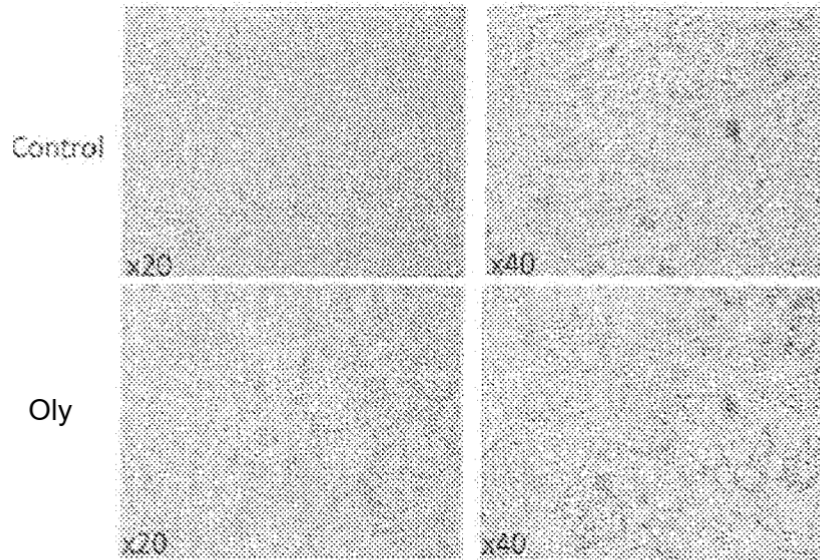
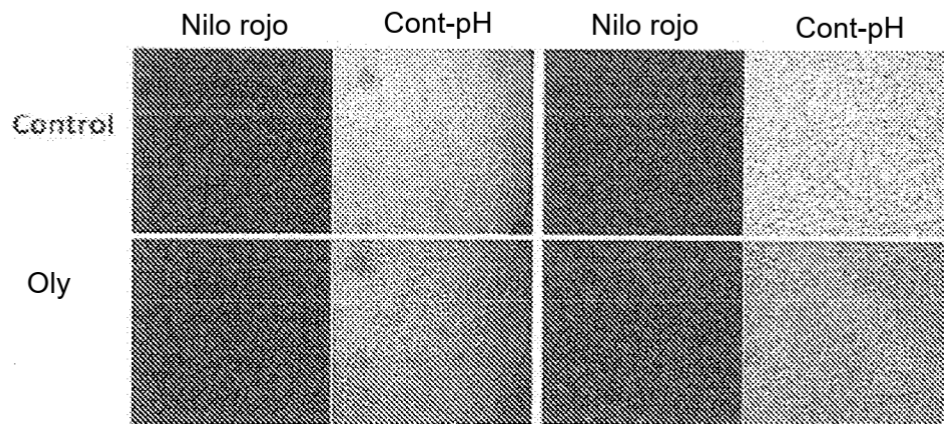


FIGURA 5A

HIB-1B



3T3-L1

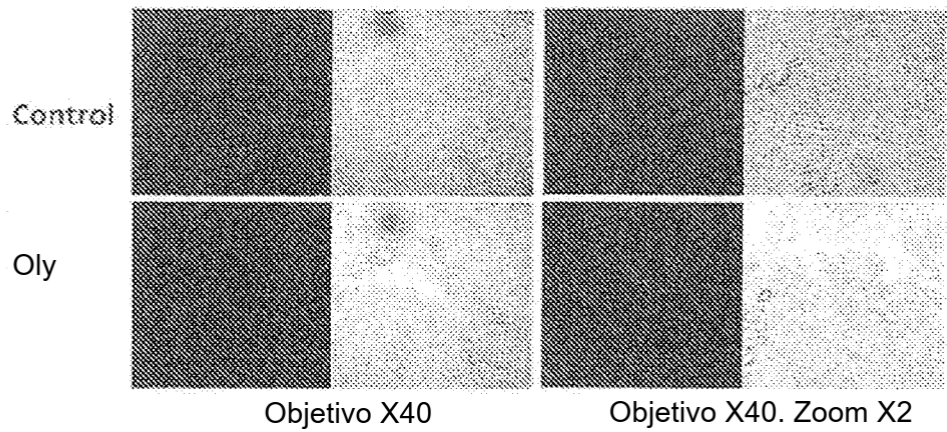


FIGURA 5B

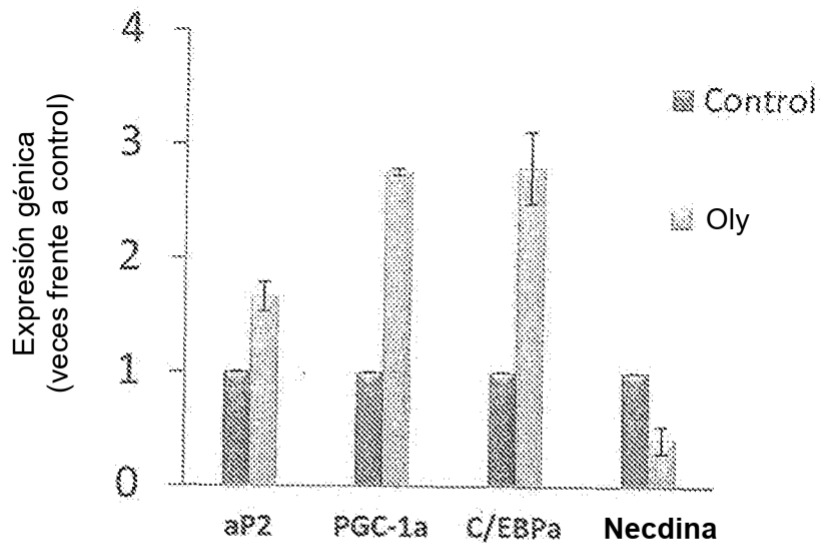


FIGURA 6A

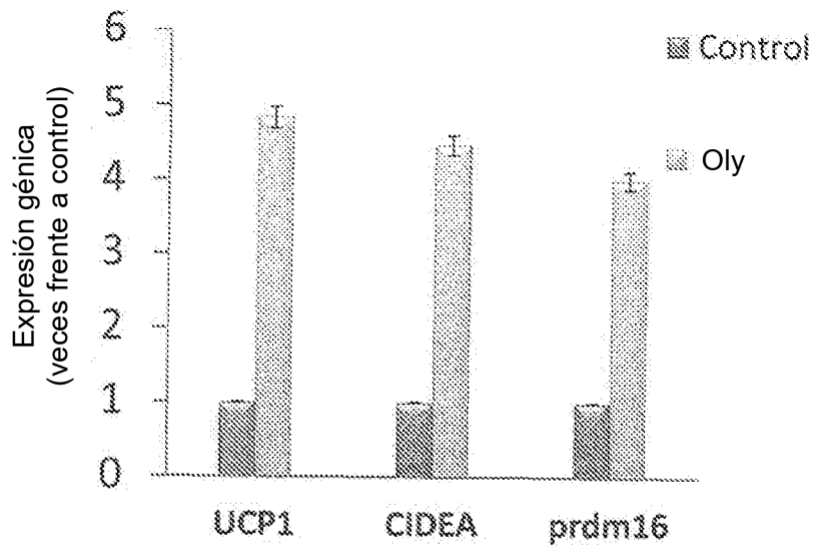


FIGURA 6B

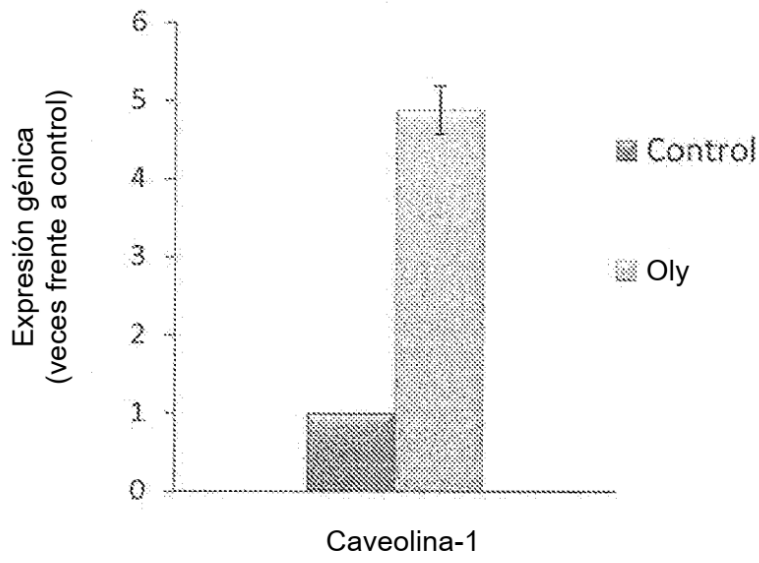


FIGURA 7

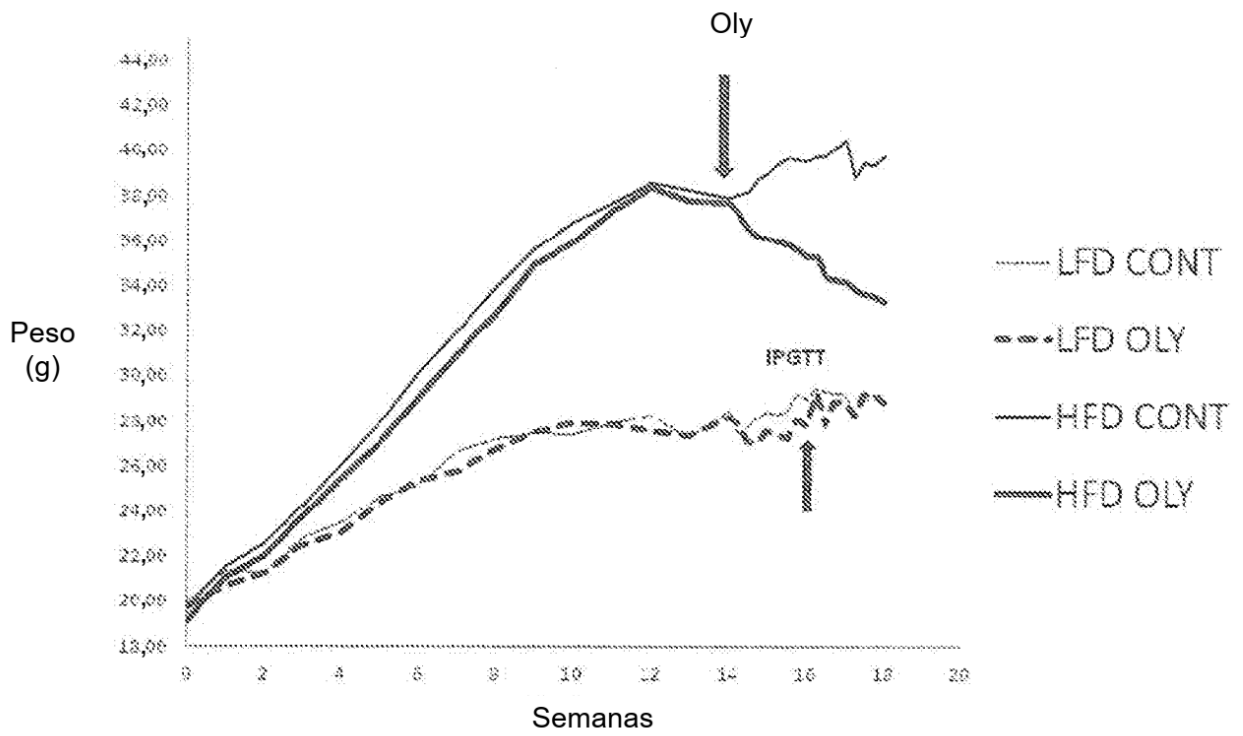


FIGURA 8

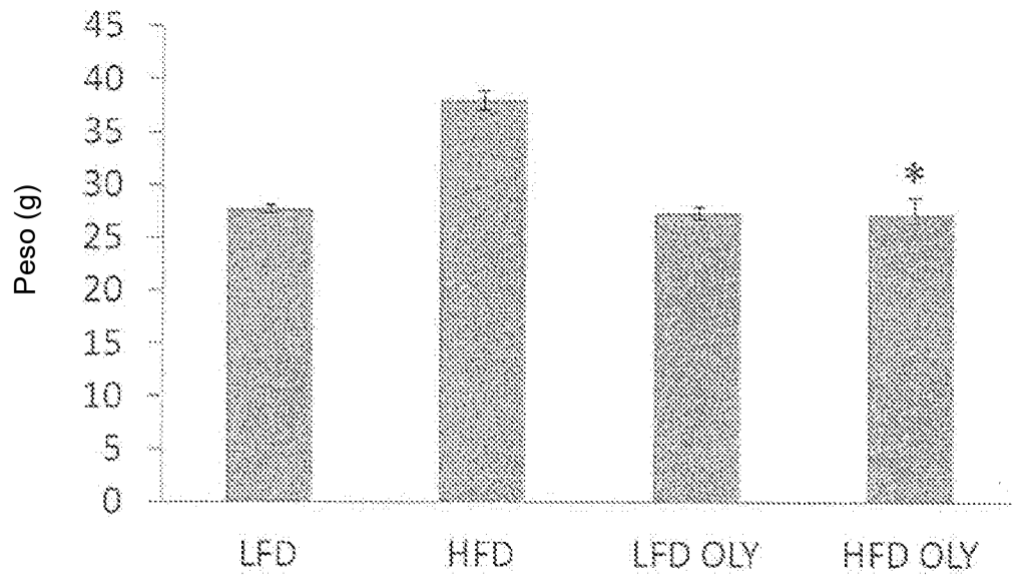


FIGURA 9

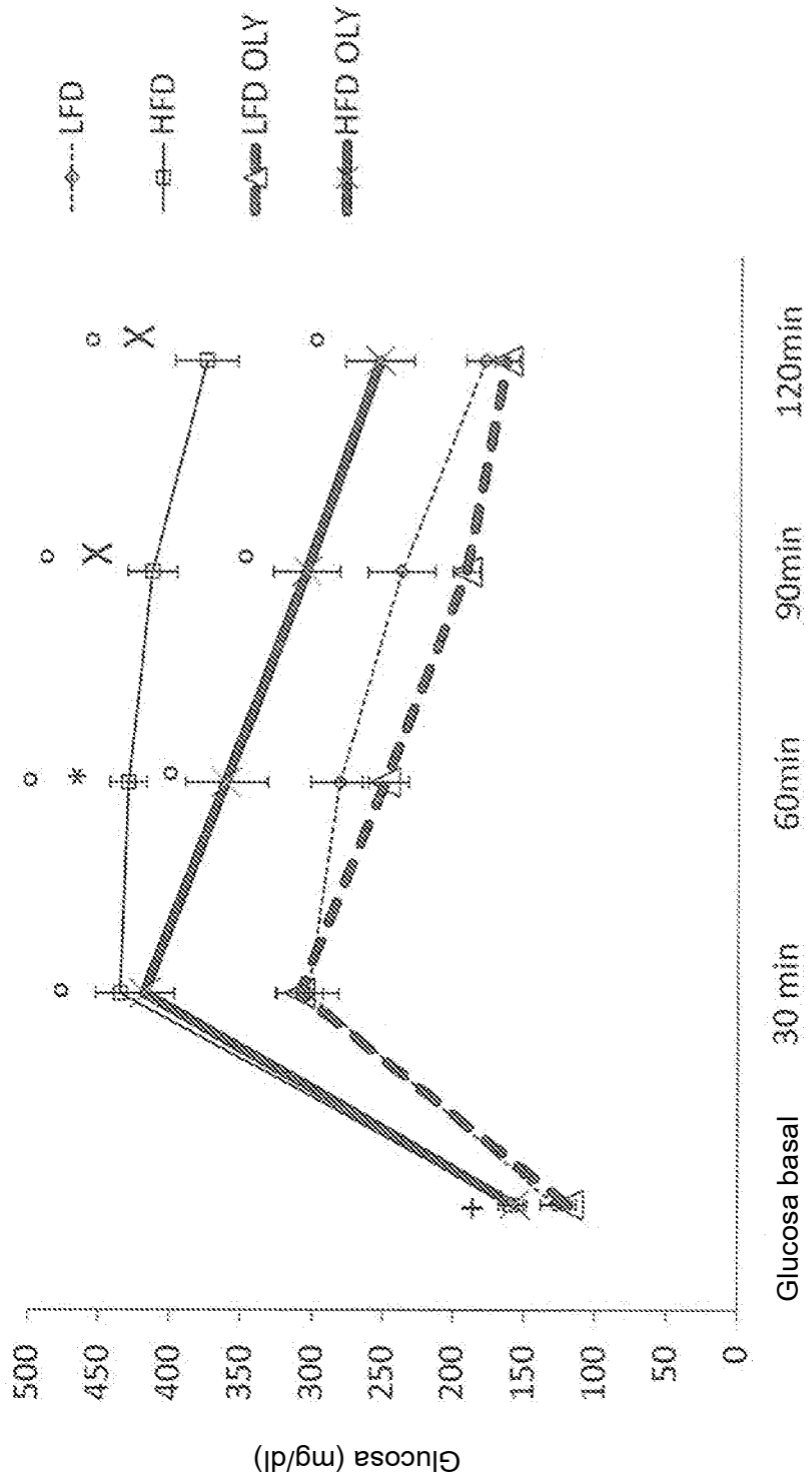


FIGURA 10A

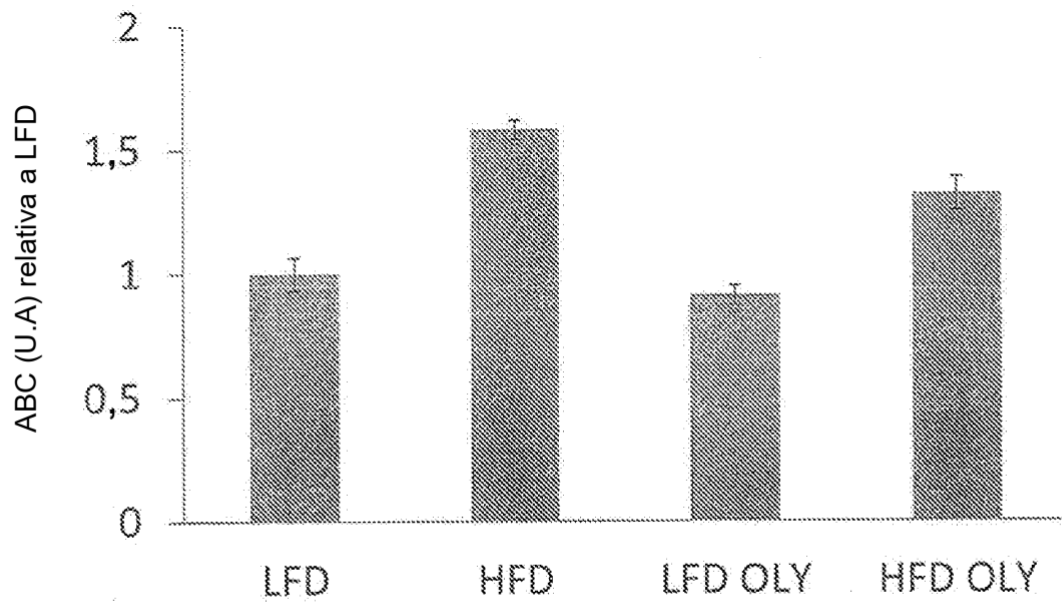


FIGURA 10B

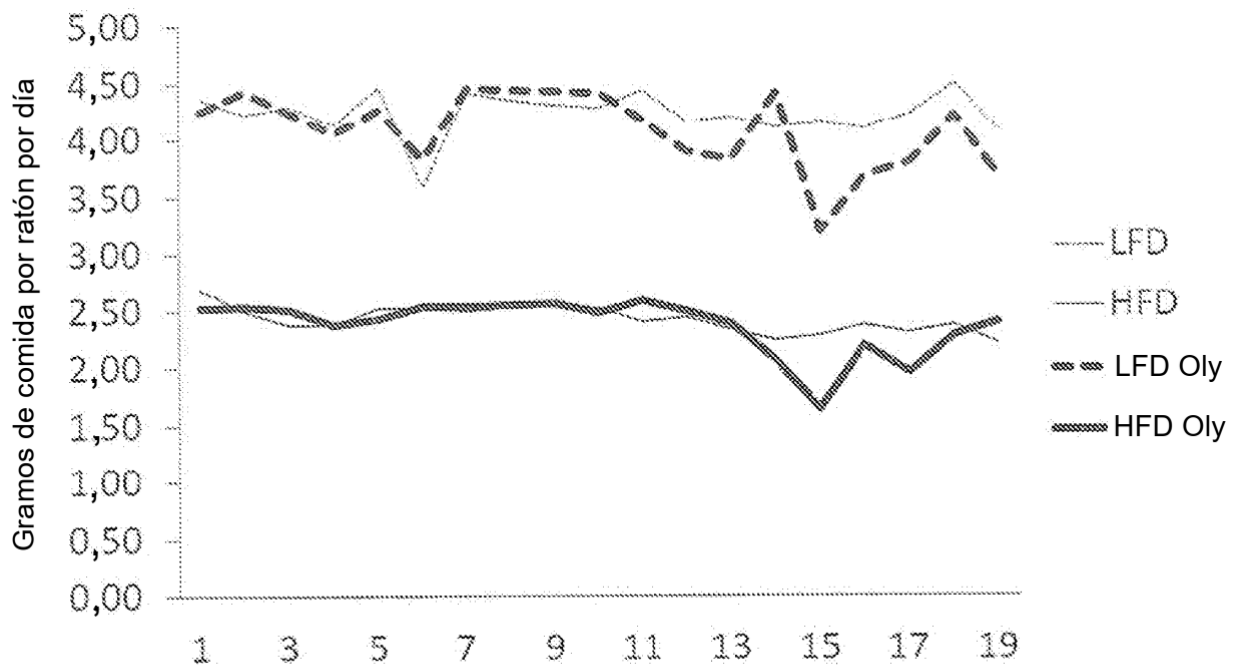


FIGURA 11

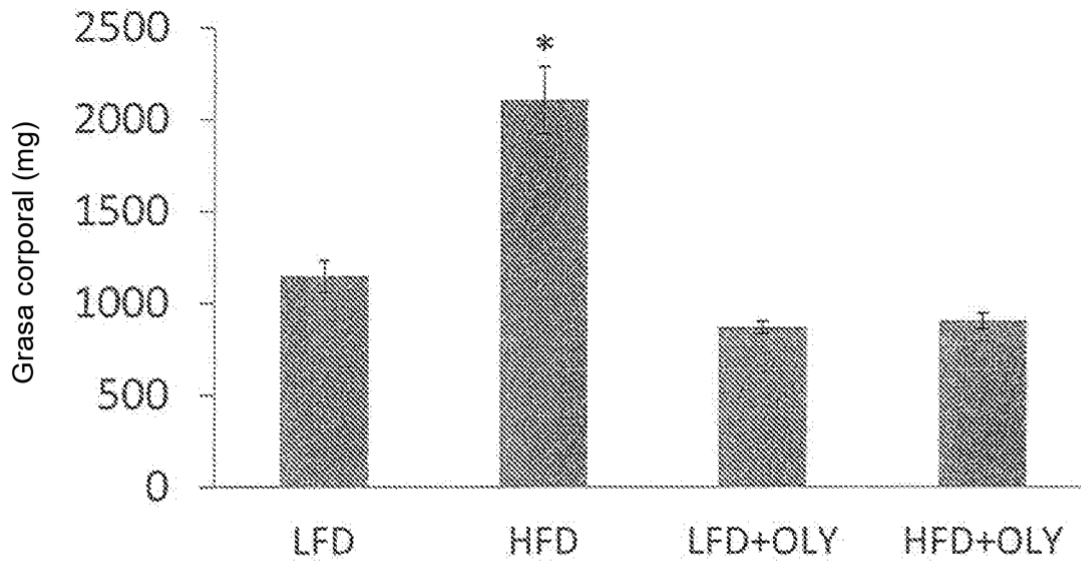


FIGURA 12

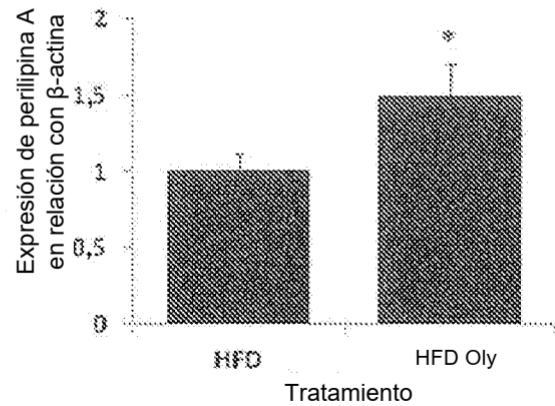
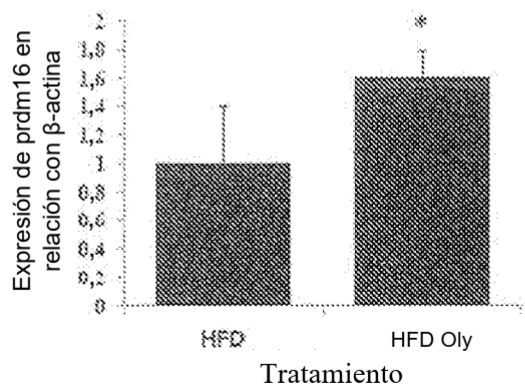
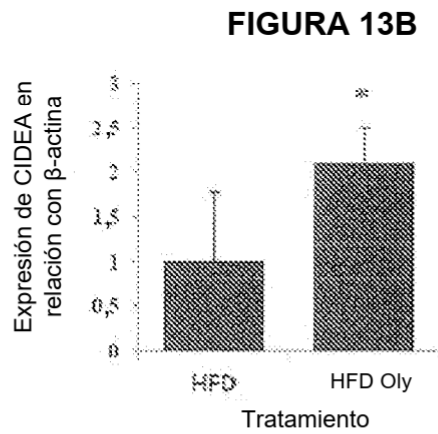
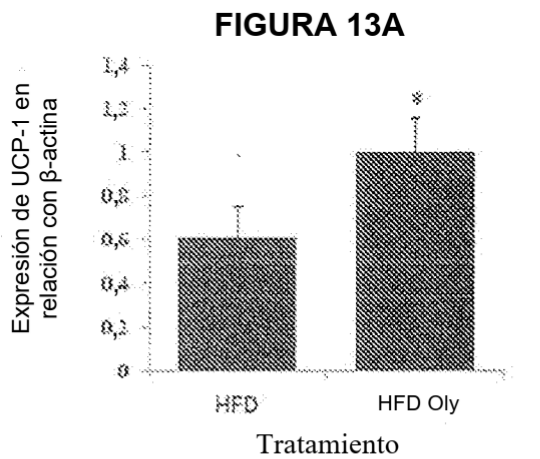


FIGURA 13C

FIGURA 13D

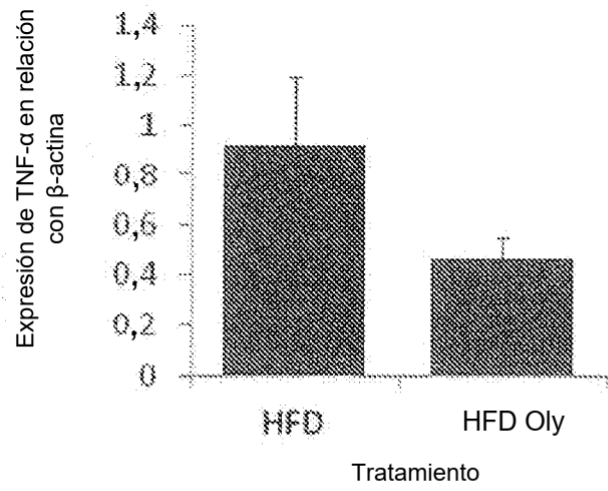


FIGURA 13E

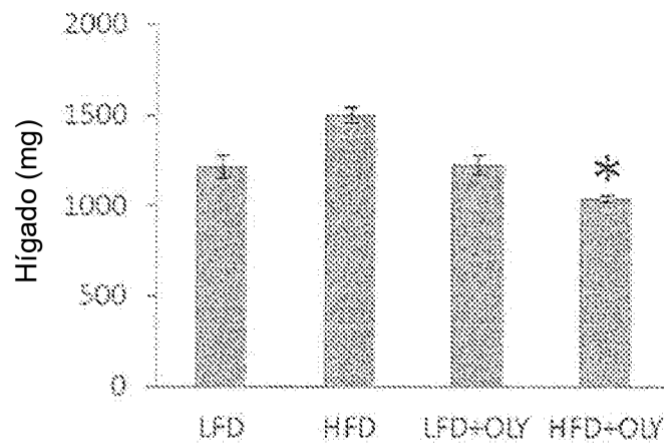


FIGURA 14

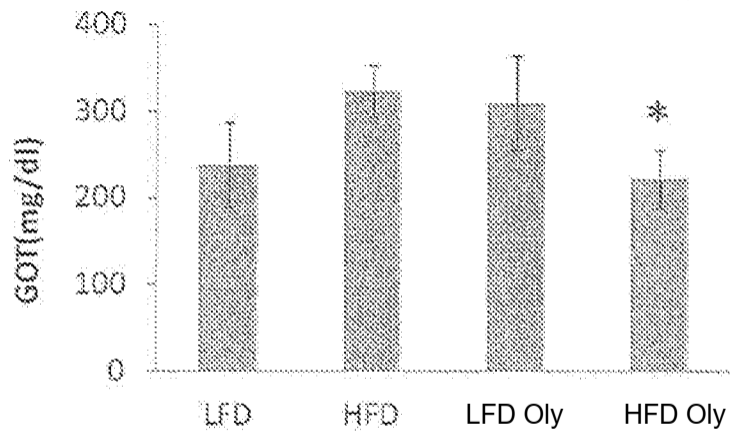


FIGURA 15

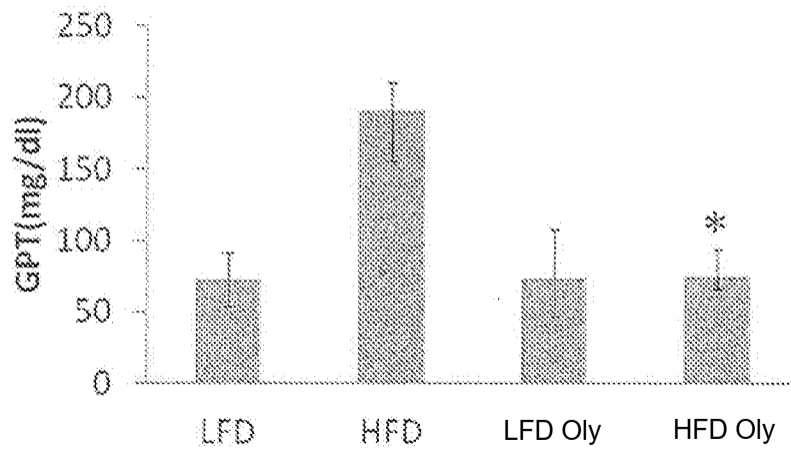


FIGURA 16

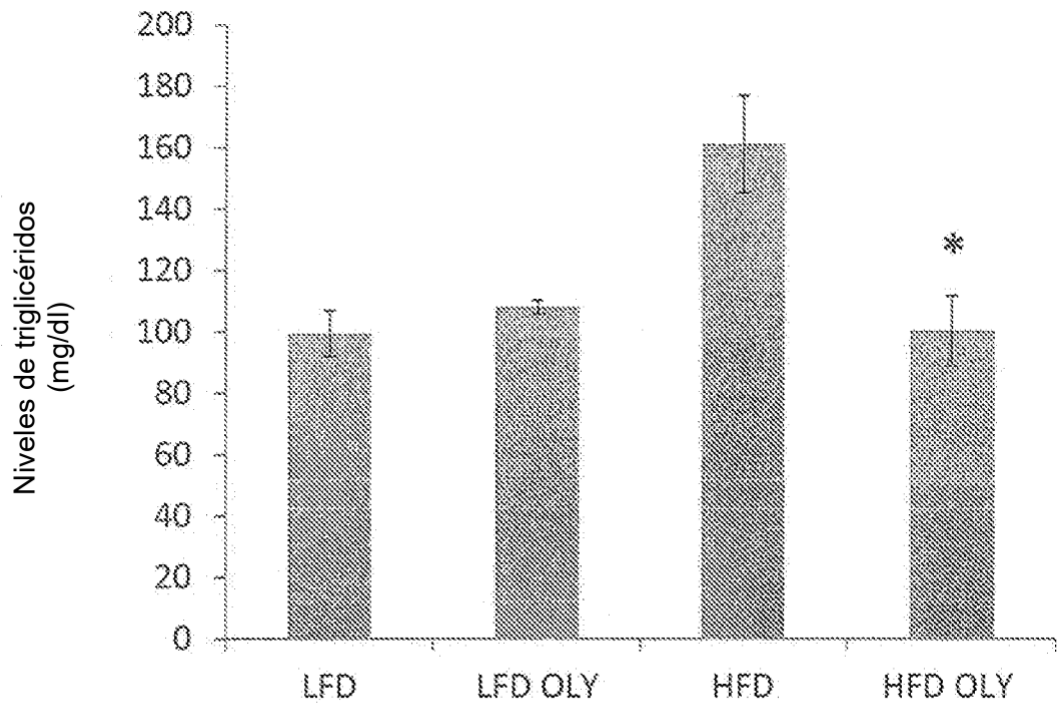


FIGURA 17

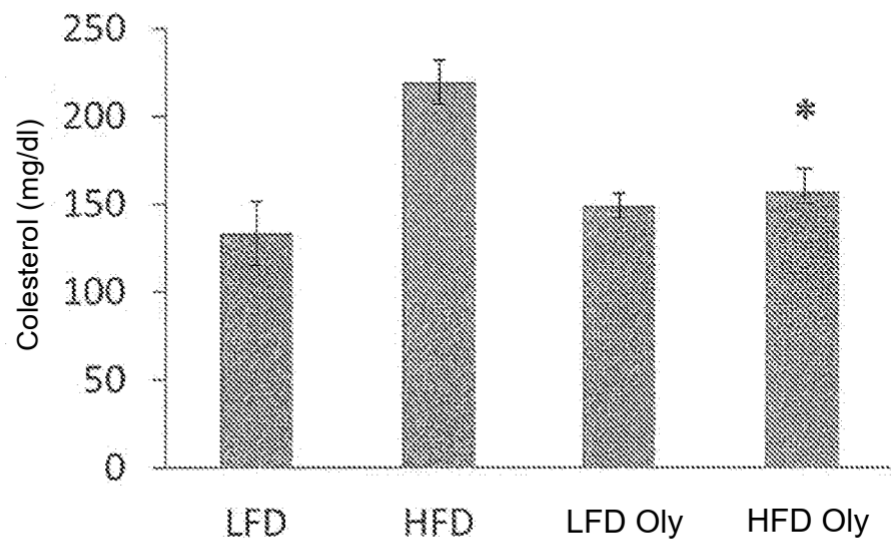


FIGURA 18

FIGURA 19A

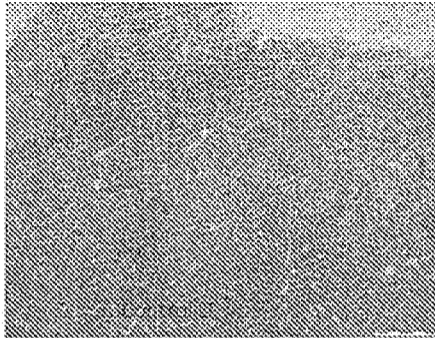


FIGURA 19B

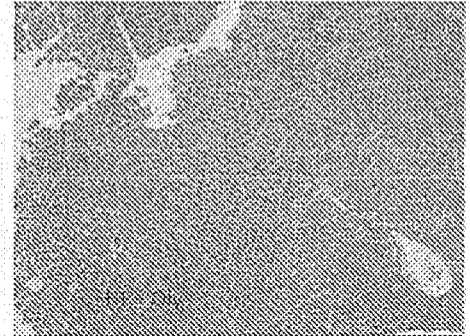
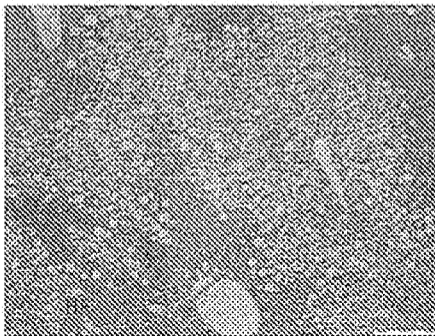
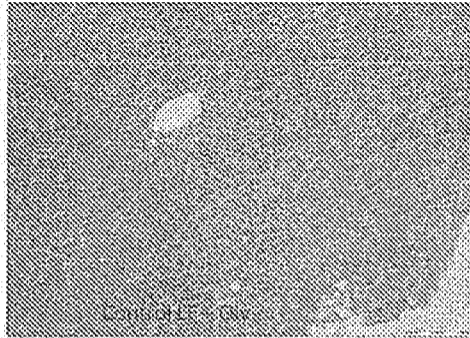


FIGURA 19C

FIGURA 19D

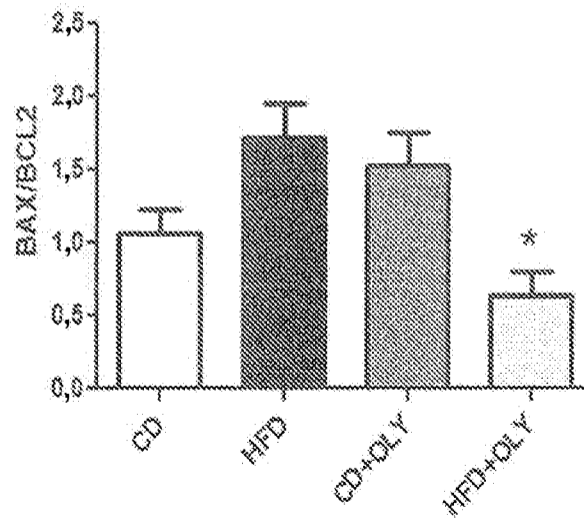


FIGURA 20

FIGURA 21A

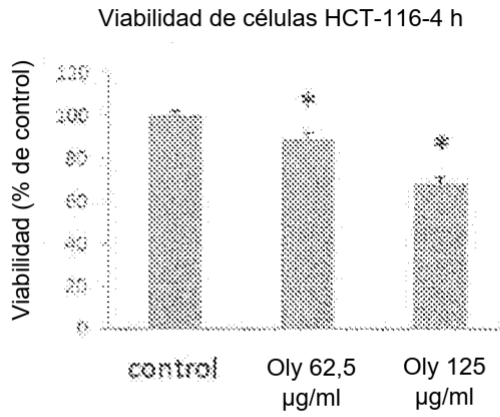


FIGURA 21B

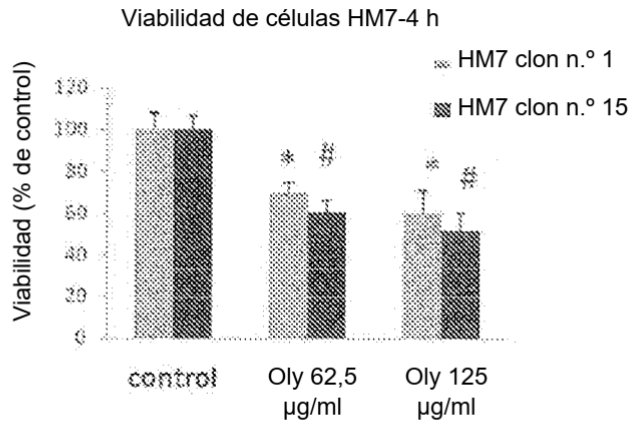


FIGURA 21C

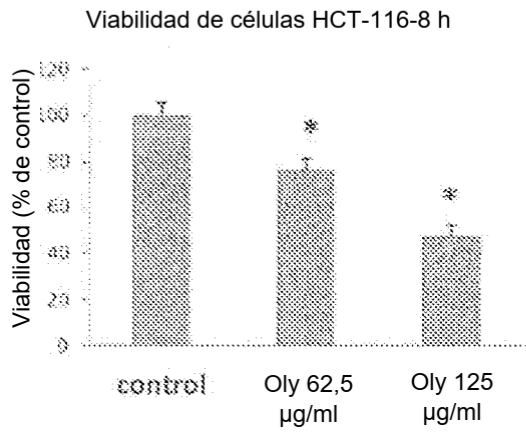


FIGURA 21D

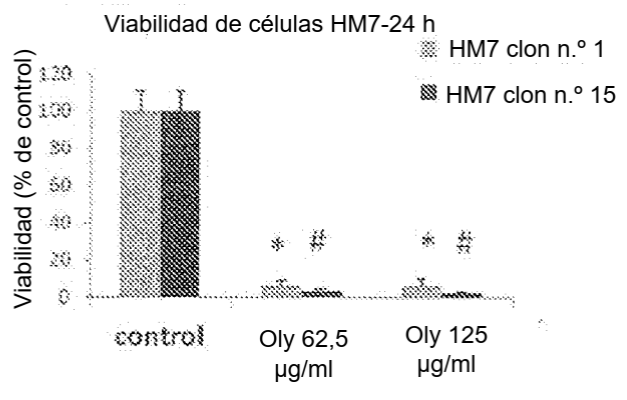
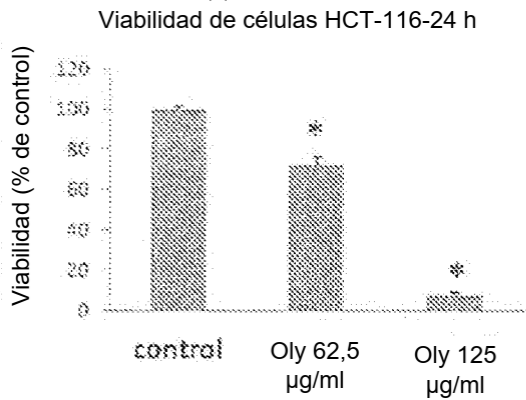
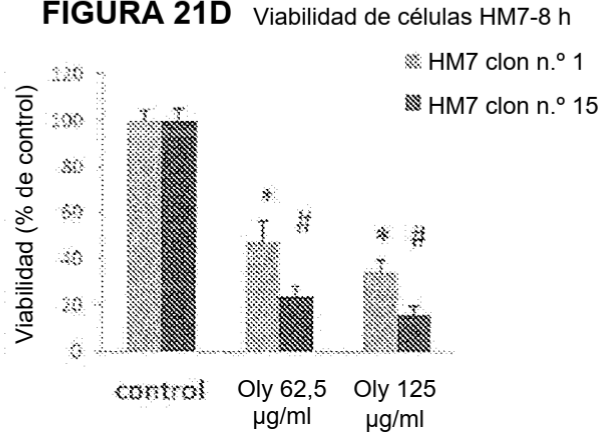


FIGURA 21E

FIGURA 21F

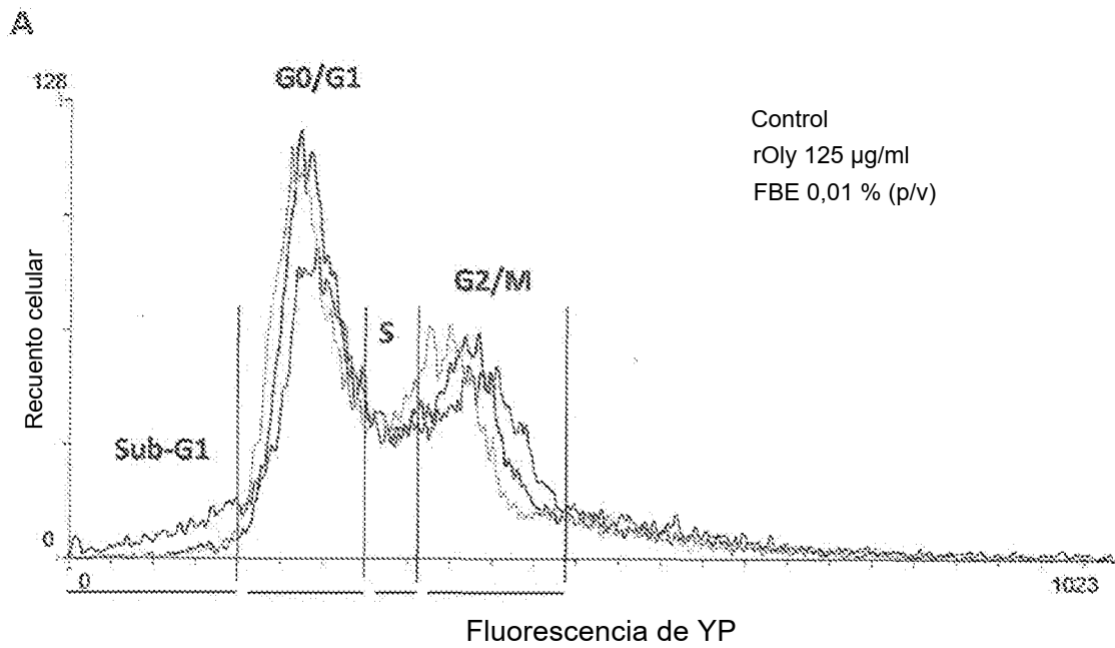


FIGURA 22A

B

	Control	rOly 125 µg/ml	FBE 0,01 % (p/v)
Sub-G1 (muerte celular)	1,238±0,124	7,380±0,584	2,045±0,326
G0/G1	42,482±1,709	33,807±1,109	48,048±2,307
S	13,198±0,845	11,483±0,726	13,022±1,158
G2/M	27,897±0,856	27,560±1,102	25,988±0,487

FIGURA 22B

FIGURA 23A

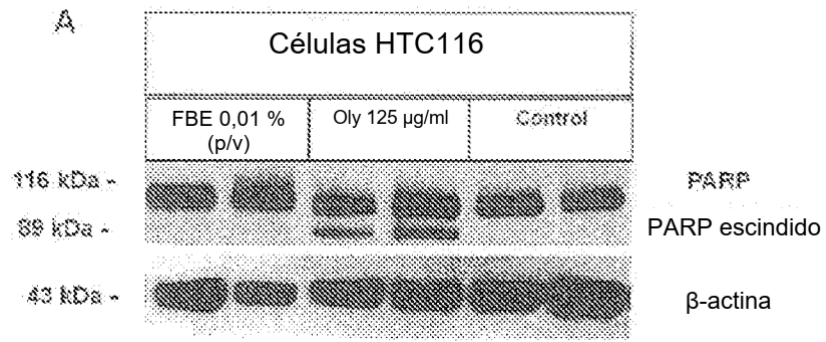


FIGURA 23B

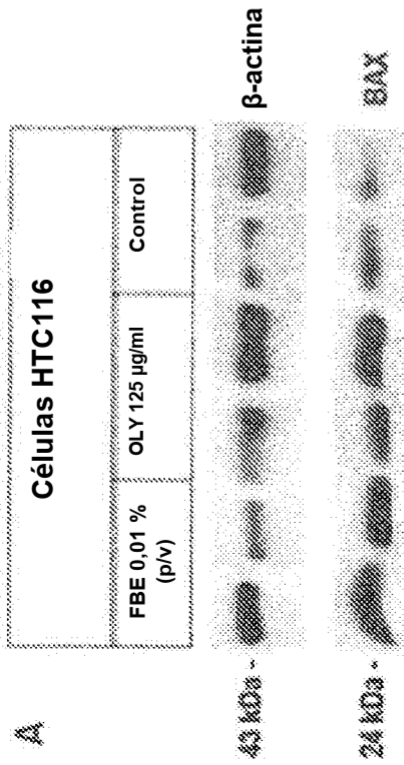
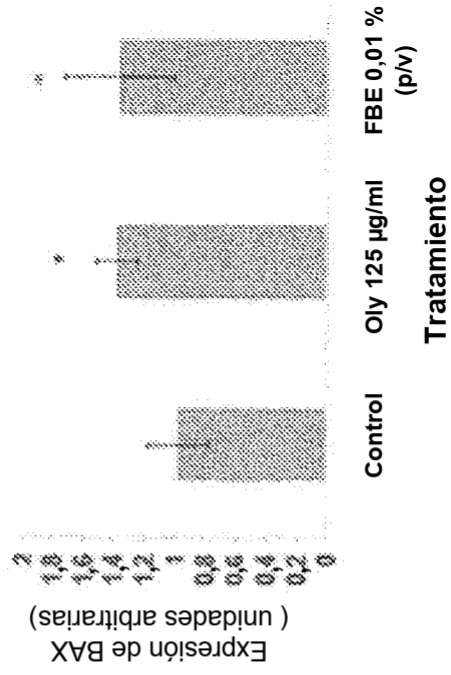


FIGURA 23C



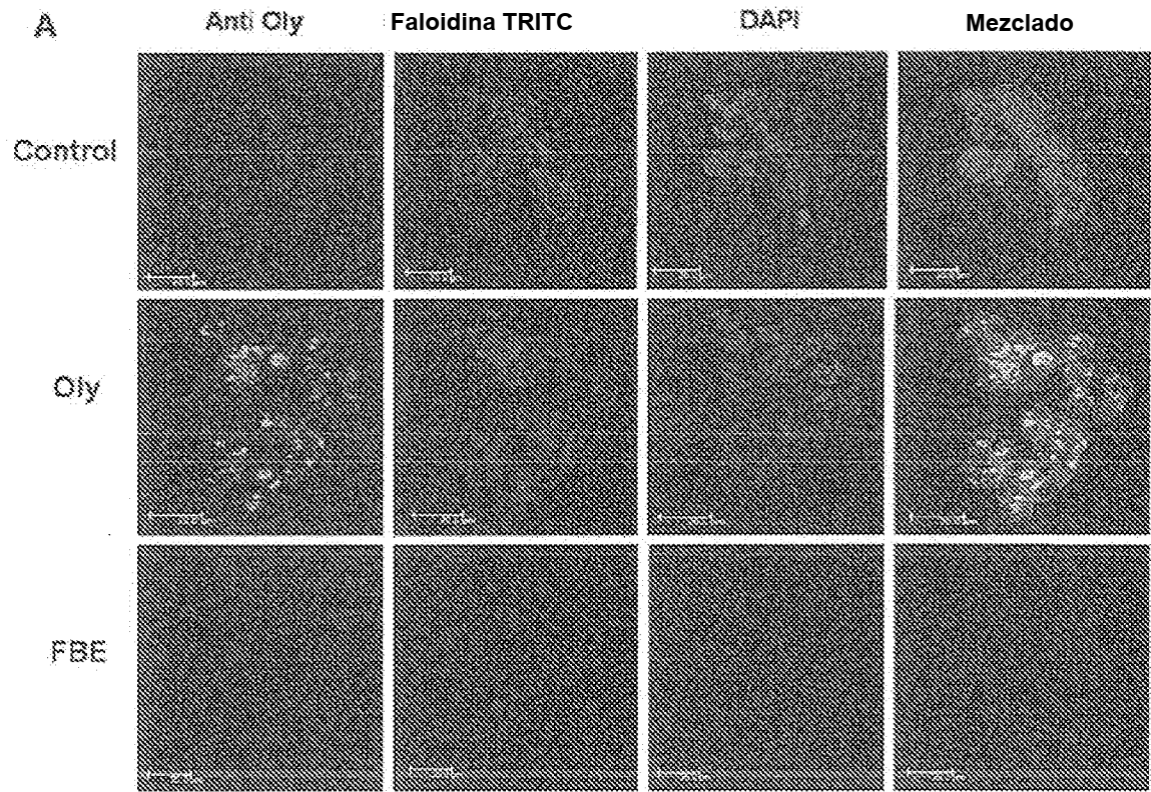


FIGURA 24

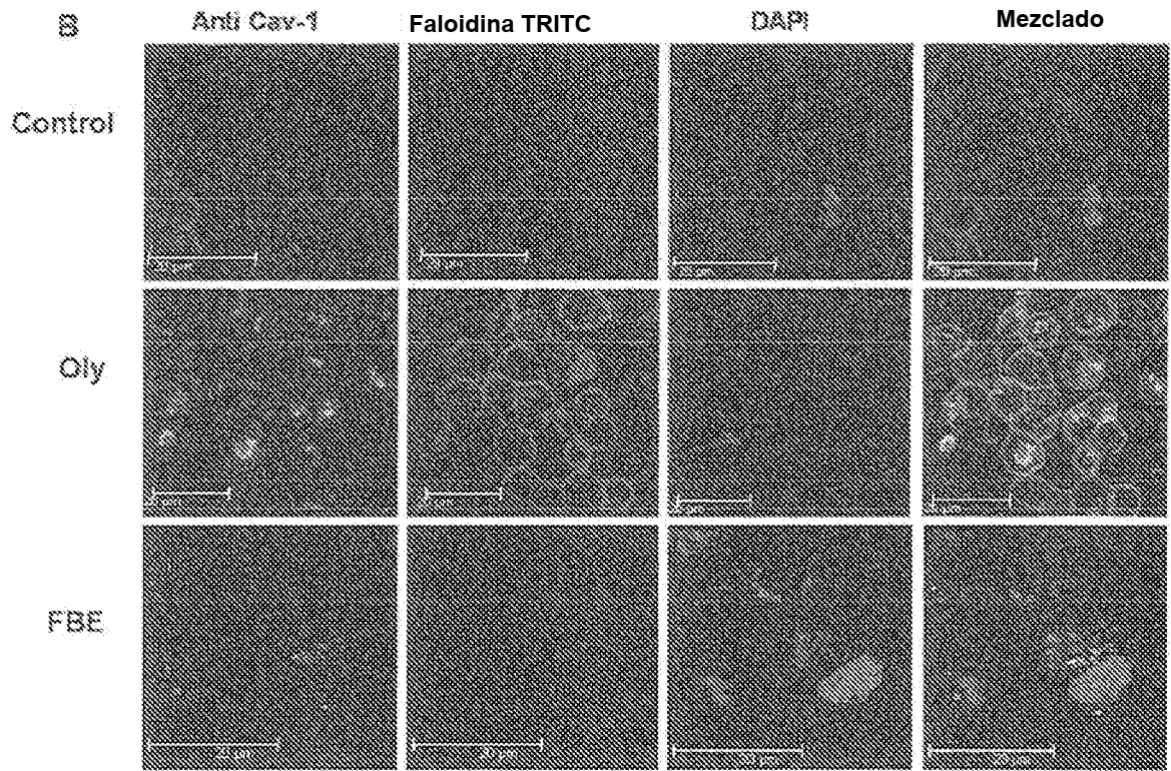


FIGURA 25

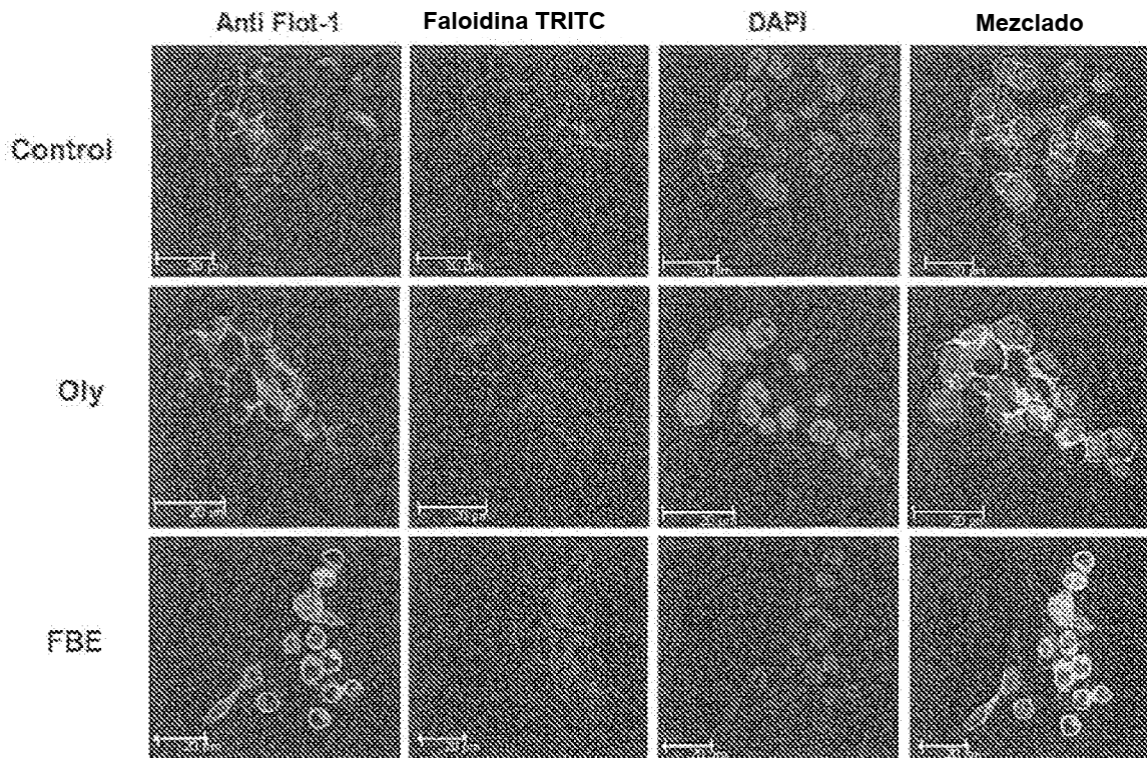


FIGURA 26

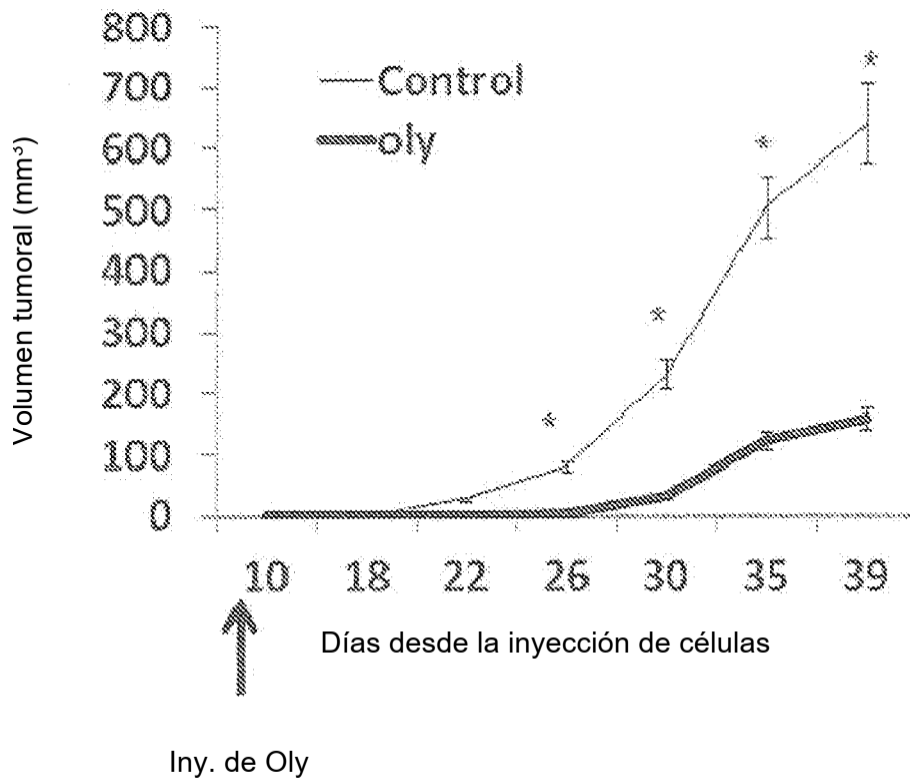


FIGURA 27

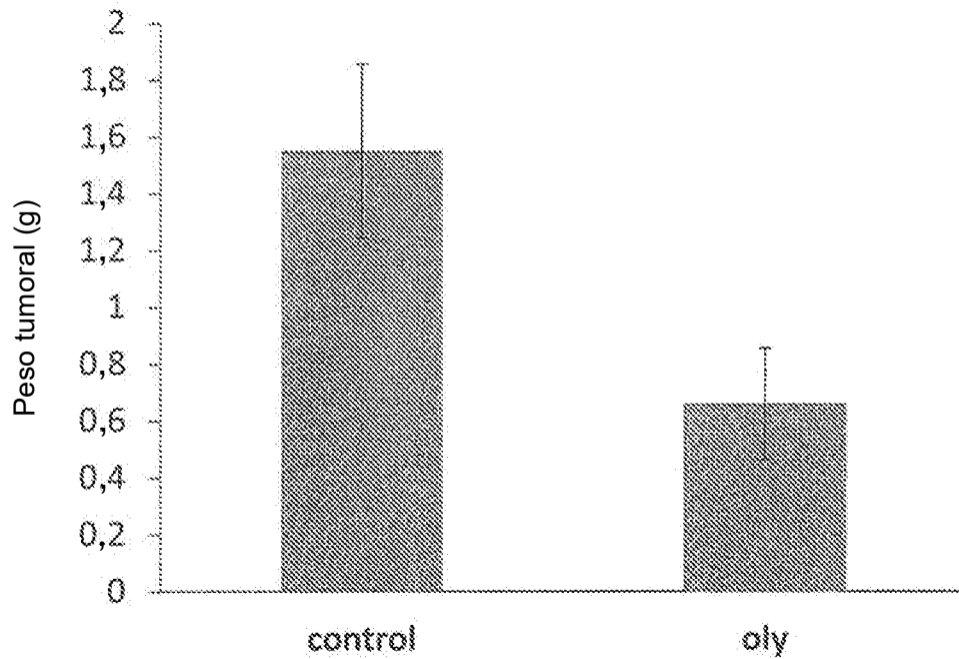


FIGURA 28

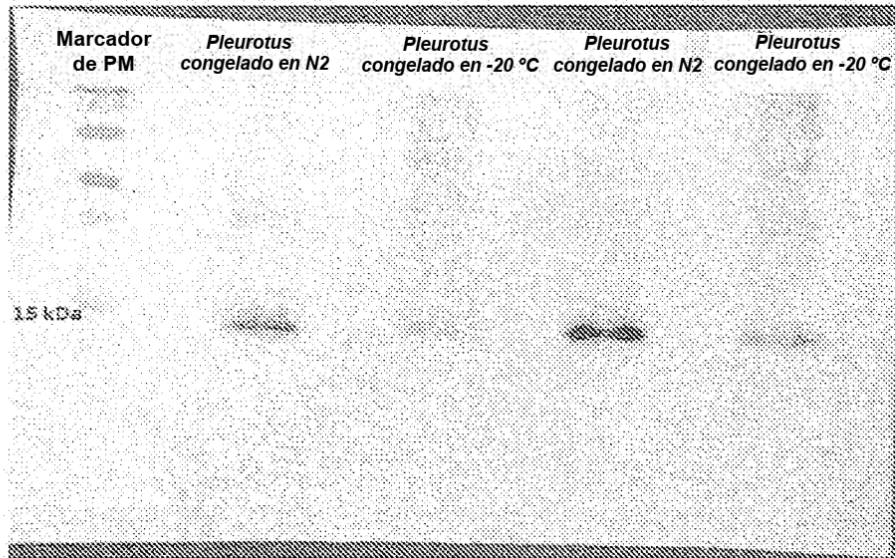
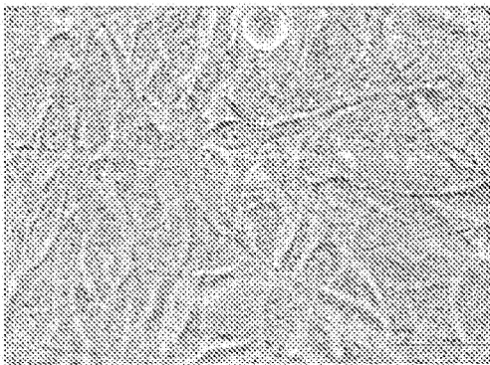
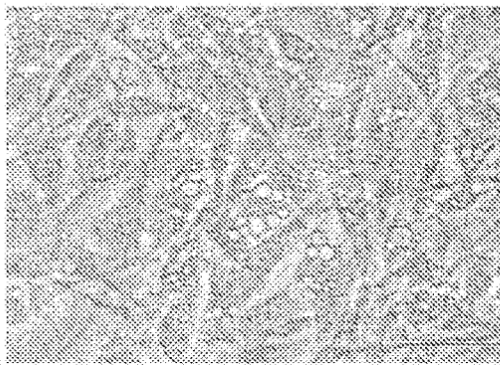


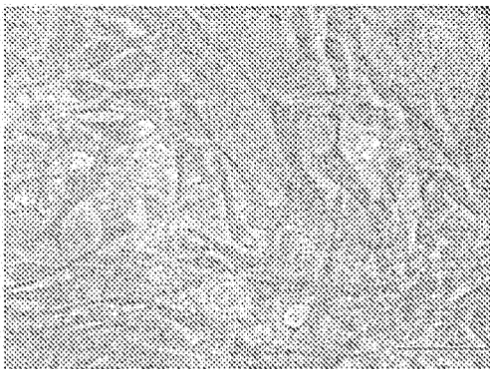
FIGURA 29



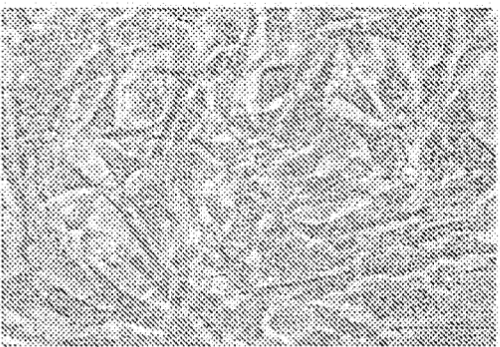
30A



30B



30C



30D

FIGURA 30